
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
РОССИЙСКОЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО ИМЕНИ И.П. ПАВЛОВА
РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ
РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОНД

при участии

СОЮЗА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЩЕСТВ СТРАН СНГ



III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

VII СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ
X РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»
VII СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ

НАУЧНЫЕ ТРУДЫ ТОМ 2

*Под редакцией
А.Г. Габилова и М.А. Островского*

Сочи – Дагомыс, Россия
3–8 октября 2021

УДК 57
ББК 28я43
Т66

Под редакцией А.Г. Габиева и М.А. Островского

Т66 **III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ,
БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ**
♦ **VII СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ**
♦ **X РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»**
♦ **VII СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ**
(Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021).
НАУЧНЫЕ ТРУДЫ. Том 2. – М.: Издательство «Перо», 2021. – 313 с.

ISBN 978-5-00189-677-7 (Общ.)

ISBN 978-5-00189-678-4 (Т.2.)

Содержание

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Пленарные доклады	3
Химия и биология нуклеиновых кислот	7
Белки и пептиды	43
Геном. Протем. Метаболом	146
Биотехнология: фундаментальные основы и приложения	179
Биохимия растений	196
Молекулярная вирусология	204
Биохимия и молекулярная медицина	216
Ядерная медицина	277
Молекулярный имиджинг	289
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	306

Сборник научных трудов включает материалы актовых и пленарных лекций, симпозиальных докладов, выступлений на заседаниях круглых столов и стендовых докладов, представленных на VII Съезде биохимиков России, X Российском симпозиуме «Белки и пептиды» и VII Съезде физиологов СНГ в рамках III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. Тематика представленных докладов охватывает актуальные разделы физиологии, биоорганической химии, биотехнологии, молекулярной биологии, молекулярной вирусологии и смежных дисциплин.

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 978-5-00189-677-7 (Общ.)
ISBN 978-5-00189-678-4 (Т.2.)

УДК 57
ББК 28я43

© Российское общество биохимиков и молекулярных биологов, 2021
© Союз физиологических обществ стран СНГ, 2021
© Коллектив авторов, 2021

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ГЕНОМА

С.В. Разин

Институт биологии гена РАН

Доменная гипотеза организации генома эукариот была сформулирована в 80-е годы прошлого века. Согласно данной гипотезе, геном может быть представлен как цепочка из единообразно организованных структурно-функциональных блоков, транскрипционный статус которых коррелирует со способом упаковки хроматина в границах домена. Классическими примерами таких блоков считали домены бета-глобиновых генов позвоночных животных. После перехода от изучения отдельных областей генома к полногеномным исследованиям стало, однако, очевидным, что линейные структурно-функциональные домены, включающие гены и их регуляторные элементы, встречаются в геноме достаточно редко. Типичной является ситуация, когда энхансеры находятся далеко от регулируемых ими генов, и функционально-значимые взаимодействия между генами и энхансерами формируются только на уровне пространственной организации генома. В этой связи чрезвычайно важным представляется изучение механизмов, формирующих и поддерживающих пространственную организацию генома. Современная модель постулирует, что эта организация складывается в результате взаимодействия двух независимых процессов: сегрегации различных типов хроматиновых доменов и процесса активной экструзии хроматиновых петель.

В настоящей лекции мы рассматриваем роль различных сил, поддерживающих сегрегацию хроматиновых доменов с разным эпигенетическим статусом, и установление контактов между удаленными участками генома. Особое внимание будет уделено электростатическим контактам нуклеосом, процессу жидкостного разделения фаз, и роли некодирующих РНК в привлечении архитектурных белков к определенным местам генома. Мы также обсудим вопрос о том, на сколько вариабельной является пространственная организация генома индивидуальных клеток, и представим результаты, демонстрирующие, что спектр пространственных контактов удаленных элементов генома может существенно изменяться по ходу клеточной дифференцировки. Наконец, будут представлены результаты, демонстрирующие, что процесс активной экструзии хроматиновых петель осуществляется когезином, который не образует топологического кольца вокруг молекулы ДНК.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-14-00016

БЕЛКИ-ПАРТНЕРЫ ПОЛИ(АДР-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗЫ 1 И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ЕЕ АКТИВНОСТИ

О.И. Лаврик

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Лекция посвящена недавно открытым белкам – партнерам поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 (PARP1). Мы полагаем, что регулятор ключевых процессов в клетках высших эукариот PARP1 обеспечивает специфическую регуляцию репарации ДНК, модификации гистонов при remodelировании хроматина, а также других PARP-зависимых процессов при участии взаимодействующих с PARP1 белков (Alemasova, Lavrik, NAR, 2019). Будет рассмотрена роль XRCC1, PARP2 и их кооперации с PARP1 в регуляции репарации оснований (Vasil'eva et al, IJMS, 2021), роль белков-партнеров PARP1 в репликации ДНК (Maltseva et al, DNA repair, 2018), а также роль содержащих неупорядоченные “prion-like” домены РНК-связывающих белков в регуляции активности PARP1. Мультифункциональный РНК-связывающий белок YB-1 эффективно взаимодействует с PAR – «третьей нуклеиновой кислотой», является мишенью PAR-илирования, а также стимулирует активность PARP1. Согласно предложенному механизму, YB-1 при экспрессии в опухолях может снижать действие антираковых препаратов – ингибиторов PARP1 (Alemasova et al, Oncotarget, 2018; Naumenko et al, Biomolecules, 2020). Другой важный партнер PARP1 – ядерный РНК/PAR-связывающий белок FUS, локализуется вблизи поврежденных ДНК при активации PARP1. При взаимодействии FUS с PAR формируются немембранные компартменты, в которых концентрируются повреждения ДНК, что облегчает процесс их репарации. Гидролиз PAR с помощью PAR-гликогидролазы приводит к разрушению этих структур, увеличивая число оборотов репарации ДНК (Singatulina et al, Cell Rep, 2019). Еще один важнейший партнер PARP1/2 – недавно открытый фактор PAR-илирования гистонов HPF1, модулирует специфичность модификации белков по остаткам серина и стимулирует PAR-илирование гистонов. В совокупности, результаты демонстрируют ключевую роль белков-партнеров PARP1 в обеспечении специфической регуляции репарации, репликации, модификации гистонов и других процессов. Предложены и обоснованы механизмы регуляции специфичности PARP1. Полученные результаты могут стать основой новой стратегии конструирования направленных ингибиторов PARP1/2, обеспечивающих специфическую регуляцию активности PARP1, а также эффективную и одновременно менее токсичную терапию онко- и нейродегенеративных заболеваний.

Работа поддержана грантом РФФИ 21-64-00017.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЗАХВАТ И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЭНГРАММНЫХ КЛЕТОК

К.В. Анохин^{1,2}

¹*Институт перспективных исследований мозга, МГУ им. М.В. Ломоносова;*

²*НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва*

Долговременная память хранится в нервной системе в форме распределенных популяций взаимосвязанных нейронов, специализированных относительно тех или иных элементов индивидуального опыта – так называемых энграмм. Наш подход к изучению энграмм, использует зависимость от опыта экспрессию непосредственных ранних генов (НРГ). Консолидация долговременной памяти вовлекает активацию НРГ в нервных клетках и поэтому они могут быть использованы для визуализации энграмм. В настоящее время мы маркируем клетки энграммы с помощью стратегии направленной рекомбинации в активных популяциях (TRAP), которая использует опыт-зависимую Cre-loxP рекомбинацию в нейронах мозга мышей линий Fос-CreERT2 и Arc-CreERT2, скрещенных с различными линиями Cre-репортеров. Захваченные нейроны энграммы могут быть

затем дополнительно помечены с помощью иммуногистохимического выявления продуктов НРГ во время извлечения памяти, ее угашения или ассоциации с другими воспоминаниями. В сочетании с методами оптического просветления и плоскоструевой микроскопии целого мозга эти подходы позволяют получать крупномасштабную визуализацию распределения клеток, местного распределения и динамики энграмм. Мы также используем вариацию стратегии TRAP, основанную на двойной иммуногистохимической окраске для эндогенного c-Fos и Cre-рекомбиназы, экспрессируемой под промотором гена c-fos. В таких экспериментах маркирование на c-Fos и Cre проводится в разные моменты времени после обучения животных. Эта стратегия позволяет сравнить нейроны, которые были активированы в двух когнитивных эпизодах с интервалом 3–8 ч. Кроме того, мы используем трансгенных мышей Fos-Cre-GCaMP для оптического имиджинга кальциевой активности в когнитивно индексированных нейронах. Общее количество положительных нейронов GCaMP3 достигает максимума через 72 ч после эпизода рекомбинации и остается стабильным в течение не менее двух месяцев, что позволяет изучать свойства популяций когнитивно индексированных нейронов, захваченных во время приобретения индивидуального опыта.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2020-801) и Российского научного фонда (грант РНФ № 20-15-00283).

СПИНАЛЬНАЯ НЕЙРОМОДУЛЯЦИЯ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ПОСТУРАЛЬНЫХ И ЛОКОМОТОРНЫХ ФУНКЦИЙ: ИННОВАЦИОННЫЕ СТРАТЕГИИ НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИИ

Ю.П. Герасименко^{1,2,3}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург; ²Department of Physiology and Biophysics, University of Louisville, Louisville, KY, United States; ³Kentucky Spinal Cord Injury Research Center, Frazier Rehab Institute, Louisville, KY, United States

Регуляция позы и локомоции контролируется спинальными нейронными сетями, продуцирующими соответствующие двигательные паттерны активации моторных пулов.

Нейронные сети непрерывно интерпретируют афферентную активность и регулируют моторный выход для осуществления данной моторной задачи. Это делается автоматически в реальном времени на основе информации от проприо- и кожных рецепторов. Мы показали, что нейронные сети можно нейромодулировать с помощью электрической (инвазивной и неинвазивной) стимуляции спинного мозга. Использование технологии эпидуральной стимуляции спинного мозга в сочетании с локомоторными и поструральными тренировками позволило восстанавливать способность произвольного контроля двигательной активности и инициировать самостоятельную ходьбу у пациентов с полным моторным поражением спинного мозга. Однако существенным ограничением использования эпидуральной стимуляции является необходимость хирургической имплантации электродов на поверхность спинного мозга, что сопряжено с определенным уровнем риска. Нами разработана новая неинвазивная технология мультисегментарной электрической стимуляции спинного мозга, позволяющая одновременно воздействовать на разные нейронные сети и обеспечивать их взаимодействие. Мы показали, что стимуляция локомоторных нейронных сетей в сочетании с пространственно-временной стимуляцией флексорных/экстензорных моторных пулов в определенные фазы шагательного цикла является эффективным методом управления локомоторной активностью. На основании проведенных исследований предложена новая концепция регуляции движений, включающая многоуровневую стимуляцию спинного мозга для обеспечения пострурально-локомоторного взаимодействия в сочетании с адресным пространственно-временным воздействием на моторные пулы и активацией механизмов врожденных синергий. В докладе будут представлены результаты использования данной стратегии для регуляции двигательных функций у пациентов с двигательной патологией различного генеза.

ПЕПТИДНЫЕ И БЕЛКОВЫЕ ТОКСИНЫ И РЕЦЕПТОРЫ: СТРУКТУРА И ПЕРСПЕКТИВЫ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

В.И. Цетлин, И.Е. Кашеверов, И.В. Шелухина, Е.В. Крюкова, Д.С. Кудрявцев, Ю.Н. Уткин

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

Доклад посвящен структурным исследованиям двух классов токсинов и их взаимодействиям с Gys-петельными рецепторами - главным образом никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR) и рецепторами γ -аминомасляной кислоты (GABA-A рецепторами), выполненным в сотрудничестве с отечественными и зарубежными лабораториями (см. обзор [1]). Исторически α -бунгаротоксин из яда змеи *Bungarus multicinctus*, представитель трехпетельных белковых α -нейротоксинов, сыграл ключевую роль в характеристике первого наиболее изученного nAChR мышечного типа из ската *Torpedo californica*. Нами недавно в яде *Bungarus candidus* обнаружен ад-бунгаротоксин, связывающийся более обратимо и различающий 2 центра связывания в этом рецепторе [2]. С помощью комбинации протеомного и транскриптомного подходов впервые показано присутствие трехпетельных токсинов в яде гадюки [3]. Ранее на примере α -кобротоксина из яда *Naja kaouthia* нами впервые показано существование α -нейротоксинов в виде димеров, соединенных межмолекулярными дисульфидами, а для самого α -кобротоксина открыто ингибирование GABA-A рецепторов; сходная способность обнаружена недавно у новых α -нейротоксинов из яда *Naja melanoleuca* [4].

Главными пептидными нейротоксинами в наших исследованиях были α -конотоксины из ядовитых морских моллюсков *Conus*: в совместной работе с голландскими кристаллографами в 2005 году была установлена первая кристаллическая структура α -конотоксина в комплексе с ацетилхолин-связывающим белком (AChBP), моделью лиганд-связывающих доменов (LBD) nAChR и остальных Gys-петельных рецепторов. Недавно вместе с китайскими кристаллографами на основании структуры комплекса AChBP с α -конотоксином LvIA, аланинового сканирования, компьютерного моделирования и мутагенеза β 2-субъединицы nAChR идентифицированы остатки, ответственные за селективность данного токсина к α 3 β 2 nAChR [5]. Вместе с греческими кристаллографами впервые установлена кристаллическая структура комплекса α 9 LBD с α -конотоксином RgIA, селективно ингибирующим α 9- и α 9/ α 10 nAChRs [6]. Наличие в α -конотоксинах значительного числа остатков аргинина стимулировало нас исследовать пептиды, построенные только из остатков аргинина: так был открыт новый класс ингибиторов

nAChRs и показано, что олигоаргинины R8 и R16 имеют высокое сродство к $\alpha 9/\alpha 10$ nAChRs [7], мишеням для разработки анальгетиков. В литературе имеются сведения о подавлении α -конотоксинами злокачественного роста, в том числе и наши данные для карциномы Эрлиха [8]. О возможном медицинском применении пептидов из ядов свидетельствуют и доклинические испытания в качестве миорелаксанта, проведенные на аземиопсине - не содержащем дисульфидов пептиде из яда *Azemiopos feae* [9].

1. Tsetlin VI, Kasheverov IE, Utkin YN. *J. Neurochem.* 2020 Jul 10. doi: 10.1111/jnc.15123.
2. Utkin YN et al. *Biochem J.* 2019; 476(8):1285-1302.
3. Babenko VV et al. *Biomedicines.* 2020; 8(8):249.
4. Son L et al. *Toxins (Basel).* 2021; 13(2):164.
5. Zhu X et al. *J Med Chem.* 2020; 63(22):13656-13668.
6. Zouridakis M et al. *Front Pharmacol.* 2019; 10:474.
7. Lebedev DS et al. *Mol Pharmacol.* 2019; 96(5):664-673.
8. Osipov AV et al. *Mar Drugs.* 2020; 18(4):193.
9. Shelukhina IV et al. *Toxins (Basel).* 2018; 10(1):34

ЧТО ПРОИСХОДИТ СО СВЕРТЫВАНИЕМ КРОВИ ПРИ COVID 19?

Ф. Атауллаханов¹⁻⁵, С. Шахиджанов^{1,2}, Д. Нечипуренко¹⁻³, И. Серебрянский⁶, С. Карамзин⁷, И. Спиридонов⁷, Е. Липец^{1,2}, Д. Затейщиков⁸, М. Пантелеев¹⁻⁴, В. Мустяца¹⁻², Д. Морозова³, Е. Кольцова^{1,2}, Е. Серегина^{1,2}, А. Писарюк⁹, С. Ратчина¹⁰, А. Губкин¹¹, А. Мартьянов¹⁻², Е. Грищук⁵, Д. Проценко⁶, С. Царенко¹², Е. Васильева¹³, А. Румянцев²

¹Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва; ²НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева; ³МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁴Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный; ⁵Университет Пенсильвании в Филадельфии (UPENN), США; ⁶Городская клиническая больница № 40, Москва; ⁷ООО «Гемакор», Москва; ⁸Городская клиническая больница № 51, Москва; ⁹Городская клиническая больница № 64, Москва; ¹⁰Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва; ¹¹Центральная клиническая больница РЖД, Москва; ¹²Городская клиническая больница № 52, Москва; ¹³Городская клиническая больница № 23, Москва

Пандемия коронавирусной инфекции захлестнула Мир и создала гигантские проблемы во всех сферах жизни. Медленная вакцинация и появление новых, более опасных штаммов вируса ставит нас перед проблемой появления штаммов, резистентных к существующим вакцинам, что может растянуть борьбу с заболеванием на многие годы. В этой ситуации особенно важным является увеличение эффективности лечения тяжелых пациентов. Поскольку одной из наиболее опасных проблем лечения являются множественные тромбозы сосудов, мы предприняли исследование динамики изменений гемостаза у пациентов с COVID 19 с целью оценки эффективности гепаринотерапии в снижении риска тромбозов. Исследование проводилось совместно 7 клиниками Москвы и 5 научно-исследовательскими институтами РАН и Минздрава. Более 3000 пациентов были изучены в динамике с помощью современных лабораторных и клинических методов оценки гемостаза.

Результаты. Коронавирусная инфекция мало меняет состояние и число тромбоцитов. Наибольшие изменения были обнаружены в плазменном звене гемостаза. Оказалось, что стандартная коагулограмма не регистрирует эти изменения. Классические тесты АЧТВ, МНО свидетельствовали о гипокоагуляции на протяжении всего лечения в прямом противоречии с клиническими данными. D-димер был сильно повышен у большинства пациентов, но также не изменился во время терапии. Тромбоэластография и тромбодинамика показали гиперкоагуляцию у 60-70% пациентов до лечения. Гепаринотерапия привела к нормализации показаний этих тестов у 70% пациентов. Тем не менее, около 30% пациентов требовали индивидуального подбора дозы гепарина. Из всех исследованных тестов на коагуляцию наиболее чувствительным индикатором состояния гемостаза оказался метод Тромбодинамики. Основываясь на результатах наблюдательного исследования, было решено разбить тяжелых реанимационных пациентов на две группы. В одной терапии гепарином корректировали с помощью тромбодинамики. Тромботические осложнения в этой группе из 210 человек наблюдались у 19% пациентов. В контрольной группе (151 пациент) при стандартной гепаринотерапии без коррекции, тромбозы наблюдались у 32% больных.

Вывод. Нарушения системы свертывания происходят в плазменном звене. Гепаринотерапия эффективно нормализует работу этого звена, но в тяжелых случаях (30%) требуется индивидуальная коррекция дозы гепарина на основе показаний современных тестов.

РЕПОЗИЦИОНИРОВАНИЕ ЛЕКАРСТВ: ШАНСЫ НА УСПЕХ В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ COVID-19?

В.В. Поройков

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Под репозиционированием лекарств понимают выявление новых показаний для разрешенных к медицинскому применению препаратов. Наличие информации о фармакологических и токсикологических характеристиках известного препарата обеспечивает условия для его быстрого применения по новой нозологии. Необходимость оперативного реагирования на пандемию COVID-19 стимулировала масштабные исследования в этом направлении. Поиск в Google Scholar по запросу «COVID-19 AND drug repurposing» дает свыше 25 тысяч документов. Для поиска новых фармакологических эффектов у известных лекарств проводят исследования *in silico* и *in vitro*. Компьютерные оценки получают путем моделирования взаимодействия анализируемых соединений с молекулярными мишенями, идентификацией аналогов на основе структурного сходства, анализом зависимостей «структура-активность», установлением ассоциаций методами сетевой фармакологии [1]. Первоначальный отбор «хитов» проводят с помощью методов *in silico*, которые могут применяться к виртуальным (еще не синтезированным)

молекулам, с последующей экспериментальной валидацией компьютерных предсказаний *in vitro*. Определение антикоронавирусной активности *in vitro* осуществляют с использованием биохимических и клеточных модельных систем [2, 3]. Предварительный отбор потенциально активных соединений на основе оценок *in silico* существенно повышает шансы на успех [4]. В то же время корреляция между данными об активности, полученными с применением различных вычислительных и экспериментальных методик, сравнительно низкая [2, 3, 5]. Более того, пока что нет ни одного репозиционированного препарата, антикоронавирусная активность которого подтверждена в клинике с позиций доказательной медицины.

В докладе обсуждаются возможности и ограничения репозиционирования лекарств в условиях пандемии COVID-19 и пути для снижения опасности новых биогенных угроз в будущем. *Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-60285.*

1. Muratov E.N. et al. *Chem. Soc. Rev.*, 2021. DOI: 10.1039/d0cs01065k.
2. Savosina P.I. et al. *Pharm. Chem. J.*, 2021, **54**, 989.
3. Mslati H. et al. *J. Chem. Inform. Model.*, 2021. Accepted for publication.
4. Gentle F. et al. *ACS Cent. Sci.*, 2020, **6**, 939.
5. Ionov N. et al. *Biomed. Chem. Res. Meth.*, 2020, **3**, e00140.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МОДЕЛИ ПАЦИЕНТА В ЛЕЧЕНИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА

И.В. Маев

Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова МЗ РФ, Москва

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это группа хронических рецидивирующих болезней желудочно-кишечного тракта неясной этиологии, характеризующихся иммуноопосредованным воспалением с развитием местных и системных осложнений. Структура ВЗК представлена двумя нозологическими единицами, различающимися по локализации, клинико-эндоскопической и гистологической картине: болезнью Крона (БК) и язвенным колитом (ЯК). Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что заболеваемость и распространенность ВЗК характеризуется перманентной тенденцией к росту, особенно четко прослеживающейся в странах Западной Европы и Северной Америки. В этих регионах распространенность БК и ЯК составляет от 76 до 335 случаев на 100000 населения, а ежегодная заболеваемость от 4,7 до 18,7 случаев на 100000 населения. Социальная значимость ВЗК подчеркивается тем, что в большинстве случаев поражаются люди трудоспособного возраста. Главной целью лечения ВЗК является индукция и поддержание стойкой ремиссии, а также улучшение качества жизни пациентов. Современные достижения в области изучения этиологии и патогенеза рассматриваемой группы заболеваний с применением омиксных технологий позволили сформулировать концепцию использования молекулярной модели пациента в лечении ВЗК.

ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Устные доклады

ИНГИБИРОВАНИЕ РАЗДЕЛЕНИЯ ФАЗ НАРУШАЕТ ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ХРОМАТИНА

С.В. Ульянов^{1,2}, А.К. Величко^{1,3,4}, М.Д. Магнитов^{1,3,5}, А.В. Лужин^{1,3}, А.К. Голов¹, Н. Овсянникова⁶, И.И. Киреев^{6,7}, А.С. Гавриков⁸, А.С. Мишин⁸, А.К. Гараев¹, А.В. Тяхт^{1,3}, А.А. Гаврилов^{1,3}, О.Л. Кантидзе¹, С.В. Разин¹

¹Институт биологии гена РАН, ²Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Центр высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена РАН; ⁴Институт трансляционной медицины и биотехнологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; ⁵Кафедра биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет); ⁶НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁷Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, ⁸Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Разделение фаз играет роль в пространственной и функциональной сегрегации молекулярных процессов в клеточном ядре. Однако роль этого процесса в установлении и поддержании пространственной организации генома на сегодняшний день ясна не вполне. В данной работе мы использовали микроскопию сверхвысокого разрешения (STORM) и высокопроизводительный метод фиксации конформации хромосом (Hi-C) для исследования изменений в пространственной организации хроматина после обработки клеток 1,6-гександиолом - агентом, супрессирующим разделение фаз. Мы обнаружили, что инкубация клеток с 1,6-гександиолом приводит к увеличению размером нуклеосомных нанодоменов и их более равномерному распределению в пространстве ядра. На масштабах порядка миллиона пар нуклеотидов хроматин претерпевает необратимые изменения структуры, выражающиеся в частичном слиянии А- и В-компарментов. Удаление 1,6-гександиола из среды роста не приводило к восстановлению начальной конфигурации хроматиновой фибриллы, но вело к уплотнению структуры неактивных районов генома. Кроме того, мы обнаружили, что обработка 1,6-гександиолом приводит к ослаблению энхансер-промоторных контактов и сегрегации топологически-ассоциированных доменов, но практически не сказывается на структуре CTCF-зависимых петель. Наши данные свидетельствуют в пользу того, что разделение фаз играет ограниченную роль в пространственной организации хроматина, способствуя его компарментализации.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДИМЕРИЗАЦИИ ZAD-ДОМЕНОВ

А.Н. Бончук¹, К.М. Бойко^{1,2}, А.Ю. Николаева³, В.О. Попов², П.Г. Георгиев¹

¹Институт биологии гена РАН; ²Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН»; ³НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Домен, ассоциированный с цинковыми пальцами (ZAD), – один из основных олигомеризующихся доменов в структуре транскрипционных факторов членистоногих. Для многих ZAD-белков показана способность сближать удаленные участки генома, содержащие сайты связывания данных белков. Очевидно, специфичная димеризация ZAD-доменов является определяющей в данном процессе. Нами было получено несколько структур ZAD: несмотря на очень низкую гомологию, они имеют схожую пространственную организацию, в связи с чем возник вопрос – насколько специфично взаимодействие между этими доменами. Были выявлены кластеры доменов со сравнительно высокой гомологией, являющиеся результатами дубликации генов соответствующих белков. ZAD-домены из 10 различных кластеров были попарно протестированы на способность к гетеродимеризации. Было выяснено, что в большинстве кластеров с уровнем гомологии между доменами более 45% сохраняется способность к гетеродимеризации. Всего у 16 ZAD из 98 была обнаружена способность к гетеродимеризации. На основе анализа кристаллических структур гетеродимеризующихся (CG15073 и Grauzone) и гомодимеризующихся (CG2712 и Zw5) паралогов было установлено, что специфичность взаимодействия определяется, по всей видимости, тем, что формирование гомодимера энергетически более выгодно, по сравнению с гетеродимером. Данное предположение было подтверждено при помощи мутагенеза, направленного на снижение энергетической эффективности формирования гомодимера. Другой пример специализации ZAD-белков после дубликации представляет собой кластер M1BP-CG9793-CG8159-CG8145-CG11762. По нашим данным, представители данного кластера способны избирательно гетеродимеризоваться. Анализ пространственной структуры ZAD белка M1BP подтвердил, что гетеродимеризация возможна при условии, что формирование гомодимера не является существенно более выгодным, чем формирование гетеродимера. Формирование гетеродимеров между ZAD-белками из различных кластеров невозможно уже в силу стерических ограничений. Таким образом, ZAD-домен является уникальной платформой для быстрого формирования высокоспецифичных белок-белковых комплексов в процессе эволюции новых видов и их эффективного приспособления к среде обитания. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10099).

ВЛИЯНИЕ ГЕНОМНЫХ G4 НА УКЛАДКУ ХРОМАТИНА

Ю.И. Павлова, А.Н. Богомазова, П.О. Тихонова, В.Б. Цветков, Т.С. Ведехина, К.М. Климина, Е.А. Исаакова, М.А. Лагарькова, Г.Е. Позмогова, А.М. Варижук

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

В данной работе мы исследуем взаимодействие геномных G-квадруплексов (G4) с белковыми факторами, влияющими на формирование хроматиновых петель и топологически ассоциированных доменов (ТАД). Цель данной работы – поиск подходов к управлению 3D-структурой хроматина за счет действия на G4 низкомолекулярными лигандами для регуляции генной экспрессии. Одной из предпосылок к данной работе было выполненное нашей группой ранее профилирование на микроципах,

которое показало сродство ряда белков, в том числе HMG-белков (англ., high-mobility group) и ASXL1 (англ., additional sex combs-like 1), к G4. Кроме этих белков мы рассматривали CTCF (СССТ-связывающий фактор), определяющий границы ТАД. Используя опубликованные данные ChIP-seq для белков HMG1, HMG3, ASXL1 и CTCF, мы доказали, что эти белки статистически достоверно колокализуются с G4, и отобрали мотивы для экспериментальной проверки *in vitro*. Методом микро-масштабного термофореза мы показали аффинность G4 к CTCF, HMG1, HMG3 и HMG2, причем константы связывания находятся в микромолярном диапазоне. Также был выполнен докинг G4 из промотора онкогена c-MYC на CTCF, и было показано, что связывание CTCF-G4 происходит с участием тех же доменов CTCF, что и при связывании с дуплексом. На примере нескольких G4-мишеней HMG2, HMG1, HMG3, CTCF мы оценили влияние известных G4-стабилизирующих лигандов на стабильность отобранных G4: при концентрации PDS 5 мкМ и концентрации PhenDC3 и 1 мкМ заметен G4-стабилизирующий эффект. Затем, используя антитела к CTCF, мы выполнили иммунопреципитацию хроматина клеток K562, обработанных G4-стабилизирующим лигандом, чтобы оценить влияние лиганда на CTCF. Далее с помощью количественной ПЦР мы показали, что при 48-часовой обработке G4-стабилизирующим лигандом количество CTCF на G4-сайтах возрастало в 2-3 раза по сравнению с клетками, не подвергшимися обработке. Таким образом, мы показали, что G4 участвуют в организации укладки хроматина за счет связывания с белковыми факторами HMG1, HMG3, ASXL1, CTCF, и лиганды к G4 могут использоваться в качестве эпигенетических терапевтических агентов. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ [19-15-00128].*

СТРУКТУРНАЯ ДИНАМИКА ШАПЕРОНА ГИСТОНОВ FACT

О.И. Волох¹, А.Л. Сивкина¹, М.Г. Карлова¹, Е. Котова², В.М. Студитский^{1,2}, О.С. Соколова¹

¹Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²Fox Chase Центр рака, Филадельфия, США

Многофункциональный шаперон гистонов FACT участвует в разборке и повторной сборке нуклеосом во время транскрипции, репликации и репарации ДНК и имеет консервативную структуру. Человеческий FACT (hFACT) представляет собой гетеродимер субъединиц SPT16 и SSRP1, который умеренно стабилизирует нуклеосомы. В данной работе структура FACT человека исследовалась методом электронной микроскопии негативного контрастирования. Был выявлен набор конформационных состояний и выдвинута гипотеза, описывающая структурную динамику человеческого FACT. Было показано, что свободный от нуклеосом hFACT представляет собой динамическую структуру: несколько состояний отражают ее конформационную подвижность. «Закрытый» комплекс характеризуется четырьмя компактно-организованными электронными плотностями. «Промежуточное» состояние hFACT представлено комплексами, состоящими из трех доменов, имеющими компактную структуру и подвижный четвертый домен. Комплекс в «открытом» состоянии представлен тремя доменами, образующими почти линейную структуру. На основании результатов была предложена модель конформационной подвижности человеческого FACT. Видимые домены hFACT связаны друг с другом посредством линкеров разной длины, а димеризационные домены SPT16 и SSRP1 (DD) образуют гибкое соединение между двумя субъединицами. В «закрытом» состоянии ДНК-связывающая поверхность FACT окружена двумя С-концевыми и серединными доменами (MD). Выдвигается гипотеза, что при переходе в «открытое» состояние N-концевой домен субъединицы FACT SPT16 (NTD) удаляется от других доменов, что приводит к образованию промежуточного состояния с плохо разрешенным или не разрешенным доменом NTD, в то время как DD и MD сохраняют компактную структуру, а сайт связывания ДНК по-прежнему защищен CTD. В «открытом» состоянии видимые MD и DD домены субъединиц FACT SPT16 / SSRP1 образуют почти линейную структуру, открывая сайты связывания ДНК и делая их доступными для взаимодействия с нуклеосомой. *Работа поддержана Российским научным фондом (№ 19-74-30003). Электронная микроскопия выполнена на Уникальной установке «3D-EMC» МГУ.*

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НУКЛЕОСОМ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ МЕТОДОМ SPFRET-МИКРОСКОПИИ

А.В. Феофанов^{1,2}, Н.В. Малюченко¹, М.Е. Валиева¹, А.Л. Сивкина¹, Н.С. Герасимова¹, А.Н. Коровина¹, В.М. Студитский^{1,3}, М.П. Кирпичников^{1,2}

¹Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ³Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA

Механизмы действия многих противоопухолевых соединений опосредованы их взаимодействиями с ДНК и (или) ДНК-белковыми комплексами, которые реализуются в том числе и на уровне нуклеосом. Флуоресцентная микроскопия одиночных частиц на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (spFRET-микроскопия) предоставляет уникальную возможность исследования таких взаимодействий, изучения изменений структуры нуклеосомной ДНК и функционирования белковых факторов при образовании данных комплексов. Анализ, проводимый на уровне одиночных флуоресцентно-меченых нуклеосом, дает возможность обнаружить и охарактеризовать отличающиеся по структуре комплексы, одновременно присутствующие в реакционной смеси. Локализовать структурные изменения и оценить их масштаб позволяет введение донор-акцепторной пары флуорофоров в различные участки нуклеосомы.

Методом spFRET-микроскопии установлено, что при взаимодействии с противоопухолевым соединением госсиполом происходит откручивание нуклеосомной ДНК от октамера гистонов, которое при значительном увеличении его концентрации приводит к диссоциации гистонов и ДНК. Обнаружено, что поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP1), образуя комплекс с нуклеосомой, изменяет укладку нуклеосомной ДНК, а соединение 7-метил-гуанин не только ингибирует этот фермент, но и облегчает образование комплекса, а также вызывает арест комплекса, стабилизируя при этом структурные изменения в нуклеосоме. Взаимодействие с кураксином изменяет структуру нуклеосомы, опосредует связывание белкового комплекса FACT и облегчает FACT-индуцированное масштабное обратимое раскручивание нуклеосомы.

Авторы благодарят за поддержку Российский научный фонд (грант №19-74-30003).

КОМБИНАЦИЯ ИММУНОПРЕЦИПАТАЦИИ ХРОМАТИНА И РНК–ДНК ЛИГИРОВАНИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С УЧАСТКАМИ ГЕНОМА, ОККУПИРОВАННЫМИ БЕЛКОМ ИНТЕРЕСА

А.А. Гаврилов¹, Р.И. Султанов², А.А. Галицына^{1,3}, М.Д. Магнитов¹, С.В. Разин^{1,4}

¹Институт биологии гена РАН; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Сколковский институт науки и технологий; ⁴Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Большая часть эукариотического генома транскрибируется с образованием кодирующих и некодирующих РНК. Некодирующие РНК выполняют различные функции как в цитоплазме, так и клеточном ядре. Локализованные в ядре некодирующие РНК привлекаются к различным участкам генома и опосредуют активацию либо, наоборот, репрессию транскрипции расположенных в этих участках генов. Хроматин-ассоциированные РНК принимают участие в пространственной организации генома. В частности, предложена роль РНК в коммуникации промоторов и энхансеров, формировании петель ДНК и пространственных компартментов генома. Ранее мы разработали экспериментальный протокол, позволяющий картировать места взаимодействия различных РНК с хроматиновой фибриллой в масштабе всего генома. Метод, названный Red-C, основан на лигировании фрагментов РНК и ДНК в ядрах фиксированных клеток с последующим анализом РНК–ДНК химерных молекул с помощью секвенирования. С использованием метода Red-C мы охарактеризовали РНК–ДНК интерактом клеточных линий человека и идентифицировали хроматин-ассоциированные РНК, которые могут играть роль в регуляции транскрипции. В настоящей работе мы скомбинировали протокол Red-C с методом иммунопреципитации хроматина с целью исследовать РНК–ДНК взаимодействия, опосредованные определенным белком. С использованием антител к белку EZH2, субъединице репрессорного комплекса Polycomb, мы идентифицировали некодирующие РНК, локализованные на участках факультативного гетерохроматина в эмбриональных стволовых клетках человека. Показано, что участки генома, репрессированные комплексом Polycomb, обогащены некодирующими РНК, синтезирующимися в окрестных областях генома. В списке идентифицированных РНК – хорошо известные регуляторные РНК, такие как Kspq1ot1 и антисмысловые РНК, продуцирующиеся в локусах генов Нох. Полученные нами данные подтверждают важную роль некодирующих РНК в организации факультативного гетерохроматина. В параллельном исследовании мы использовали антитела к белку CTCF и осуществили поиск некодирующих РНК, ассоциированных с CTCF-связывающими участками генома в клетках K562. Разработанный нами экспериментальный протокол может быть использован для идентификации некодирующих РНК в сайтах связывания с геномом любых белков, представляющих интерес. *Работа поддержана грантом РФФ 21-64-00001.*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ХРОСОМНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ

Р. Капуа^{1,2}, А. Шмакова^{1,3}, А. Карпухина^{1,4}, Д. Жермини¹, Е. Васецкий^{1,4}

¹UMR 9018, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris Saclay, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ²Institute of Human Genetics, National Institutes of Health, University of the Philippines Manila, Philippines; ³Лаборатория молекулярной эндокринологии, Институт экспериментальной кардиологии, НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва; ⁴Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Большинство хромосомных транслокаций, связанных с раком, специфичны для определенного типа клеток. Это может быть связано либо с разной вероятностью возникновения спонтанных транслокаций между различными локусами, либо с посттранслокационным отбором транслокаций, которые дают клетке адаптивные преимущества (ускоренный рост, устойчивость к апоптозу и т.д.). Мы экспериментально ответили на этот вопрос путем одновременной индукции двухцепочечных разрывов в нескольких локусах в одной и той же клетке для создания хромосомных транслокаций. Относительная частота генерируемых хромосомных транслокаций в различных типах клеток затем была соотнесена с радиальным положением локусов в ядре, их пространственной близостью, транскрипционной активностью и доступностью хроматина локусов до и после индукции двухцепочечных разрывов. Только пространственная близость между генными локусами после индукции двухцепочечных разрывов коррелировала с частотой транслокаций, что подтверждает модель "breakage first". Более того, долгосрочная культура клеток с генерированными хромосомными транслокациями показала различную выживаемость в разных типах клеток, что предполагает, что хромосомные транслокации возникают в результате комбинации первоначальных случайных событий транслокации и последующего отбора. В целом, полученные результаты показывают, что хромосомная транслокация может возникнуть после индукции двухцепочечных разрывов в любом типе клеток, но сохранится ли клетка с транслокацией, зависит от селективного преимущества, которое дает клетке хромосомная транслокация. *Данное исследование было поддержано государственной программой фундаментальных исследований ИБР РАН 0088-2021-0007.*

МЕХАНИЗМЫ ДНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ У ПРОКАРИОТ

А.В. Кузьменко^{1,2*}, А.Д. Огиенко¹, Д.А. Юдин¹, А.А. Агапов¹, А.В. Олина¹, Е.В. Кропачева¹, Л.А. Лисицкая¹, С.С. Рязанский¹, А.Г. Кудинова¹, О.А. Маслова¹, М.А. Петрова¹, А.А. Аравин^{1,2}, Д.М. Есюнина¹, А.В. Кульбачинский¹

¹Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ²Калифорнийский технологический институт, Пасадена, США

Белки-Аргонавты являются главными компонентами защитных систем эукариот и прокариот, нацеленных на чужеродные нуклеиновые кислоты. В то время как механизмы действия эукариотических систем РНК-интерференции хорошо изучены, о том, как функционируют данные системы у прокариот, известно очень мало. Нами исследованы бактериальные белки-Аргонавты, которые являются ДНК-зависимыми ДНК-нуклеазами, то есть, способны узнавать и расщеплять ДНК-мишени с помощью комплементарных им коротких гидовых ДНК. На примере нескольких таких белков показано, что при их экспрессии в бактериальных клетках они загружаются гидовыми ДНК, происходящими из участков терминации репликации, а также многокопийных генетических элементов, включая плазмиды и повторяющиеся участки генома. Предпочтение к участкам терминации указывает на роль белков-Аргонавтов в репликации ДНК и разделении хромосом в клетке. Предпочтение к повторяю-

щимся последовательностям является результатом ДНК-интерференции, в ходе которой происходит расщепление гомологичных участков ДНК с участием белков-Аргонавтов и соответствующих гидовых ДНК. Аргонавты также напрямую атакуют двуниевые разрывы в ДНК, приводя к деградации таких участков. Процессинг двуниевых разрывов белками-Аргонавтами осуществляется совместно с клеточной системой рекомбинации RecBCD, что позволяет различить свою и чужеродную ДНК за счет наличия в ней хи-сайтов, специфичных для геномной ДНК. В результате белки-Аргонавты оказываются способны вызывать элиминацию плазмид, а также защищать клетки от инфекции бактериофагами. Геномы прокариот, кодирующие белки-Аргонавты, обогащены системами CRISPR-Cas, причем известно, что эти системы могут использовать аналогичные механизмы для первоначального процессинга чужеродной ДНК в процессе адаптации. Таким образом, различные защитные системы клетки используют общие принципы для узнавания чужеродных генетических элементов и могут кооперировать друг с другом в ходе борьбы с чужеродной ДНК. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-29-07086 и гранта РНФ 19-14-00359.*

SETDB1 FUELS THE CANCER PHENOTYPE BY MODULATING EPIGENOME, 3D GENOME ORGANIZATION, AND CHROMATIN MECHANICAL PROPERTIES (SETDB1 СПОСОБСТВУЕТ ПРОГРЕССИИ РАКА ПУТЕМ ИЗМЕНЕНИЯ ЭПИГЕНОМА, ТРЕХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХРОМАТИНА)

Vlada V. Zakharova¹, Mikhail D. Magnitov², Laurence Del-Maestro¹, Sergey V. Ulianov^{2,3}, Alexandros Glentis⁴, Burhan Ulyanik⁵, Alice Williart⁶, Anna Karpukhina^{7,8}, Oleg Demidov⁵, Veronique Joliot¹, Yegor S. Vassetzky^{7,8}, René-Marc Mège⁴, Matthieu Piel⁶, Sergey V. Razin^{2,3} and Slimane Ait-Si-Ali¹

¹Epigenetics and Cell Fate (EDC) Department, UMR7216, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Paris, Université Paris Diderot, F-75013, Paris, France; ²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Science, Moscow, Russia; ³Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; ⁴Institute Jacques Monod, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Paris, Université Paris Diderot, Paris, France; ⁵INSERM UMR1231, Faculté de Médecine, Dijon, France; ⁶Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR 144, Paris, France; ⁷UMR9018, CNRS, Université Paris-Sud Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, France

Imbalance in the finely orchestrated system of chromatin-modifying enzymes is a hallmark of many pathologies such as cancers, since leading to the affection of the epigenome and transcriptional reprogramming. Here, we demonstrate that a loss-of-function mutation (LOF) of the major histone lysine methyltransferases SETDB1 possessing oncogenic activity in lung cancer cells leads to broad changes in the overall architecture and mechanical properties of the nucleus through redistribution of heterochromatin genome-wide, which perturbs chromatin spatial compartmentalization. Together with the enforced activation of the epithelial expression program, cytoskeleton remodeling, reduced proliferation rate, and restricted cellular migration, this leads to the reversed oncogenic potential of lung adenocarcinoma cells. These results emphasize an essential role of chromatin architecture in the determination of oncogenic programs and illustrate a relationship between gene expression, epigenome, 3D genome, and nuclear mechanics.

КОНФОРМАЦИОННАЯ ДИНАМИКА ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ, КАК ОСНОВА СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК

А.А. Кузнецова, Д.А. Давлетгильдеева, О.С. Федорова, Н.А. Кузнецов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Модифицированные азотистые основания удаляются по пути эксцизионной репарации оснований (BER). Процесс BER начинается с действия ДНК-гликозилаз, которые находят поврежденные основания в геномной ДНК среди десятков миллионов неповрежденных оснований и катализируют их удаление путем гидролиза N-гликозидной связи между гетероциклом и C1'-атомом остатка 2'-дезоксирибозы. В клетках человека 11 различных ДНК-гликозилаз постоянно и независимо участвуют в поиске и удалении окисленных, алкилированных или неканонических оснований. Образовавшийся в результате N-гликозидной реакции апуриновый/апириmidиновый (AP) сайт далее подвергается превращению либо за счет AP-лиазной активности бифункциональных ДНК-гликозилаз, либо под действием AP-эндонуклеаз. Несмотря на то, что основной биологической функцией AP-эндонуклеаз является гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от AP-сайтов, было показано, что фермент способен гидролизовать фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от некоторых поврежденных нуклеотидов, таких как альфа-аномеры природных нуклеотидов, этено и бензотено производных азотистых оснований и некоторых поврежденных пиримидиновых оснований. Кроме того, AP-эндонуклеазы обладают 3'-5' экзонуклеазной активностью, что приводит к последовательному удалению природных немодифицированных 3'-концевых нуклеотидов. Анализ субстратной специфичности всех ферментов начальных стадий BER приводит к вопросу, каким образом активный центр данных ферментов осуществляет контроль субстратной специфичности. Интенсивное изучение кинетических механизмов конформационных перестроек ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеаз и их модельных ДНК-субстратов в процессах узнавания поврежденного нуклеотида, образования каталитического комплекса и катализа позволило предложить обобщенную модель узнавания повреждений, которая обеспечивает высокую субстратную специфичность практически всех ферментов репарации, узнающих поврежденные нуклеотиды в ДНК. Эта модель включает несколько ключевых стадий: 1) изгиб поврежденной ДНК, 2) выворачивание поврежденного нуклеотида из двойной спирали в активный центр и 3) верификацию поврежденного основания в активном центре фермента путем образования специфических контактов. *Работа поддержана грантом РНФ № 19-74-10034.*

РЕПЛИКАТИВНЫЙ СТРЕСС В ЯДРЫШКЕ

А.К. Величко, Н.В. Петрова, А.В. Лужин, О.Л. Кантидзе

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Репликативный стресс является одним из основных источников нестабильности генома. Хотя клеточный ответ на репликативный стресс достаточно хорошо изучен, практически ничего не известно о механизмах репликативного стресса в ядрышке/рибосомных генах (рДНК). В этой работе, мы исследовали молекулярные механизмы, участвующие в защите клетки от репликативного стресса, индуцированного в рДНК (ядрышке) высших эукариот. Хотя клеточный ответ на ядрышковый репликативный стресс имеет много общих черт с классическим ответом на такой стресс, возникающий в других областях генома, он, тем не менее, обладает и уникальными характеристиками. К наиболее важным из них стоит отнести зависимость клеточного ответа на ядрышковый репликативный стресс от белка Treacle и образование крупных фокусов Treacle–TOPBP1. Наши данные демонстрируют важность макромолекулярных агрегатов Treacle–TOPBP1 в качестве платформы, которая обеспечивает рекрутирование в ядрышки факторов клеточного ответа на стресс, усиление активации АTR-зависимых сигнальных каскадов и ограничение, тем самым, нестабильности генома. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 21-64-00001).*

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ОСОБЕННОСТЯМИ ИНИЦИИИ РЕПЛИКАЦИИ И ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Т.Д. Колесникова^{1,2}, В.В. Довгань², Г.В. Похолкова¹, Ф. Шуберт³

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск; ³Институт генетики растений и исследований сельскохозяйственных культур им. Лейбница, Гатерслебен, Германия

На уровне протяженных хроматиновых доменов пространственно-временная организация репликации очень точно воспроизводится в клеточных поколениях, но внутри таких доменов выбор ориджинов носит вероятностный характер, и в каждом клеточном цикле активируются разные ориджины. Ориджины могут существенно отличаться по эффективности инициации репликации, но описанные в литературе методические подходы для изучения этого явления очень трудоемки. Используя микроскопию сверхвысокого разрешения со структурированным освещением 3D-SIM, мы обнаружили, что в политенных хромосомах хорошо визуализируются и локусы высоко эффективной ранней инициации репликации, и протяженные зоны, где инициация репликации происходит с низкой эффективностью. Оказалось, что разные нити политенной хромосомы иницируют репликацию асинхронно во времени и в пространстве. Таким образом, мы показали, что политенная хромосома является интересным инструментом для анализа вероятностной природы инициации репликации. Мы предположили, что локусы ранней эффективной инициации репликации связаны с генами, транскрибируемыми на высоком уровне. Для проверки этой гипотезы мы разработали подход для одновременной детекции ранней инициации репликации и активной транскрипции в политенных хромосомах слюнных желез, основанный на индукции эктопической S-фазы у личинок генотипа hsp70-CycE (Knoblich et al., 1994), с последующим импульсным включением модифицированного нуклеотида EdU в изолированные слюнные железы и иммунолокализации антител к активным формам РНК-полимеразы II. Оказалось, что в политенных хромосомах есть сайты, где активная транскрипция и эффективная репликация тесно сближены, что косвенно указывает на взаимосвязь этих процессов, но есть множество сайтов, где выявляется только активная транскрипция или только эффективная ранняя инициация репликации. На примере района 3C мы продемонстрировали, что сайт активной транскрипции может оказывать влияние на эффективную инициацию репликации, но это влияние может быть разнесено по времени. *Работа подержана совместным русско-немецким грантом РФФИ № 20-54-12016.*

НЕКАНОНИЧЕСКАЯ ГЕНОМНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ У ТРЕХ ВИДОВ МАКРОСТОМИД

Н.Б. Рубцов, К.С. Задесенец, Н.И. Ершов, Д.Ю. Ощепков

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Кариотипирование и последующий молекулярно-цитогенетический анализ видов рода *Macrostomum* выявил три вида, у которых относительно недавно имела место полногеномная дупликация (ПГД). Филогенетический анализ этого рода позволяет предположить, что имели места два независимых события удвоения генома предковых геномов. Дальнейшая геномная эволюция в возникших филогенетических линиях имела как общие черты, так и существенные отличия. В обеих линиях после ПГД произошли интенсивные хромосомные перестройки, приведшие к слиянию всех хромосом одного из предковых кариотипов в одну большую хромосому. Более того, у двух видов (*M. janickei* и *M. mirumnovem*) произошло удвоение числа копий этой крупной хромосомы, а у *M. lignano* тенденция к увеличению числа ее копий наблюдалась в инбредных лабораторных линиях, что позволило получить сублинию с удвоенным числом копий крупной хромосомы. Если хромосомный состав в одной филогенетической линии (*M. janickei* и *M. lignano*) был относительно стабильный, то в другой (*M. mirumnovem*), вероятно, произошла активация мобильных элементов, имевшая место в копиях крупных хромосом, которая привела к их значительной дивергенции, обусловленной возникновением районов, обогащенных повторыми последовательностями, и потерей различных эухроматиновых участков крупных хромосом. Возникновение и увеличение числа В-хромосом у *M. mirumnovem*, вероятно, стало еще одним следствием активации мобильных элементов. Для детального анализа генома у видов, в эволюции которых имела место недавняя ПГД получены и секвенированы микродиссекционные ДНК-библиотеки всех хромосом *M. lignano*, В-хромосомы *M. mirumnovem*. Получены и секвенированы геномы и транскриптомы сублиний *M. lignano*, имеющих как нормальное, так и удвоенное число копий крупных хромосом. Проведен подробный анализ результатов секвенирования генома *M. lignano*, результаты которого указывают на наличие в геноме этого скрытого тетраплоида трех субгеномов. Обсуждаются вопросы формирования и поддержания высокого уровня генетического разнообразия в геноме *M. lignano*, предложены новые гипотетические механизмы возникновения и поддержания генома *M. lignano*, *M. janickei* и *M. mirumnovem*.

включающие частичную или полную генетическую изоляцию копий крупных хромосом этих видов. *Работа поддержана грантом РФФ 19-14-00211.*

МОЛЕКУЛЯРНАЯ КОЭВОЛЮЦИЯ СИГНАЛОВ ЯДЕРНОЙ И ЯДРЫШКОВОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ В СОСТАВЕ ОСНОВНОГО ДОМЕНА Tat БЕЛКА ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

М.А. Курнаева¹, А.О. Залевский^{1,2}, Е.А. Арифалин³, О.М. Лисицына³, А.В. Творогова³, М.Ю. Шубина³, Г.П. Буренков⁴, Я.Р. Мусинова^{3,5}, А.В. Головин^{1,2}, Е.С. Васецкий^{5,6}, Е.В. Шеваль^{1,3,7}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ³Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁴Европейская лаборатория молекулярной биологии, Гамбург, Германия; ⁵Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва; ⁶CNRS, UMR 9018, Институт Густава Русси, Вильгельмф, Франция; ⁷Кафедра клеточной биологии и гистологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Появление эукариотических клеток в ходе эволюции сопровождалось формированием эффективного барьера между геномом (ядром) и окружающей цитоплазмой, а также формированием многочисленных безмембранных структур (ядрышек и т.д.) внутри ядра. Современные вирусы хорошо адаптированы к сложной организации эукариотической клетки. Так, многие вирусные белки обладают сигналами ядерной локализации (NLS) и сигналами ядрышковой локализации (NoLS), что позволяет им накапливаться в ядре или ядрышках. Поскольку вирусные белки относительно малы и их размер ограничен объемом вирусного капсида, приобретение новых последовательностей является более сложной задачей для вирусов, чем для эукариот. Для выяснения механизмов возникновения сигнальных последовательностей в вирусных белках мы проанализировали основной домен Tat белка вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1). Основной домен Tat белка ВИЧ-1 участвует в реализации нескольких функций, наиболее важной из которых является активация вирусной транскрипции. Основной домен функционирует в качестве NLS, хотя он значительно длиннее, чем типичный NLS. Результаты мутагенеза и молекулярного докинга свидетельствуют о том, что различные области основного домена могут функционировать в качестве NLS. Кроме того, высокий положительный чистый заряд неизбежно заставляет основной домен электростатически взаимодействовать с компонентами ядрышка, т.е. функционировать в качестве NoLS. Интеграция NLSs и NoLSs в функциональные домены, обогащенные положительно заряженными аминокислотами, может быть механизмом, который позволяет концентрировать различные функции в небольших белковых областях и, в результате, уменьшать размер белка, влияя на происхождение и эволюцию NLS и NoLS у вирусов. *Выполнено при поддержке гранта РФФ 21-74-20134.*

RHF10 СУБЪЕДИНИЦА РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ХРОМАТИН КОМПЛЕКСА RBAF ОПОСРЕДУЕТ MYC-ЗАВИСИМУЮ АКТИВАЦИЮ ТРАНСКРИПЦИИ

Н.В. Сошникова¹, Е.В. Татарский¹, В.В. Татарский¹, Н.С. Клименко², С.Г. Георгиева³

¹Институт биологии гена РАН; ²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена РАН; ³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Ремоделирующий хроматин комплекс RBAF, входящий в семейство SWI/SNF ремоделеров, играет важную роль в регуляции транскрипции. При анализе клинических образцов меланомы, мы выявили корреляцию между прогрессированием меланомы и уровнем экспрессии одной из субъединиц RBAF комплекса – RHF10. В клетках меланомы RHF10 взаимодействует с онкогеном MYC и способствует привлечению RBAF комплекса на промоторы целевых генов, таким образом, положительно влияя на MYC-зависимую активацию генов, связанных с прогрессией клеточного цикла. Недостаток RHF10 и MYC приводит к накоплению клеток в G1 стадии клеточного цикла и развитию фенотипа старения (senescence). Мы также показали, что MYC связывается с регуляторными областями в районе промотора RHF10 и активирует экспрессию DPF-содержащей изоформы RHF10 (RHF10-P). Напрямую MYC взаимодействует со всеми изоформами RHF10, однако только DPF-содержащие изоформы являются сильными коактиваторами MYC-зависимой транскрипции и привлекаются на промоторы вместе с MYC. Также мы показали, что удаление DPF-доменов лишает изоформы RHF10-P возможности рекрутироваться на промоторы в процессе активации. Наши данные показывают важную роль RHF10 в онкогенезе и выявляют новую связь между ремоделированием хроматина RBAF комплексом и MYC-зависимой транскрипцией генов.

Данная работа была поддержана Российским научным фондом (№ 21-14-00258).

СПОСОБНЫ ЛИ Y-БОКС СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗАМЕНЯТЬ ДРУГ ДРУГА В КЛЕТКАХ?

Д.Н. Лябин, И.А. Елисева, И.В. Кулаковский, Е.А. Смолин, К.С. Будкина, Л.П. Овчинников

Институт белка РАН, Пуццоно, Россия

Y-бокс-связывающие белки принадлежат семейству белков, содержащих эволюционно консервативный домен холодного шока. Эти белки выполняют в организме разнообразные жизненно важные функции, среди них регуляция пролиферации и дифференцировки клеток, ответ на стрессовые воздействия. Предполагается, что Y-бокс-связывающие белки регулируют экспрессию многих генов практически на всех возможных этапах экспрессии генетической информации. Однако на настоящий момент весь спектр генов, контролируемых Y-бокс-связывающими белками, не установлен. Также достоверно не определено, на каких именно этапах экспрессии генов такой контроль осуществляется. И самое важное – до сих пор не установлено, способны ли Y-бокс-связывающие белки функционально заменять друг друга. В данной работе мы с помощью технологий высокопроизводительного секвенирования мы определили изменения в транскрипции, трансляции и стабильности всех клеточных мРНК при полном подавлении синтеза в клетке одного (YB-1 или YB-3) или двух Y-бокс-связывающих белков (YB-1 и YB-3). Для всех клеточных линий, экспрессирующих один из или оба Y-бокс-связывающих белка, характерны небольшие по ам-

плитуде изменения относительно клеток, не экспрессирующих YB-белки, как в транскриптом, так и в эффективности трансляции. При этом количество значимо изменившихся генов значительно выше для изменения в РНК (около 4000 по РНК против 500 по эффективности трансляции). Изменения в эффективности трансляции при экспрессии Y-бокс-связывающих белков хорошо согласуются между всеми тремя клеточными линиями (НЕК293ТΔΔ+YB-1, НЕК293ТΔΔ+YB-3, НЕК293ТΔΔ+YB-1+YB-3 относительно НЕК293ТΔΔ), что может говорить о том, что белки YB-1 и YB-3 могут функционально заменять друг друга в регуляции трансляции довольно большого набора генов (более 500). В отличие от изменений в эффективности трансляции, изменения в РНК значительно различаются между клетками. Изменения в количестве РНК при экспрессии YB-1 или YB-3 слабо положительно коррелируют и лишь около 20% значимо изменившихся генов, общие для обеих клеточных линий. Возможно, для этого набора РНК YB-1 и YB-3 могут функционально заменять друг друга. Кроме того, удалось выяснить, что Y-бокс-связывающие белки участвуют как в стабилизации, так и дестабилизации определенных наборов мРНК в клетке.

ОГРАНИЧЕНИЕ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ КАК СПОСОБ КОНТРОЛЯ РАБОТЫ ЭКДИЗОН-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ В РАЗВИТИИ ДРОЗОФИЛЫ

М.Ю. Мазина, Е.В. Коваленко, Н.Е. Воробьева

Группа динамики транскрипционных комплексов, Институт биологии гена РАН, Москва

Механизмы, управляющие активацией транскрипции генов в развитии организма все еще остаются недостаточно исследованными. Конечная цель работы нашего научного коллектива - создание экспериментально обоснованных моделей различных механизмов регуляции транскрипции. К таким механизмам относится распространенный у многоклеточных механизм подавления элонгации транскрипции. Ранее, в культуре клеток дрозофилы S2 мы детально исследовали механизмы активации транскрипции генов развития, индуцируемых 20-гидроксиэкдизоном (экдизоном). Мы обнаружили, что активация транскрипции данных генов в клеточной культуре под действием гормона происходит путем стимуляции процессов элонгации транскрипции (выхода из состояния «паузы» РНК полимеразы II). В настоящей работе мы решили исследовать, каким образом регулируется транскрипция данной группы генов на разных стадиях развития дрозофилы. Для этого мы провели ChIPSeq анализ различных форм РНК полимеразы II на разных стадиях развития: эмбрионы (2–4 ч, 6–8 ч и 10–12 ч), личинки L3, а также предкуколки (0 ч и 10 ч после начала окукливания). Мы обнаружили, что первый раунд активации транскрипции экдизон-зависимых генов в эмбриогенезе дрозофилы реализуется путем стимуляции рекрутирования РНК полимеразы II. Мы наблюдали значимый рост уровня связывания всех исследуемых форм РНК полимеразы с промоторами экдизон-зависимых генов параллельно с активацией их транскрипции. Однако, мы обнаружили, что активация транскрипции экдизон-зависимых генов во время формирования предкуколки происходит по альтернативному механизму регуляции транскрипции. Мы показали, что активация и репрессия транскрипции экдизон-зависимых генов в ходе метаморфоза происходит без изменения уровня связывания промоторов данных генов тотальной РНК полимеразой II. То есть, регулируется на уровне элонгации транскрипции. Для получения более детальной картины механизмов активации транскрипции нами были также выполнены ChIPSeq эксперименты субъединиц DSIF и NELF комплексов паузинга, а также белков Brd4 и PAF1, вовлеченных в стимуляцию элонгации транскрипции. Мы полагаем, что изменение типа регуляции транскрипции экдизон-зависимых генов на стадии метаморфоза связано с присутствием на промоторах данных генов NELF и Brd4 регуляторов.

МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MTS1338 И MTS0997 МОДУЛИРУЮТ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ИНФЕКЦИИ МАКРОФАГОВ

А.С. Григоров¹, Е.Г. Салина², О.С. Быченко¹, Ю.В. Скворцова¹, А.А. Острик², Е.В. Свирцевская¹, А.С. Капрельянц², Т.Л. Ажикина¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН», Москва

Туберкулез можно рассматривать как нарушение взаимодействия патоген-хозяин, вызывающее сдвиг равновесия между иммунитетом хозяина и ростом бактерий *Mycobacterium tuberculosis*. Микобактерии активно подавляют иммунный ответ, экспрессируя специфические факторы и регуляторы, что способствует прогрессии заболевания. Малые некодирующие РНК бактерий являются именно такими регуляторами, активируясь при попадании бактерий в агрессивную внутриклеточную среду, модулируя широкий спектр физиологических ответов и регулируя ключевые этапы жизнедеятельности у целого ряда возбудителей заболеваний. Нами проведено комплексное исследование малых бактериальных РНК MTS1338 и MTS0997 в патогенезе туберкулеза, для чего были созданы мутантные штаммы с делетированными генами этих малых РНК и охарактеризованы при росте бактерий в культуре, при заражении этими штаммами макрофаг-подобных культур, а также первичных культур макрофагов костномозгового происхождения (КММф). Показано, что MTS1338 обеспечивает адаптацию *M. tuberculosis* к гипоксии, изменяя экспрессию бактериальных генов, вовлеченных в регуляцию окислительного стресса. Методом RNA-seq определены эукариотические метаболические пути, регулирующие MTS1338 и MTS0997 при инфекции КММф созданными мутантными штаммами. MTS0997 влияет на процессы цитоплазматической и митохондриальной трансляции, окислительного фосфорилирования, образования протеасомы. Экспрессия MTS1338 приводит к остановке созревания фагосомы и нарушению презентации антигенов, репрессии синтеза ряда белков клеточной адгезии и TNF-сигнального пути. Таким образом, нами впервые показано, что малые РНК MTS1338 и MTS0997 являются факторами вирулентности *M. tuberculosis*, действующими на важнейшие механизмы защиты инфицированного организма и обеспечивающие выживание микобактерий в макрофагах. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 18-15-00332.

PCID2, СУБЪЕДИНИЦА КОМПЛЕКСА TREX-2, УЧАСТВУЕТ КАК В ЯДЕРНОМ ЭКСПОРТЕ мРНК, ТАК И В ЕЁ ПОСЛЕДУЮЩЕМ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОМ ТРАНСПОРТЕ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Д.В. Копытова, А.А. Глухова

Институт биологии гена РАН, Москва

Комплекс TREX-2 необходим для общего экспорта мРНК из ядра в цитоплазму у эукариот. TREX-2 взаимодействует с комплексом ядерной поры (NPC) и транскрипционным аппаратом и связывает транскрипцию с экспортом мРНК. Однако неясно, участвует ли TREX-2 или его компоненты с последующими стадиями транспорта мРНК в цитоплазме. У *D. melanogaster* в состав TREX-2 комплекса входят белки Xmas-2, PCID2, ENY2, Sem1p. Мы установили, что PCID2 присутствует не только в ядре, но и в цитоплазме S2 клеток, а также выявляется в цитоплазматической фракции эмбрионов *D. melanogaster*. Поэтому мы исследовали роль PCID2 в цитоплазме. В данной работе мы изучили участие субъединицы PCID2 *D. melanogaster* в транспорте мРНК из ядра в цитоплазму. В результате пошаговой хроматографической очистки из цитоплазматической фракции эмбрионов нами был найден основной партнер белка PCID2 в цитоплазматической фракции, белок NudC и показано, что взаимодействие с NudC необходимо для поддержания стабильности PCID2 в цитоплазме. Кроме того, PCID2 оказался связан с цитоплазматической мРНК и микротрубочками. Нокдаун PCID2 приводил к задержке мРНК в ядре, но также влиял на локализацию мРНК в цитоплазме. Эти данные позволяют предположить, что PCID2 может быть связующим звеном между ядерным TREX-2 зависимым экспортом мРНК и транспортом мРНК к месту её локализации в цитоплазме. Таким образом, мы предполагаем, что в цитоплазме PCID2 выполняет функции, сходные с таковыми в ядре и отвечает за движение мРНК в цитоплазме от ядерной поры до места локализации. Работа выполнена при поддержке «Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН»

ШАТТЛИНГ мРНК ПРОТИВОВИРУСНЫХ ФАКТОРОВ И МЕТИЛИРОВАНИЕ М6А ПРИ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Д.С. Костюшев¹, А.П. Костюшева¹, С.А. Брезгин¹, Н.И. Пономарева^{1,2}, В.Г. Воля¹, Dieter Glebe³, В.П. Чуланов^{1,2}

¹НМИЦ фтизиопульмонологии и инфекционных болезней МЗ РФ; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва; ³Institute of Medical Virology, Justus Liebig University Giessen, Germany

Вирус гепатита В (ВГВ) – двуцепочечный ДНК-вирус, который инфицирует клетки печени и может вызывать хронический гепатит В, одно из самых распространенных инфекционных заболеваний в мире. Считается, что ВГВ блокирует иммунный ответ или также является резистентным для действия противовирусных факторов. В данной работе изучен шаттлинг мРНК противовирусных факторов и распространения эпигенетической метки РНК м6А, двух недавно описанных механизмов противовирусного ответа при ВГВ-инфекции. Методы: уровни мРНК и м6А метилирования измеряли в общей, цитоплазматической и ядерной фракциях клеток с различным циклом ВГВ с помощью ПЦР. Анализировали шаттлинг мРНК 31 различных факторов внутриклеточного ответа. Уровни м6А анализировали с помощью набора м6А «RNA methylation assay kit» после выделения РНК набором для магнитной экстракции. Результаты: при активации вирусного цикла не изменяется цитоплазматическое и внутриядерное содержание мРНК факторов ZC3H13, JAK1, IGF2BP1, STAT1, RBM15, JMJD6, Mettl14, TVK1, hnRNP A2B1, Mettl3, YTHDC2, YTHDF3, URF3, YTHDF1, JAK3, WTAP, ALKBH5, Mettl16 YTHDF2. Репликация ВГВ индуцирует резкий шаттлинг в цитоплазму факторов FTO (м6А-деметилаза РНК), IFI16 (внутриядерный сенсор ДНК), TLR3 (фактор распознавания двуцепочечной РНК), TLR7 (фактор распознавания одноцепочечной РНК), AIM2 (сенсор ДНК) и TLR9 (фактор распознавания неметилированной CpG-богатой ДНК), OAS1 (фактор распознавания двуцепочечной РНК), IRF7 (фактор транскрипции, индуктор интерфероновой реакции) и IFN-β (мРНК интерферона-β). Заключение: индукция репликации вируса гепатита В вызывает резкое изменение клеточной локализации внутриклеточных факторов и изменение общих уровней м6А метилирования, что свидетельствует об активном распознавании вируса и запуске программ противовирусного ответа на ранних этапах инфекции. Последствия изменения шаттлинга мРНК противовирусных факторов, содержания меток м6А для вирусной инфекции и влияния ВГВ на реализацию противовирусных программ подлежат дальнейшему изучению.

Работа была поддержана грантом РФФИ-DFG №20-515-12010 и GL595/9-1; дизайн РНК-проводников выполнялся в рамках РФФИ №20-015-00442.

ВКЛАД АЛЬТЕРНАТИВНЫХ СТАРТОВ ТРАНСКРИПЦИИ В РЕГУЛЯЦИЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ОТВЕТ НА СТРЕССОРНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА

П.А. Махновский¹, О.А. Гусев^{2,3}, Р.О. Бокон¹, Г.Р. Газизова², Т.Ф. Вепхвадзе¹, Е.А. Лысенко^{1,4}, О.Л. Виноградова^{1,4}, Ф.А. Колпаков⁵, Д.В. Попов^{1,4}

¹ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН, Москва; ²Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ³KFU-RIKEN Translational Genomics Unit, Cluster for Science, Technology and Innovation Hub, RIKEN, Саитама, Япония; ⁴Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁵Институт вычислительных технологий СО РАН, Новосибирск

Значительная часть белок-кодирующих генов человека имеет альтернативные старты транскрипции и альтернативные промоторы. Это обеспечивает разнообразие вариантов регуляции экспрессии отдельных генов в зависимости от ткани, стадии онтогенеза или временных факторов, таких как циркадные ритмы или острое стрессорное воздействие. Нашей целью было оценить вклад альтернативных стартов транскрипции в регуляцию экспрессии генов в ответ на острое стрессорное воздействие. Для этого мы изучали эффекты однократного аэробного упражнения на экспрессию генов в скелетной мышце человека (биопсический материал из четырёхглавой мышцы бедра был взят до, через 1, 3 и 6 ч после аэробной нагрузки у 10 мужчин). Для определения стартов транскрипции (их точное положение и уровень экспрессии) мы использовали кэп-анализ экспрессии

генов (CAGE). В результате анализа удалось обнаружить около 28000 стартов транскрипции (TSS), относящихся к 12269 генам, при этом более 250 TSS были описаны впервые. Однократное выполнение физической нагрузки изменяло (в основном активировало) экспрессию нескольких сотен генов в каждой временной точке (всего 1411 дифференцированно экспрессированных генов (ДЭГ)). Изменение экспрессии 146 ДЭГ (10%) было связано с активацией альтернативных стартов транскрипции, т.е. с перераспределением активности между промоторами в гене. Для 111 генов перераспределение активности между промоторами происходило без изменения суммарной экспрессии гена и было связано с разнонаправленными изменениями экспрессии с различных TSS. Было показано, что для 196 генов альтернативные TSS приводят к появлению мРНК, кодирующих разные изоформы одного и того же белка, что может вызывать перераспределение соотношения транскриптов, кодирующих разные изоформы белка. Таким образом, впервые показано, что альтернативные старты транскрипции вносят существенный вклад в изменение экспрессии генов в ответ на стрессорное воздействие в ткани человека. По-видимому, основная функция альтернативных TSS связана с тонкой регуляцией экспрессии изоформ мРНК за счет активации различных транскрипционных факторов/сигнальных путей. *Работа поддержана грантом РФФИ № 17-00-00308К (17-00-00242).*

БЛОК hTERP – ПРОДУКТ ТРАНСЛЯЦИИ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК ЧЕЛОВЕКА – РЕГУЛЯТОР МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТКИ **М. Рубцова¹, В. Шляпина², М. Корягина¹, Д. Василькова¹, М. Восколович¹, С. Ковальчук², И. Бутенко³, В. Шендер^{2,3}, Г. Арапиди^{2,3}, В. Говорун³, О. Донцова^{1,2,4}**

¹Химический факультет и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ³ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ⁴Сколковский институт науки и технологий, Центр наук о жизни, Москва

Теломеразная РНК – ключевой компонент теломеразного комплекса, активность которого благодаря экспрессии гена теломеразной обратной транскриптазы, тщательно регулируемой на различных этапах дифференцировки клеток и развития организма. Активация теломеразы происходит в клетках при повышении скорости пролиферации и ассоциировано с переключением метаболической программы клетки. Ген теломеразной РНК (TERC) экспрессируется конститутивно в большинстве клеточных типов вне зависимости от стадии развития организма. Ранее мы продемонстрировали, что предшественник TERC кодирует белок hTERP. Анализируя изменения протеома клеток, а также активность сигнальных путей, вовлеченных в регуляцию аутофагии и пролиферации клеток, мы увидели, что hTERP вовлечен в регуляцию гомеостаза клеток. Мы предполагаем, что hTERP является регулятором метаболизма клеток, а программа экспрессии гена hTERC сопряжена с активной пролиферацией и переключением метаболизма клеток. *Работа выполнена при поддержке РФФИ [18-29-07031 мк], РФФИ [16-14-10047].*

МЕТИЛИРОВАНИЕ мРНК В РЕГУЛЯЦИИ СПЛАЙСИНГА НА МОДЕЛИ НОКАУТНЫХ МЫШЕЙ

**П.В. Сергиев^{1,2,3}, С.С. Марьясина¹, О.А. Аверина^{1,4}, А.К. Болихова⁵, А.Р. Иззи⁵, О.А. Пермьяков¹, А.А. Занина³,
О.Г. Чечкина⁶, М.А. Шепелюк⁷, А.С. Старшин⁸, О.О. Григорьева¹, М.П. Рубцова³, В.Н. Манских⁴, А.М. Мазур⁸,
Е.Б. Прохорчук⁸, О.А. Донцова^{2,3,9}**

¹Институт функциональной геномики, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Сколковский институт науки и технологий, Центр наук о жизни; ³Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁴НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁵Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁶НИУ «Высшая школа экономики»; ⁷Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁸ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ⁹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Подавляющее большинство белок-кодирующих транскриптов млекопитающих подвергаются вырезанию интронов сложным рибонуклеопротеидным комплексом, называемым сплайсосомой. Основу каталитического и структурного центра сплайсосомы составляют пять малых ядерных РНК. До образования активной сплайсосомы мРНК проходят сложный путь внутриклеточного транспорта и биогенеза. В ходе созревания мРНК, их нуклеотиды подвергаются РНК-направляемой модификации, а также модификации ферментами, напрямую узнающими ключевые метилируемые остатки мРНК. Мы определили ген, кодирующий метилтрансферазу, создающую остаток m2G72 в U6 мРНК. Инактивация данного гена на модели клеточных линий человека и мыши вызывала замедление сплайсинга отдельных интронов и искажала спектр продуктов альтернативного сплайсинга. Нокаутные по гену m2G72 U6 мРНК специфичной метилтрансферазы мыши демонстрировали нарушение альтернативного сплайсинга, приводящего к патологическим изменениям ряда внутренних органов.

АКТИВАЦИЯ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ БЕЛКОМ Nsp1 ВИРУСА SARS-CoV-2

А.В. Шувалов, Е.Ю. Шувалова, Н.С. Бизяев, Е.Е. Соколова, К.С. Евменов, Т.В. Егорова, Е.З. Алкалаева
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Белок Nsp1 вируса SARS-CoV-2 регулирует трансляцию как мРНК хозяина, так и мРНК вируса. Nsp1 ингибирует инициацию трансляции хозяина, перекрывая вход в мРНК-связывающий канал 40S субъединицы рибосомы. Структурное исследование комплексов Nsp1 и рибосом показало, что в клетках имеется 80S комплекс, содержащий белок Nsp1 и факторы терминации и рециклинга рибосом eRF1 и ABCE1. Принимая во внимание одновременное с eRF1 присутствие Nsp1 в посттерминационном рибосомном комплексе, мы предположили, что Nsp1 может участвовать в терминации трансляции. Используя бесклеточную систему трансляции и реконструированную систему трансляции *in vitro*, мы показали, что Nsp1 стимулирует терминацию трансляции на стадии распознавания стоп кодона на всех трех стоп кодонах. Эта стимуляция затрагивает фактор терминации eRF1 и не зависит от наличия фактора терминации eRF3a. Активность Nsp1 в терминации трансляции обеспечивается его N-концевым доменом, а минимально необходимой частью eRF1 является его NM домен. Вероятно биологическое

значение стимуляции белком Nsp1 терминации трансляции человека заключается в связывании его с 80S рибосомами, транслирующими мРНК хозяина, для дальнейшего элиминирования их из пула активных рибосом. *Работа была поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 075-15-2019-1660.*

КЛЕТочный ОТВЕТ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ АКТИВНОСТИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ ФАКТОРОВ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ И РЕЦИКЛИНГА РИБОСОМ

Д.С. Макеева¹, А.В. Бураков¹, К.Л. Риггс², П.А. Иванов¹, А.С. Кущенко^{1,3}, Д.А. Быков⁴, В.С. Прасолов⁴, П.В. Иванов², С.Е. Дмитриев^{1,3,4}

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²Женский госпиталь Бригхэма, Гарвардская школа медицины, Бостон, США; ³Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁴Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

При окислительном стрессе клетки млекопитающих быстро перепрограммируют свою трансляцию, чтобы обеспечить оперативный ответ на изменившиеся условия. Это сопровождается образованием стрессовых гранул (СГ) – цитоплазматических рибонуклеопротеиновых конденсатов, содержащих нетранслируемые молекулы мРНК, РНК-связывающие белки, 40S рибосомные субчастицы и набор факторов инициации трансляции. В данной работе мы показали, что окислительный стресс, индуцированный арсенидом натрия, вызывает резкое увеличение частоты сквозного прочтения стоп-кодонов и значительно повышает уровень реинициации трансляции на мРНК, содержащих короткие рамки в 5'-нетранслируемых областях (uORF), и на бицистронных транскриптах. Мы также обнаружили стресс-индуцируемую релокализацию факторов терминации трансляции eRF1 и eRF3, фактора рециклинга рибосом ABCE1, а также белков, контролирующей реинициацию трансляции (eIF2D и гетеродимера MCT-1/DENR), в СГ. Локализация этих факторов в СГ может способствовать быстрому возобновлению трансляции мРНК после разборки гранул по окончании стресса, а также предполагает возможное присутствие в СГ пост-терминационных комплексов, интермедиатов рециклинга и реинициации. В работе обсуждается новый уровень регуляции трансляции в стрессовых условиях, основанный на изменении пространственного распределения трансляционных факторов между клеточными компартаментами. *Поддержано грантом РНФ 18-14-00291.*

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА eIF3j ЧЕЛОВЕКА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФАКТОРОВ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Т.В. Егорова, Е.Ю. Шувалова, Н.С. Бизяев, Е.Е. Соколова, К.С. Евменов, С.А. Мукба, А.В. Шувалов, Е.З. Алкалаева
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

eIF3j – белок, долгое время считавшийся 13 субъединицей фактора инициации eIF3. Однако, так как eIF3j очень слабо ассоциирован с eIF3 как у дрожжей, так и у млекопитающих, его стали называть eIF3-ассоциированным фактором. Для eIF3j млекопитающих подробно исследована его роль в инициации трансляции. Для дрожжевого гомолога eIF3j, белка HCR1, известно также, что одной из его основных функций в клетке является контроль терминации трансляции и сквозного прочтения стоп кодонов. Также было показано, что HCR1 принимает участие в рециклинге 60S субъединиц рибосом. Детали функционирования eIF3j человека в терминации трансляции остаются пока неизвестными. Мы сосредоточились на выяснении роли eIF3j и его мутантных форм в терминации трансляции. Для этого мы использовали реконструированную *in vitro* систему трансляции млекопитающих. Мы показали, что eIF3j человека стимулирует терминацию трансляции как на стадии распознавания стоп кодонов комплексом факторов терминации eRF1-eRF3, так и на стадии гидролиза пептидил-тРНК. Более того, мы показали, что eIF3j взаимодействует с фактором терминации eRF3a в растворе. Таким образом, мы обнаружили что eIF3j человека, как и его дрожжевой аналог HCR1, принимает участие в терминации трансляции. Кроме того, с помощью исследования активности мутантных форм eIF3j мы более детально описали механизм его функционирования в терминации трансляции. *Данная работа была поддержана грантом Президента Российской Федерации МК-6150.2021.1.4.*

НАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ, НАРУШАЮЩИХ СИНТЕЗ БЕЛКА

И.А. Остерман^{1,2,3}, Д.А. Лукьянов¹, И.М. Лисевич¹, А.А. Богданов², П.В. Сергиев^{1,2}, Д. Вилсон⁴, О.А. Донцова^{1,2,5}

¹Сколковский институт науки и технологий, Центр наук о жизни, Сколково; ²Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Научно-технологический университет «Сиркус», Сочи; ⁴Институт биохимии и молекулярной биологии, Гамбургский университет, Гамбург, Германия; ⁵Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

С каждым годом растет число устойчивых к известным антибиотикам патогенных бактериальных штаммов. В связи с этим крайне актуален поиск и разработка новых антибиотиков, не обладающих перекрестной устойчивостью с уже известными агентами. Рибосома и аппарат синтеза белка – мишень для большинства известных антибиотиков, наличие нескольких функциональных центров в рибосоме делает чрезвычайно разнообразным набор молекул, которые могут ингибировать ее работу, при этом устойчивость к одному классу может не влиять на активность других. Нами был разработан репортер pDualrep2 для направленного поиска новых ингибиторов синтеза белка. Мы обнаружили, что ароматический поликетидный антибиотик тетраценомицин X (TcmX) является мощным ингибитором синтеза белка и не вызывает повреждение ДНК, как считалось ранее. Несмотря на структурное сходство с хорошо известным ингибитором трансляции тетрациклином, мы показали, что TcmX не взаимодействует с малой субъединицей рибосомы, а связывается с большой субъединицей в рибосомном туннеле в непосредственной близости от сайта связывания макролидных антибиотиков. В тоже время штаммы, устойчивые к действию макролидов, оказались чувствительны к TcmX и наоборот, т.е. перекрестная устойчивость не возникает. TcmX взаимодействует с неканонической парой оснований, образованной U1782 и U2586 23S рибосомной РНК, разрушение данной пары делает клетки устойчивыми к действию TcmX. Можно сделать вывод, что нами обнаружен новый сайт связывания, который расположен рядом с сайтом связывания макролидов. Обнаружение нового ингибитора синтеза белка и нового сайта связывания открывает

путь к разработке новых антибиотиков. При помощи данной репортерной системы в культуральной жидкости штамма *Actinoplanes* sp. VKM Ac-2862 был также обнаружен новый ингибитор синтеза белка, названный аураплантин. Этот антибиотик взаимодействует с малой субъединицей и связывается в районе спирали 560, в этом сайте не связываются другие антибиотики, поэтому аураплантин может подавлять рост бактерий, устойчивых к другим ингибиторам синтеза. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-54-76002.*

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

К.С. Усачев^{1,2}, Ш.З. Валидов^{1,2}, М.М. Юсупов³

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет; ²ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань; ³Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC), Илькирш-Граффенштаден, Франция

Произошедшие за последнее десятилетие изменения в устойчивости патогенных микроорганизмов обуславливают необходимость поиска новых противомикробных агентов. Более 40% известных клинических антибиотиков подавляют синтез белка у больших групп организмов, поскольку действуют на высоко консервативные области белоксинтезирующего аппарата. Одним из путей разработки новых селективных антимикробных веществ является поиск мишеней среди более переменных белковых факторов, участвующих в работе рибосомы. Среди одних из наиболее значимых направлений в современной медицине является исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе множественной устойчивости к антибиотикам штаммов золотистого стафилококка, вызывающих множество инфекционных заболеваний. Система белков гibernации рибосомы обеспечивает выживание клеток в условиях голодания, а также препятствует связыванию с антибиотиками. Это дает клеткам бактерии-патогена шанс пережить курс антибиотикотерапии. В настоящее время на разных видах зубактерий получены данные о роли систем гibernации рибосомы. Объединение этих данных при исследовании арсенала гibernационных белков одного вида – *S. aureus* поможет создать более полное представление о взаимодействии рибосомных факторов стационарной фазы, с другой стороны, может выявить новые мишени, которые позволят снизить жизнеспособность этого патогена. В рамках данной работы на основе данных молекулярной биологии и физических методов исследований пространственной структуры биомолекул (спектроскопия ЯМР высокого разрешения, рентгеноструктурный анализ и криогенная просвечивающая электронная микроскопия) показан ряд молекулярных механизмов действия факторов регуляции трансляции *S. aureus*, что открывает возможности для поиска новых потенциальных мишеней для разработки высокоселективных антимикробных агентов. *Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20034).*

РОЛЬ ФАКТОРА Orb2 В ПОЛЯРИЗАЦИИ КЛЕТОК В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ ДРОЗОФИЛЫ

Е.Н. Козлов¹, Р.А. Гильмутдинов¹, М.В. Жукова¹, П. Шедл^{1,2}, Ю.В. Шидловский^{1,3}

¹Лаборатория регуляции экспрессии генов в развитии, Институт биологии гена РАН, Москва; ²Принстонский университет, США; ³Кафедра биологии и общей генетики, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

Посттранскрипционная регуляция экспрессии генов включает в себя транспорт, локализацию, трансляцию и контроль стабильности молекул мРНК. Белки семейства CREB связываются со специфическими сайтами в 3'-нетранслируемой области мРНК и регулируют поли- и деаденилирование транскриптов, активируя или подавляя синтез соответствующих белков. В составе рибонуклеопротеиновых комплексов CREB белки участвуют в транспорте мРНК в различные компартменты клетки. CREB белки консервативны и выполняют сходные функции у разных видов животных. Мы изучили функционирование фактора Orb2, одного из представителей данного семейства у дрозофилы. Orb2 играет важную роль в сперматогенезе и функционировании нервной системы. Удаление 3'НТО у мРНК Orb2 приводит к различным нарушениям в указанных процессах. В ходе сперматогенеза нарушается процесс поляризации в созревающих сперматидях, изменяется морфология удлиняющихся хвостов сперматид из-за дефектов в сборке комплекса индивидуализации. Это приводит к существенному снижению фертильности самцов. В мозге наблюдается снижение количества белка Orb2 в синаптической зоне нейронов, при этом наблюдаются дефекты в формировании долговременной памяти у мух. Описанные нарушения связаны с изменениями локализации различных мРНК и кодируемых ими белков. Таким образом, Orb2 регулирует локализацию и трансляцию ряда транскриптов-мишеней, играющих принципиальную роль в функционировании поляризованных клеток. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 18-74-10051).*

УЧАСТИЕ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ОТКРЫТЫХ РАМОК СЧИТЫВАНИЯ В ПОДАВЛЕНИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ГЕНА ГОМОЛОГА ИНГИБИТОРА ПЕПТИДАЗЫ КУНИТЦА (NbKPILP) ИЗ *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Е.В. Шешукова¹, Н.М. Ершова¹, К.А. Камарова^{1,2}, Т.В. Комарова^{1,2}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Многочисленные зрелые молекулы мРНК иллюстрируют организацию генов с дополнительными открытыми рамками считывания (ОРС), расположенными как в 5'-нетранслируемой области, так и в пределах кодирующей области. Нами был идентифицирован ген NbKPILP, кодирующий гомолог ингибитора пептидазы Кунитца из *Nicotiana benthamiana*, уровень экспрессии которого в листьях интактного растения чрезвычайно низок, тогда как любой вид стресса вызывает его повышение [1]. Установлено, что мРНК NbKPILP содержит внутреннюю альтернативную ОРС (аОРС), кодирующую пептид длиной 53 а.к. (53aa-per). Данная аОРС является функционально-активной, а введение мутации в ее стартовый кодон приводит к повышению экспрессии гена NbKPILP. Важно отметить, что стартовый кодон основной ОРС NbKPILP находится в субоптимальном нуклеотидном контексте для растений – АСААUGАА – в отличие от стартового кодона 53aa-per – ААААUGGG. Мы изменили контекст стартового кодона NbKPILP на более благоприятный – ААААUGGC, ожидая повышения вероятности инициации

трансляции на стартовом кодоне основной ОРС и «выключения» синтеза 53aa-пер, который, согласно предложенной модели, участвует в поддержании низкого уровня экспрессии NbKPIIP. И действительно, эта модификация привела к 8-кратному увеличению уровня мРНК NbKPIIP в системе временной экспрессии в растении. Кроме того, изменение структуры самого пептида 53aa-пер влияет на содержание мРНК NbKPIIP в клетке: внесение мутаций, приводящих к удалению трансмембранного домена, или замена остатков цистеина в 53aa-пер на аланины приводило к повышению уровня кодирующей его мРНК NbKPIIP. Таким образом, как структурные особенности 53aa-пер, так и сама по себе трансляция вложенной аОРС влияют на содержание мРНК NbKPIIP в клетке. Биоинформационный анализ генов *N. benthamiana* и *A. thaliana*, экспрессия которых снижена в листьях по сравнению с корнями, выявил ряд генов, содержащих потенциальные аОРС со старт-кодоном в благоприятном контексте, в отличие от старт-кодона основной ОРС, имеющем субоптимальный контекст. По-видимому, свойства и организация подобных генов-матрешек, как NbKPIIP, не уникальны, а являются основой одного из универсальных механизмов регуляции генов. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (№19-74-20031).*

[1] Sheshukova E. V. et al. (2017) *Front Plant Sci*, 8, 2137.

ПРОГРАММИРУЕМЫЕ НУКЛЕАЗЫ ИЗ СЕМЕЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ-АРГОНАВТОВ

Д.М. Есюнина¹, А.А. Агапов¹, А.В. Кузьменко, М.В. Простова¹, А.А. Куликова¹, А.В. Олина¹, Е.В. Кропачева¹, Л.А. Лисицкая¹, А.А. Кото¹, С.С. Рязанский¹, А.А. Аравин², А.В. Кульбачинский¹

¹Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ²Отделение биологии и биологической инженерии, Калифорнийский технологический институт, Пасадена, США

Белки-Аргонавты – программируемые нуклеазы, которые способны узнавать свои мишени за счет коротких гидовых молекул нуклеиновых кислот. Аргонавты эукариот играют ключевую роль в РНК-интерференции, загружаются гидовыми РНК и узнают РНК-мишени, что приводит к их расщеплению либо самим белком-Аргонавтом, либо за счет привлечения других факторов. Примерно в 10% геномах бактерий также обнаружены гены белков-Аргонавтов, причем они намного разнообразнее как по последовательности и доменной организации, так и по наличию предсказанных белков-партнеров. Цель нашей работы – изучить прокариотические белки-Аргонавты из разных групп, охарактеризовать их биохимические свойства и оценить возможные области применения. Нами выделено и охарактеризовано несколько десятков белков из разных частей филогенетического древа белков-Аргонавтов. Для всех групп Аргонавтов изучена их специфичность по отношению к ДНК и РНК, влияние на активность температуры реакции, ионов металлов, структуры гидов и мишеней, а также наличия некомплементарных нуклеотидов в молекуле-мишени. В отличие от Аргонавтов эукариот, большинство из исследованных белков оказались ДНК-зависимыми ДНК-нуклеазами. Представителей данной группы белков-Аргонавтов можно использовать для узнавания и специфического разрезания однострессовой и двустрессовой ДНК при загрузке соответствующими гидовыми олигонуклеотидами. Также нами обнаружены уникальные группы белков-Аргонавтов, которые разрезают ДНК-мишень с помощью РНК-гида и наоборот – РНК-мишень с помощью ДНК-гида. Некоторые из изучаемых белков проявляют весь спектр активностей и могут разрезать и ДНК-, и РНК-мишени. Аргонавты этих групп могут быть использованы для специфического расщепления РНК, анализа вторичной структуры РНК, а также для проверки наличия нуклеотидных полиморфизмов и модификаций в РНК-мишени. В целом, полученные данные показывают, что исследованные белки-Аргонавты значительно различаются по своей специфичности и свойствам и могут найти применение в различных областях молекулярной биологии и биотехнологии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-29-07086.

О ЧЕМ МОЖЕТ СКАЗАТЬ ПРОФИЛЬ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВОГО ОБРАЗЦА

А.А. Буздин^{1,2,3,4}, М.А. Золотовская^{2,5,6}, В.С. Ткачев⁷, М.И. Сорокин^{1,2,4,6}, А.В. Гаража^{6,7}, А.А. Моисеев¹, Н.М. Борисов^{2,7}

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва; ²Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный; ³Институт биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ⁴Европейская организация исследования и лечения рака, подгруппа биостатистики и биоинформатики, Брюссель, Бельгия; ⁵Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁶Компания «Онкобокс», Москва; ⁷Компания Омиксвей, Волнат, США

Интеграция технологий секвенирования и новых биоинформатических методов трансформировала молекулярную диагностику в онкологии. Помимо классических подходов, связанных с анализом ДНК-профилей опухоли (полных геномов, экзомов, отдельных генных панелей), на первые роли постепенно выходит РНК-секвенирование. Оно позволяет получать достоверно воспроизводимые профили как для свежих, так и для парафинизированных образцов опухолевой ткани, в том числе – для архивных, хранящихся годами. Точность определения экспрессии маркерных генов (например, ERBB2, ESR1, PGR, PDL1) не уступает классическим иммуногистохимическим подходам, а информативность теста превосходит их в тысячи раз. Помимо профилей отдельных генов, можно найти уровни активации тысяч молекулярных путей в опухолевом образце по сравнению с нормами (доступно по ссылке: <https://puri.org/project/oncoboxlib/>). Это позволяет не только понять происходящие в конкретной опухоли процессы, но и выстроить персонализированный рейтинг противоопухолевых препаратов. Для этого *in silico* моделируется подавление соответствующих молекулярных мишеней и содержащих их молекулярных путей для каждого из препаратов в конкретной опухоли. Еще одна сильная сторона анализа профилей РНК, даже для фиксированных образцов – это скрининг химерных опухолевых транскриптов, некоторые из которых позволяют подобрать специфическую терапию. Появились подходы и для определения основных предиктивных маркеров PD1/PD-L1/CTLA4 иммунотерапии по РНК-профилям: опухолевой мутационной нагрузки, статуса микросателлитной нестабильности и инфильтрации опухоли иммунными клетками. По результатам РНК-теста стал возможным количественный анализ клеточного состава опухолевого образца, в том числе для архивных фиксированных образцов. Часто проблемой является отсутствие норм для сравнения. Использование норм

из баз данных часто затруднено тем, что для них использовались другие наборы и экспериментальные платформы, и стандартные инструменты вроде DESeq1/2 и квантильной нормализации не решают эту проблему. Теперь она может быть решена с помощью совместной гармонизации экспрессионных профилей методом Shambhala. Для этого в ходе гармонизации как экспериментальные, так и литературные сравниваемые образцы приводятся в универсальный вид, позволяющий проводить такое сравнение.

МУТАНТНЫЕ ФОРМЫ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ DNMT3A ПРИ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ: ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

Е.С. Громова, А.Г. Лойко, Д.А. Храброва

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

В клетках злокачественных опухолей наблюдаются мутации в гене ДНК-метилтрансферазы DNMT3a – важнейшего фермента, отвечающего за эпигенетическую модификацию ДНК – метилирование остатков цитозина в CpG-сайтах. Эти мутации ассоциированы с плохим прогнозом выживаемости пациентов. Особенно распространены точечные мутации в каталитическом домене фермента (DNMT3a-CD) при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ). Кроме того, при ОМЛ наблюдаются точечные мутации и в регуляторном PWWP-домене, отвечающем за привлечение DNMT3a к хроматину за счет связывания с «хвостом» гистона H3, триметилированным по 36-ому остатку лизина (H3K36me3). Работа посвящена исследованию структурно-функциональных особенностей мутантных форм DNMT3A, найденных у пациентов при ОМЛ. На основе баз данных, содержащих информацию о пациентах с онкологическими заболеваниями, выбраны 6 точечных мутаций в каталитическом и 3 мутации в PWWP доменах DNMT3A при ОМЛ. Эти мутации введены в конструкции, кодирующие DNMT3a-CD и PWWP домены и полноразмерный фермент. Метилирующая активность мутантных форм DNMT3a-CD резко уменьшалась и в некоторых случаях была блокирована, причем даже если мутации не попадали в функциональные мотивы фермента. Постадийное изучение механизма действия мутантов показало, что нарушается способность фермента связываться с ДНК, выводить метилируемый цитозин из двойной спирали и образовывать ковалентный ДНК-белковый интермедиат реакции. Таким образом, наличие мутаций в каталитическом домене DNMT3a у пациентов с ОМЛ вызывает нарушение функции этого фермента при патогенезе. В случае мутаций в PWWP-домене было исследовано их влияние на способность к связыванию H3K36me3 и на метилирующую активность фермента. Были созданы модельные системы, включающие 30-звенный ДНК-субстрат, 19-звенный пептид, имитирующий «хвост» гистона H3, несущего модификацию, и мутантные формы изолированного PWWP и этого же домена в полноразмерном ферменте. Обнаружена зависимость комплексообразования пептида с PWWP от расположения мутаций по отношению к карману, ответственному за связывание «хвоста» гистона, и влияние мутаций в PWWP на метилирование. Эти данные являются основой для понимания механизма таргетирования фермента к хроматину в клетке при онкологии.

Поддержано грантом РФФИ 19-04-00533.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОПУХОЛЕВОЙ ДНК С ПОТЕНЦИАЛОМ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА (НА ПРИМЕРЕ ОБЛАСТИ ПРОМОТОРА ГЕНА TERT)

А.В. Павлова¹, Е.В. Писарев², М.В. Монахова¹, Е.А. Кубарева³, М.Э. Зверева¹

¹Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Факультет биоинформатики и биоинженерии, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Доля ДНК, выделяемая опухолевыми клетками, претерпевшими неопластическую трансформацию (опухолевая ДНК) или появляющаяся при их гибели, часто является чрезвычайно малой частью общей циркулирующей бесклеточной ДНК. Это обстоятельство затрудняет ее обнаружение в жидкостях организма. Понимание свойств опухолевой ДНК является ключом для разработки подходов к мониторингу процессов развития онкологических заболеваний. Специфические структурные особенности опухолевой ДНК, отличные от ДНК генома и от ДНК, циркулирующей в биологических жидкостях человека в норме, являются основой для совершенствования технологий неинвазивного выявления и возможного селективного лечения рака. Специфические структурные особенности опухолевой ДНК представлены на первичном и вторичном структурных уровнях. В качестве примера специфической опухолевой ДНК нами выбрана геномная область с мутациями в промоторе гена каталитической субъединицы теломеразы. Изменения этой геномной области высокоспецифичны для опухолевых клеток (близко к 90%) в случае некоторых видов рака (мочевой пузырь, кожа, мозг, щитовидная железа) и отмечены как возможные «драйверные» мутации с потенциалом для неинвазивной диагностики рака (Avogbe et al., EBioMedicine, 2019, 44, 431; Zvereva et al., Int. J. Mol. Sci., 2020, 21 (17), 6034). В настоящее время молекулярно-биологические механизмы, способствующие специфическому появлению и фиксации таких "драйверных" точечных мутаций для канцерогенеза, до конца не ясны. Промоторная область гена TERT богата G. Она может формировать несколько G-квадруплексов (G4), структура которых не совсем ясна. С помощью биоинформатических методов было проведено моделирование структуры нативного промотора и его мутантных вариантов, а также выполнен контекстуальный анализ соматических мутаций. Мы дискриминировали предполагаемые модели с помощью химического пробинга *in vitro*. Изучен специфический процесс, приводящий к фиксации структуры G4 путем стабилизации C-цепи в геноме. Исследуется механизм появления онкогенных мутаций, базирующийся на изменении работы систем репарации на геномном участке с G4-структурой, предварительно охарактеризованный на модельной системе (Pavlova et al., Int. J. Mol. Sci., 2020, 21(22), 8773). *Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 21-14-00161.*

НОВЫЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АНТИ-МИРНК ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ – ПРОТОТИПЫ ИННОВАЦИОННЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

М.А. Зенкова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

В настоящее время одной из важнейших задач практической онкологии является поиск эффективных стратегий для терапии злокачественных заболеваний. Активно развивающимся, перспективным подходом является контроль и регуляция уровня экспрессии некодирующих РНК, в частности, миРНК. Нарушение экспрессии данных молекул, являющихся ключевыми регуляторами важнейших сигнальных каскадов клетки, ответственных за процессы пролиферации, апоптоза, миграции и инвазии, часто является причиной развития различных патологических состояний, что делает их перспективными мишенями терапии. Многолетние исследования доказали, что антисмысловые олигонуклеотиды обладают мощным потенциалом для подавления экспрессии различных, в том числе и некодирующих, РНК, ассоциированных с патологическими состояниями. В докладе будут представлены данные по использованию новых аналогов олигонуклеотидов, а именно олигонуклеотидов, содержащих мезилфосфорамидный остов (μ -олигонуклеотиды), направленных к ряду онкогенных миРНК, в качестве противоопухолевых препаратов. Рекордная стабильность в биологических средах μ -олигонуклеотидов, а также их хорошие гибридационные свойства и способность активировать внутриклеточную РНКазу H, определяют их высокую биологическую активность не только в культуре клеток, но и *in vivo*. В ходе доклада будут обсуждены базовые характеристики анти-миРНК олигонуклеотидов (анти-миРНК-ОН) на основе μ -аналогов, включающие выбор мишени(ней), дозировку и способы введения, а также динамику подавления роста опухолей различного генеза под действием анти-миРНК-ОН разной направленности, оценку основных критериев системной токсичности, биораспределение и первичный анализ фармакокинетических параметров. Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанные анти-миРНК-ОН представляют собой прототипы инновационных селективных противоопухолевых препаратов, характеризующихся высокой селективностью, и являются новым мощным инструментом, использующим лучшие достижения антисмысловой технологии. *Работа поддержана Российским научным фондом, грантами № 19-14-00250 и № 19-74-30011.*

ПРОИЗВОДНЫЕ ФЕНОКСАЗИНА КАК ЛИГАНДЫ К G4-СТРУКТУРАМ ОНКОГЕННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДЛЯ АНАЛИЗА АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

С.А. Лизунова^{1,2}, В.Б. Цветков^{1,3,4}, Т.С. Ведехина¹, М.А. Лагарькова¹, Т.А. Николенко^{1,2}, В.О. Шипунова⁵, Д.А. Скворцов⁶, А.В. Аралов⁵, А.М. Варижук^{1,2}, Г.Е. Позмогова¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва; ²Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный; ³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; ⁴Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева; ⁵Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ⁶НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

G-квадруплексы (G4) — класс неканонических вторичных структур нуклеиновых кислот, рассматривающийся в настоящий момент в качестве перспективных мишеней для противоопухолевой, антивирусной и антибактериальной терапий. В работе рассмотрены новые лиганды на основе феноксазина для стабилизации G4 из теломерных повторов и промоторной области онкогена *сKit*. Новые производные феноксазина не только проявили высокие стабилизирующие эффекты, сравнимые с эффектами хорошо известных G4-лигандов (PDS, NMM), но и оказались селективными к выбранным мишеням по сравнению с дуплексной ДНК. Исследуемые лиганды ингибировали клеточную активность с EC50, соответствующей их родству к G4-мишеням и стабилизирующим эффектам, что подтверждает G4-опосредованные механизмы действия. Особенно токсичными лиганды оказались для клеток аденокарциномы легких A549 (EC50 в наномолярном диапазоне), менее токсичными – для клеток рака молочной железы MCF7, а также иммортализованных фибробластов VA13 и эмбриональных клеток почек HEK293t (EC50 в микромолярном диапазоне). Анализ внутриклеточной локализации показал преимущественное накопление лигандов в ядре и ядрышках. Для повышения избирательности G4-лигандов к клеткам-мишеням лиганды были инкапсулированы в PLGA-наночастицы, модифицированные адресующим агентом для направленной доставки в ERBB2-положительные опухолевые клетки. Цитотоксический эффект лидерных соединений вырос в более, чем 10 раз. Таким образом, новые лиганды на основе феноксазина являются перспективными противоопухолевыми терапевтическими агентами с G4-направленным воздействием. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ [20-15-00017].*

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ГАПМЕРНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫЕ МОДИФИКАЦИИ, ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ ФЕНОТИПА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕЙ

Н.Л. Миронова, М.С. Купрюшкин, А.В. Филатов, О.А. Патутина, И.В. Черников, Д.В. Пышный, Д.А. Стеценко, М.А. Зенкова, В.В. Власов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), используемые в качестве терапевтических препаратов, имеют 40-летнюю историю исследования и применения для борьбы с различными заболеваниями. Механизмы АСО различны и заключаются в стерическом блокировании трансляции мРНК, рекрутировании клеточных нуклеаз и опосредуемом расщеплении мРНК и изменении сплайсинга пре-мРНК. Широкое применение АСО ограничивают сложность их доставки в клетки-мишени и быстрая деградация нуклеазами. Эти проблемы решаются за счет введения в структуру олигонуклеотидов химических модификаций. В данной работе сконструированы антисмысловые гапмерные олигонуклеотиды, несущие фосфорилгуанидиновую (PG) группу (1,3-диметилимидазолидин-2-имин) на 3–5 межнуклеотидных атомах фосфора, прилегающих к 3'- и 5'-концевым областям олигонуклеотида. Введение PG модификаций значительно повышает устойчивость олигонуклеотидов к нуклеазам: и PG-гапмеры, и полностью модифицированные PG олигонуклеотиды оставались стабильными в среде с сывороткой более 21

дня. Данные показали, что введение двух PG групп в АСО не влияет на эффективность его доставки в клетки в отсутствие трансфектантов, тогда как увеличение количества PG групп с 2 до 7 снижает эффективность проникновения. В присутствии катионных липосом частично модифицированные PG АСО достаточно эффективно накапливались в клетках, тогда как полностью модифицированные PG олигонуклеотиды не проникали в клетки как в отсутствие так и в присутствии трансфектантов. PG-гапмеры, содержащие 3-4 PG группы на обоих концах и центральное «окно» из 7 дезоксирибонуклеотидов с фосфодиэфирными или фосфоротиоатными связями, были адресованы к мРНК гена MDR1, гиперэкспрессия которого обеспечивает формирование опухолевыми клетками фенотипа множественной лекарственной устойчивости. PG-гапмеры эффективно подавляли экспрессию гена MDR1, что приводило к восстановлению чувствительности клеток эпидермоидной карциномы человека KB-8-5 к цитотоксическим препаратам за счет более чем двукратного снижения уровня продукта гена MDR1 - белка Р-гликопротеина. Таким образом, PG-гапмеры представляют собой новый перспективный вид антисмысловых олигонуклеотидов, проявляющих рекордную нуклеазоустойчивость и высокую эффективность подавления экспрессии мРНК-мишени. *Данная работа поддержана грантом РНФ 19-74-30011.*

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПО ФОСФАТНОЙ ГРУППЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ДНК И РНК, ПОЛУЧЕННЫЕ ПО РЕАКЦИИ ШТАУДИНГЕРА, КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ Д.А. Стеценко^{1,2}, Е.А. Буракова^{1,2}, С.Н. Бизяев^{1,3}, А.Ш. Держалова¹, К.В. Клабенкова^{1,2}, Д.Э. Патрушев^{1,2}, А.А. Фокина^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет; ²Институт цитологии и генетики СО РАН; ³Институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

Производные нуклеиновых кислот успешно проявили себя как РНК-направленные терапевтические препараты против ряда генетических заболеваний. На сегодня более десятка данных соединений уже введено в лечебную практику, а свыше ста проходит различные фазы клинических испытаний. Среди них аналоги ДНК и РНК с модифицированными фосфатными группами принадлежат к наиболее привлекательным. Примером служат впервые полученные более полувека назад тиофосфатные производные, которые в силу благоприятных биохимических свойств оказались удачной платформой для создания терапевтических олигонуклеотидов. В то же время другие аналоги ДНК и РНК с модифицированной фосфатной группой, такие как дитиофосфаты или боранофосфаты, до сих пор не получили широкого распространения из-за трудностей синтеза. Реакция Штаудингера была впервые использована для получения олигонуклеотидов с модифицированной фосфатной (фосфорамидной) группой более 40 лет назад, но ее потенциал в химии нуклеиновых кислот оставался нерализованным до недавнего времени. Мы показали, что реакция Штаудингера является удобным способом синтеза производных ДНК или РНК, модифицированных по атому фосфора азотсодержащими группами, в частности, гуанидиновыми, сульфонилфосфорамидными и им подобными. Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО), в которых фосфодиэфирные группы полностью или частично заменены электронейтральными фосфорилгуанидиновыми группами, могут быть получены по реакции Штаудингера с использованием солей азидоформамидиния. Наши исследования показали, что ФГО могут выступать перспективными антисмысловыми агентами, действующими по механизму пространственного блокирования трансляции [1]. Сульфонилфосфорамидные аналоги, в отличие от ФГО, сохраняют отрицательный заряд межнуклеотидной группы аналогично природным нуклеиновым кислотам. В частности, мезилфосфорамидные олигонуклеотиды индуцируют расщепление РНК РНКазой H и показывают более высокую биологическую устойчивость и меньшие побочные эффекты, чем тиофосфаты [2]. Это делает их особенно привлекательными антисмысловыми агентами для терапевтического применения. *Работа поддержана грантами РФФИ №№ 18-515-57006, 18-29-09045, 18-29-08062 и 20-04-60433.*

1. Skvortsova et al. *Front Pharmacol.* 2019, 10, 1049.
2. Miroshnichenko et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019, 116, 1229.

АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ С ПОМОЩЬЮ Hi-C МЕТАГЕНОМИКИ

А.В. Тяхт¹, В.А. Васильев^{1,2}, В.А. Иванова¹, Е.А. Черневская^{1,4}, М.А. Соловьев^{1,5}, И.В. Сонец¹, А.Ю. Меркель^{1,3},
А.М. Соболев¹, С.В. Разин^{1,5}, С.В. Ульянов^{1,5}

¹Институт биологии гена РАН; ²Медико-генетический научный центр; ³Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ⁴ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии; ⁵Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Метагеномное секвенирование позволяет изучить структуру микробиома и оценить их функциональный потенциал. Хотя метагеномы содержат геномные прочтения от каждого отдельного члена микробного сообщества, качественная реконструкция их геномов все еще представляет собой существенную сложность с точки зрения анализа данных. Среди недавно предложенных усовершенствований метода - совмещение метагеномного секвенирования с технологиями высокопроизводительной фиксации контактов хромосом (ФКХ) - такими, как Hi-C и 3C-seq. Нами была разработана комплексная экспериментально-биоинформатическая методика для анализа Hi-C метагеномов. После валидации на изолятах микроорганизмов и примитивном синтетическом сообществе, подход был отработан на образцах микробиома различной степени сложности из разнообразных ниш, в том числе ассоциированных с организмом-хозяином (кишечник человека), промышленных (ферментированные напитки), а также из окружающей среды (термальные источники). Было продемонстрировано, что учет ФКХ-сигнала позволяет существенно улучшить реконструкция геномов микроорганизмов (МАГ, англ. metagenome-assembled genome, MAG) - по таким параметрам, как число МАГов на образец, их полнота и чистота. Использование принципа непрерывности Hi-C сигнала и его убывания с геномным расстоянием позволяет выстроить контиги МАГа в полногеномный скаффолд, тем самым значительно улучшив качество сборки. Графовый анализ позволил оценить ассоциацию отдельных бактериальных видов с фагами,

плазмидами, а также генами интереса (например, генов-детерминант лекарственной устойчивости). Для сообществ, содержащих высокую долю дрожжей (пиво спонтанного брожения), методика позволила достаточно полно реконструировать дрожжевые геномы, причем обеспечивая их разбиение на хромосомы. В качестве отдельного применения, методика позволяет оценить трехмерную конформацию генома для наиболее представленных членов сообщества. Несмотря на сложность протокола и его большую чувствительность к химическим характеристикам биообразца, Hi-C метагеномика представляется перспективным методом для анализа микробиома разнообразных ниш в областях биомедицины и промышленности, а также в рамках фундаментальных исследований. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-74-10092.*

ЛИПОФИЛЬНЫЕ КОНЪЮГАТЫ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК: ЭВОЛЮЦИЯ ОТ *IN VITRO* К *IN VIVO* И.В. Черников, Д.В. Гладких, У.А. Карелина, А.Г.Веньямина, М.А. Зенкова, В.В. Власов, Е.Л. Черноловская Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Малые интерферирующие РНК (siРНК) считаются новым, многообещающим классом лекарственных средств, способным эффективно и избирательно подавлять экспрессию генов, связанных с заболеваниями. В настоящее время три препарата на их основе, предназначенные для подавления генов-мишеней в клетках печени, уже одобрены для применения в клинической практике. Конъюгация siРНК с молекулами природного происхождения является наиболее перспективным способом доставки siРНК в клетки-мишени. Для решения проблемы доставки siРНК в клетки нами использованы липофильные аналоги нуклеазоустойчивых siРНК. Показано, что присоединение холестерина к siРНК обеспечивает эффективное накопление полученного конъюгата клетках без носителя и проявление его биологической активности. При переходе от *in vitro* к *in vivo* появляется необходимость преодоления siРНК дополнительных биологических барьеров на пути к клеткам-мишеням: высокая рибонуклеазная активность сыворотки, ограниченная проницаемость сосудов, фильтрация почками, поглощение фагоцитирующими клетками и накопление в нецелевых органах. Для решения задачи разработки ингибиторов РНК-мишеней с улучшенной эффективностью и биодоступностью *in vivo* мы использовали платформы sisiРНК (сегментированной siРНК) и супрамолекулярной tsiРНК (тримерной siРНК). Показано, что изменяя длину супрамолекулярных комплексов возможно изменять их биораспределение в организме животного и увеличивать накопление siРНК в целевом органе. Исследование динамики ингибирования целевых генов показало, что применение siРНК *in vivo* выдвигает более высокие требования к нуклеазоустойчивости и биологической эффективности, по сравнению с экспериментами в культуре клеток. Эксперименты на животных наглядно демонстрируют преимущество «тяжелых» паттернов модификации, обеспечивающих длительное подавление экспрессии гена-мишени. *Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-14-00251.*

ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ Стендовые доклады

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ МОЗГА

О.Ю. Буренина¹, Ю.П. Рубцов², М.С. Павлюков², О.Е. Мусатова², Т.С. Зацепин^{1,3}, М.П. Рубцова³, О.А. Донцова^{1,3}

¹Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемькина и Ю.А. Овчинникова РАН; ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Рак мозга – относительно редкое злокачественное заболевание, которое, однако, характеризуется крайне высокой степенью летальности пациентов. Данная статистика обусловлена прежде всего локализацией опухолей, исключающей возможность хирургического вмешательства на поздних стадиях рака, а также отсутствием специфических биомаркеров, позволяющих диагностировать развитие болезни на начальных этапах ее проявления. Ранее в нашей научной группе мы охарактеризовали новую печень-специфичную некодирующую РНК (нкРНК) HELIS, экспрессия которой существенно снижалась в раковых тканях печени пациентов (Burenina O.Y., J Cancer Res Clin Oncol., 2021). При тщательном анализе доступных биоинформатических данных было обнаружено, что в данном локусе генома помимо HELIS закодировано сразу несколько генов потенциальных нкРНК, причем все они являются специфичными для тканей мозга, а уровень их экспрессии дифференциально изменяется при мультиформной глиобластоме (ГБМ) и низкоккачественных глиомах (LGG). Таким образом, данные нкРНК могут рассматриваться как потенциальные биомаркеры для диагностики и/или дискриминации различных типов опухолей мозга. На данном этапе работы мы провели скрининг имеющейся в нашем распоряжении коллекции первичных неиммутизированных клеточных линий – моделей различных типов глиом, отличающихся по степени злокачественности, дифференциации и резистентности к химиотерапии, и идентифицировали две нкРНК CABR1 и LINC1102 с максимальным уровнем экспрессии. Было установлено, что преобладающие транскрипты для обеих нкРНК не полностью совпадают с их аннотированием в базах данных. В частности, для LINC1102 был зафиксирован пропуск одного из экзонов, тогда как для CABR1, наоборот, наличие «лишнего» неаннотированного экзона. Для сравнения мы также использовали четыре иммутизированные линии рака мозга: глиобластомы (U-87-MG и U-251-MG) и нейробластомы (IMR-32 или SK-N-MC). Было продемонстрировано наличие различных изоформ LINC1102 и CABR1, дифференциально экспрессирующихся в данных клеточных культурах. Таким образом, специфическая детекция отдельных транскриптов LINC1102 и CABR1 может обладать дополнительным диагностическим потенциалом, а сами нкРНК могут рассматриваться как потенциальные мишени для терапии. *Работа поддержана грантом РФФИ № 21-34-70042 мол_а_мос.*

МАЛАЯ РНК *Mycobacterium tuberculosis* MTS1338 КАК ФАКТОР ВИРУЛЕНТНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ

О.С. Быченко¹, Ю.В. Скворцова¹, А.С. Григоров¹, Л.В. Асеев¹, А.А. Острик², Е.Г. Салина², Т.Л. Ажикина¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Бактериальные малые РНК играют ключевую роль в адаптации бактерий к различным стрессам. Малая РНК *Mycobacterium tuberculosis* MTS1338 способствует успешному персистенции микобактерий внутри организма хозяина. Транскрипция этой малой РНК активируется во время инфицирования макрофагов микобактериями, что предполагает ее вовлеченность в процесс взаимодействия патогена с хозяином. Мы исследовали функциональные эффекты MTS1338, экспрессируя её в непатогенном *Mycobacterium smegmatis*, у которого отсутствует ген этой малой РНК. Показано, что MTS1338 замедляет рост рекомбинантных микобактерий в культуре и увеличивает их выживаемость в макрофагах RAW264.7. При этом штаммы, экспрессирующие MTS1338, значительно ($p < 0,05$) уменьшают количество зрелых фаголизосом в инфицированных макрофагах и изменяют продукцию цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TGF- β и TNF- α по сравнению с контрольными штаммами. Протеомный и секретомный профили рекомбинантных и контрольных штаммов выявили дифференциальную экспрессию белков, участвующих в синтезе основных компонентов клеточной стенки и в регуляции метаболизма железа (система секреции ESX-3) и ответа на гипоксию (*furA*, *whiB4*, *phoP*). Подобные эффекты экспрессии MTS1338 характерны для *M. tuberculosis* во время инфекции, что демонстрирует важную роль MTS1338 у патогенных микобактерий как фактора вирулентности, поддерживающего длительную персистенцию *M. tuberculosis* в организме хозяина. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-15-00332

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ ИЗОФОРМ БЕЛКОВ В МИТОХОНДРИИ ТРИПАНОСОМАТИД

Е.С. Герасимов^{1,2}, А.А. Гаспарян¹, Д.А. Афонин¹, С.Л. Циммер³, Н. Краева⁴, Ю. Лукеш^{5,6}, В.Ю. Юрченко⁴, А.А. Колесников¹

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва; ²Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва; ³Университет Миннесоты, Факультет биомедицинских исследований, Дулут, США; ⁴Островский университет, факультет естественных наук, Острова, Чехия; ⁵Институт паразитологии Чешской академии наук, биологический факультет, Чёске-Будёёвице, Чехия; ⁶Университет Южной Богемии, факультет естественных наук, Чёске-Будёёвице, Чехия

Трипаносоматиды – семейство паразитических жгутиковых простейших, относящихся к отряду Kinetoplastida. Все представители семейства являются паразитами, многие из которых проходят сложный жизненный цикл со сменой хозяев. Трипаносоматиды обладают рядом уникальных молекулярных механизмов, одним из которых является уридилловое редактирование РНК в митохондриальном геноме.

Митохондриальный геном трипаносоматид содержит лишь небольшое число белков (около 20, в зависимости от вида), при этом большинство из них кодируется в форме криптогенов, транскрипты которых нуждаются в дополнительном процессинге (уридилловом редактировании). Известны случаи, когда в результате редактирования одного и того же криптогена могут возникать разные по последовательности мРНК. Это явление было описано, как альтернативное редактирование. В процессе редактирования часть генетической информации вносится в первичный транскрипт криптогена молекулами гидовых РНК (гРНК), кодируемыми специальным компонентом генома – миникольцами. Предполагалось, что альтернативное редактирование происходит за счет наличия избыточных вариантов гРНК, которые могут обеспечивать несколько способов редактирования криптогена.

В нашем исследовании мы показали, что альтернативное редактирование может происходить даже при взаимодействии локуса пре-мРНК с единственной гРНК, в результате чего возникает серия изоформ, несущих локальное отличие в несколько аминокислот. Обычно молекулы гРНК специфически узнают сайты пре-мРНК, за счет комплементарного взаимодействия небольших якорных участков этих молекул. Мы также показали, что молекула гРНК может взаимодействовать с другими пре-мРНК или неканоническими сайтами на той же пре-мРНК. Оба описанных нами процесса происходят в митохондриальном транскриптом с относительно высокой частотой, что объясняет необычайное разнообразие транскриптов в митохондриях трипаносоматид, наблюдаемое при исследовании методами NGS.

Таким образом, нами описаны два генетических механизма, позволяющие трипаносоматидам генерировать разнообразные изоформы белков, используя при этом ограниченный набор генов. Данное исследование поддержано грантом РФФИ №19-74-10008.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РОДА *ADSCITA* RETZIUS, 1783 (LEPIDOPTERA, ZYGAENIDAE)

К.А. Ефетов, З.С. Лазарева, Е.В. Паршкова

Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь

В рамках программы «The Barcode of Life Data Systems» с центром в Biodiversity Institute of Ontario (University of Guelph, Канада) под руководством профессора К.А. Ефетова выполняется международный научный проект «ZYGMO» по секвенированию 5'-участка гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы (COI) у представителей семейства Zygaenidae (Lepidoptera).

Нами расшифрованы и изучены последовательности гена COI у 171 экземпляра рода *Adscita*. Определены 259 переменных позиций и 7 консервативных регионов. При этом соотношение транзиции/трансверсии составило 3,416.

Для североафриканского вида *Adscita mauretanicus* обнаружено больше всего диагностических замен – 17. Методом ближайшего соседа наименьшая межвидовая дистанция определена между *A. mauretanicus* и *A. mannii* – 7,58 %. Последовательности COI экземпляров *A. mauretanicus* на дендрограмме оказались расположенными отдельно от всех остальных видов рода *Adscita*, обитающих в Европе и Азии, и примыкают к ветви рода *Jordanita* (хотя морфологические и биологические признаки

A. mauretanicus соответствуют другим представителям рода *Adscita*). Эти факты отражают длительную географическую изоляцию *A. mauretanicus*.

Обнаружено, что дистанция между представителями европейских популяций (включая Крым) *A. geryon* и экземплярами этого вида из южной Италии и Балканского полуострова оказалась больше, чем между крымскими экземплярами *A. geryon* и *A. albanica*. Данный факт требует дополнительного прояснения, так как последний вид очень хорошо отличается морфологически и биологически от *A. geryon*. Высокая степень внутривидовой дивергенции (4,24 %) была выявлена у *A. subdolosa*. Возможно, это связано с изоляцией популяций данного вида в различных горных системах Центральной Азии.

В соответствующем ДНК-штрихкоду участке COI длиной 219 аминокислот у рода *Adscita* выявлено 18 точек изменчивости (8,2 %). Показано, что из шести возможных переменных аминокислотных позиций, располагающихся достаточно близко к гему (расстояние менее 5 Å), у *Adscita* является переменной позицией 27. По данным литературы в этой позиции у Metazoa находится глутамин (с энтропией более 1), а у экземпляров исследуемого рода обнаружены треонин или аланин.

МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ НЕК293 ПРИ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ АНАЛОГОВ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК GAS5

Н.Д. Зинченко, Ю.И. Савиновская, М.С. Ермаков, А.А. Нуштаева, Е.В. Кулигина, Д.В. Семенов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Длинные некодирующие РНК (днРНК) являются важными участниками молекулярно-биологических процессов. Ген GAS5 (growth arrest specific 5) человека кодирует 10 C/D-боксов мРНК и днРНК GAS5. Известно, что уровень днРНК GAS5 снижен в клетках злокачественных опухолей человека. Повышение уровня днРНК GAS5 в раковых клетках приводит к снижению их пролиферативной активности и жизнеспособности, а также к активации проапоптотических процессов. Таким образом, днРНК GAS5 является перспективным объектом для создания новых подходов к диагностике и терапии онкологических заболеваний. Целью данной работы является анализ функций днРНК GAS5 в клетках человека в условиях эктопической экспрессии аналогов данной днРНК. Для этого клетки НЕК293 трансфицировали векторами, экспрессирующими аналоги днРНК GAS5, и проводили полнотранскриптомный анализ экспрессии поли-А-РНК (Pumina 1500). Установлено, что эктопическая экспрессия аналогов днРНК GAS5 в исследуемых клетках сопровождается повышением уровня 16S и понижением уровня 8S РНК. Установлено также, что транскрипция генов, экспрессия которых повышается в клетках НЕК293, контролируется факторами SUZ12 и EZH2, которые являются компонентами поликомб-комплекса PRC2. Модуляция активности PRC2 днРНК GAS5 указывает на участие этой РНК в процессах компактизации/декомпактизации хроматина, что позволяет предложить механизм проапоптотического действия этой днРНК в клетках человека, опосредованный эпигенетическими регуляторами SUZ12 и EZH2. Работа поддержана финансированием по бюджетному проекту ИХБФМ СО РАН № АААА-А17-117020210023-1.

РЕГУЛЯЦИЯ СПЛАЙСИНГА С ПОМОЩЬЮ МИКРОРНК И ЛЕЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Н.А. Логвина¹, Л. Фарберов², Н. Шомрон², Т.С. Зацепин^{1,3}

¹Сколковский институт науки и технологий, Москва; ²Тель-Авивский университет, Тель-Авив, Израиль;

³МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Альтернативный сплайсинг – важный клеточный процесс, во время которого различные транскрипты РНК генерируются из пре-мРНК за счёт альтернативного пропуска и включения экзонов. Это приводит к различным изоформам белка, которые различаются по своей структуре и функциям. Мы предлагаем новую модель регуляции сплайсинга, в которой пре-микроРНК влияют на связывание U1 РНП с 5'-сплайс-сайтом. Этот новый тип регуляции имеет терапевтический потенциал в сочетании с короткими олигонуклеотидными адаптерами, которые привлекают пре-микроРНК к целевому сайту сплайсинга и усиливают включение целевого экзона в зрелую мРНК. Использование естественного механизма и тканеспецифичных микроРНК без изменения уровня микроРНК в клетке позволяет достичь высокой специфичности и селективности, а также потенциально снизить побочные эффекты. Мы сравнили эффективность этого терапевтического подхода со стандартными методами альтернативной регуляции сплайсинга. Также был проведён анализ данных о моногенных заболеваниях, неправильно сплайсированных экзонах и экспрессии микроРНК, и определены экзоны и заболевания, которые потенциально могут регулироваться с использованием предложенного механизма.

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ТРИФЕНИЛФОСФОНИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРАМФЕНИКОЛА С РИБОСОМНЫМ ТУННЕЛЕМ

Г.И. Макаров¹, Н.В. Сумбатян²

¹Южно-Уральский государственный университет (НИУ), Челябинск;

²Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Хлорамфеникол (СНЛ) является антибиотиком, подавляющим биосинтез белка рибосомой, связываясь с её пептидилтрансферазным центром. Известно множество производных хлорамфеникола, полученных замещением его дихлорацетильного остатка; недавно были получены соединения САМ-Сп-ТРР, в которых дихлорацетильный остаток замещён алифатической кислотой, конъюгированной с трифенилфосфонием. Эти вещества не только подавляют трансляцию, но и легко проникают через клеточную мембрану за счёт трифенилфосфониевого (ТРР) фрагмента, сокращая мембранный потенциал. Подобно хлорамфениколу, САМ-Сп-ТРР не просто не исключают пептидилтрансферазную реакцию, но останавливают синтез пептида на определённых аминокислотных последовательностях. Мы исследовали взаимодействие САМ-С4-ТРР, САМ-С10-ТРР и САМ-С14-ТРР с неканоническим сайтом связывания СНЛ методами молекулярно-динамического моделирования и нашли, что все эти соединения способны устойчиво связываться с ним. При этом остаток СНЛ воспроизводит нековалентные взаимодействия

неканонически связанного СНL, а TRP фрагмент образует разбитый гидрофобный контакт с основаниями A2058-A2059, лежащими в сайте связывания макролидов. Наиболее стабильные взаимодействия наблюдались для SAM-C10-TRP, который показал наивысшую активность по подавлению трансляции *in vitro*. Это объясняется оптимальной длиной линкера, обеспечивающей синергическое связывание СНL и TRP фрагментов. Смоделированные нами структуры согласуются с экспериментальными данными о точке останова трансляции: в синтезированных до останова пептидах содержатся последовательности гидрофобных аминокислотных остатков, способные образовать гидрофобные контакты с находящимся вблизи TRP фрагментом SAM-Cn-TRP. Из-за этого растущий пептид может прочно связываться в туннеле, затрудняя трансляцию. Для матрицы trpL такое положение занимает последовательность A-4IF-2, для матрицы rst1 — последовательность W-5VT-3, и для матрицы rst2 последовательность F-5AI-3. Именно при таком взаимном расположении этих последовательностей и SAM-Cn-TRP наблюдалась наиболее выраженная остановка трансляции. Моделирование выполнялось на суперкомпьютере «Ломоносов-П» НИВЦ МГУ. Синтез и биологические испытания поддержаны грантом РФФИ №20-04-00873, вычисления — грантом Министерства науки и высшего образования FENU-2020-0019.

О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ЭРИТРОМИЦИНА В СВЕТЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ РИБОСОМЫ, СОДЕРЖАЩИХ СТОП-ПЕПТИДЫ

Т.М. Макарова

Южно-Уральский государственный университет, Челябинск, Россия

Рибосома – молекулярная машина, синтезирующая все клеточные белки по матрице мРНК, является мишенью около половины клинически используемых антибиотиков. При этом около половины рибосомных антибиотиков связывается в пептидилтрансферазном центре (ПТЦ) и верхней части рибосомного туннеля (РТ), препятствуя пептидилтрансферазной реакции (ПТР), как правило, после синтеза пептида определенной последовательности, именуемого стоп-пептидом. Наиболее изученным в этом отношении является антибиотик эритромицин со стоп-пептидами, регулирующим синтез Erm-метилтрансферазы, делающей рибосому резистентной к нему. С помощью молекулярно-динамического (МД) моделирования нам удалось установить детали того, как связывающийся в туннеле антибиотик может препятствовать ПТР. Были смоделированы рибосомы, содержащие ErmBL стоп-пептид на Р-тРНК и Lys-aa-тРНК в А-сайте непосредственно перед ПТР, как содержащие эритромицин, так и без него. В системах с ErmBL, но без эритромицина ССА-конец aa-тРНК встраивается в единую стэкинг-систему с т. н. А-спиралью (H92 23S рРНК), что фиксирует участника ПТР – аминокислотную группу лизина на aa-тРНК – вблизи от карбоксильного атома последней аминокислоты из ErmBL на Р-тРНК, с которым она должна выполнять новую пептидную связь. Химические реакции не протекают в классическом моделировании МД, однако, во всех траекториях без эритромицина атомы новой потенциальной связи стабильно удерживались на расстоянии 3–4 Å. В системах же с эритромицином происходили конформационные перестройки: через воздействие антибиотика на пару G2505–C2610 остатков 23S рРНК в РТ А-спираль смещалась вниз и растягивалась, что приводило к вытеснению ССА-конца тРНК из стэкинг-взаимодействий и замещения его стэкинг-взаимодействием оснований самой вершины А-спирали. В результате вытеснения тРНК из А-сайта субстраты ПТР теряли четкую ориентацию друг относительно друга и атомы, что должны были образовать пептидную связь, расходились на 6 и более Å. Наблюдаемые перестройки происходят в соответствии с данными мутагенеза остатков РТ и соответствуют современному представлению об остановке ПТР через снижение сродства А-сайта к тРНК. Расчеты были проведены с помощью суперкомпьютера «Ломоносов-П» МГУ им. М.В. Ломоносова. Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования (FENU 2020-0019).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ G4/ИМ-СИНАПТИЧЕСКИХ СТРУКТУР С ФАКТОРАМИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА

В.В. Северов, Н.А. Баринев, Г.Е. Позмогова

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Последовательности, потенциально способные формировать G-квадруплексы (PQS), в геномах эукариот часто колокализованы с сайтами связывания CTCF (СССТС-связывающий фактор), который является ключевым архитектурным белком, регулирующим демаркацию топологически ассоциированных доменов [1]. Ранее нами было обнаружено, что ДНК-дуплексы, несущие PQS, способны к самопроизвольному формированию G4/ИМ-синаптических комплексов за счет фолдинга межмолекулярных G4 и/или ИМ структур (материалы готовятся к публикации). В данной работе было исследовано взаимодействие CTCF с дуплексными ДНК, несущими консенсусный сайт связывания CTCF и/или PQS методом атомно-силовой микроскопии высокого разрешения. Показано, что образующиеся G4/ИМ-синаптические комплексы способны связываться с CTCF, при этом последний, по-видимому, не участвует в их формировании/стабилизации. Также были обнаружены различные CTCF/ДНК ассоциаты, в которых белок связывает несколько дуплексов/участков дуплекса, что согласуется с литературными данными [2]. Но при этом мы показали, что при недостатке CTCF, он преимущественно связывает ДНК между собой за счет взаимодействия с консенсусными последовательностями. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что образование G4/ИМ-синаптических комплексов может быть одним из факторов, влияющих на архитектуру хроматина. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ [19-15-00024].

[1] Hou Y. et al. (2019) *Epigenetics*, 14, 894-911.

[2] Mawhinney M.T. et al. (2018) *J. Mol. Biol.*, 430, 759-776.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ КАРТИРОВАНИЕ УЧАСТКОВ ДНК, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С БЕЛКАМИ, НУКЛЕОИДА *Mycoplasma gallisepticum*

Т.А. Семашко

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Mycoplasma gallisepticum является удобным модельным объектом для изучения бактерий с редуцированным геномом. У микоплазм отсутствуют многие известные структурные белки нуклеоида, а также регуляторы транскрипции, однако они являются успешными патогенами и могут как культивироваться в лабораторных условиях, так и длительное время выживать в организме хозяина. Целью данной работы являлось полногеномное картирование участков ДНК, взаимодействующих с белками, нуклеоида *Mycoplasma gallisepticum* для изучения архитектуры нуклеоида бактерий с редуцированным геномом. Исследование проводилось методом футпринтинга ДНК для нуклеоида, выделенного из культуры *M. gallisepticum* с синхронным делением в логарифмической и стационарных фазах роста. Определение структурно доступных участков ДНК проводилось с помощью расщепления ДНКазой I. В качестве контроля использовались данные расщепления ДНКазой свободной ДНК. Полученные фрагменты были секвенированы с помощью высокопроизводительной технологии Illumina. Обсчёт доступных мест для расщепления ДНКазой I в геноме *M. gallisepticum* проводился для положений 5'-концов фрагментов ДНК. Таким образом, в данной работе получены профили генома в логарифмической и стационарной фазе роста клеточной культуры, которые потенциально могут быть связаны с белками. Для обеих фаз роста профили глобально совпадают. Аннотированы белки, закодированные в открытых и структурно закрытых участках генома. В отличие от структуры нуклеоида в логарифмической фазе роста, в стационаре фрагменты генома менее доступны для расщепления ДНКазой I, т.е. сильнее связаны с белками, особенно ярко это демонстрируется на примере участка ориджина репликации *M. gallisepticum*. Работа поддержана грантом РФФИ 19-74-10105.

РАЗРАБОТКА АФК-ИНДУЦИРУЕМЫХ МИРНК ДЛЯ РНК ТЕРАПИИ

О. Сергеева¹, Дж.Руле², Т. Абакумова¹, И. Клемт², А. Мохир², Т. Зацепин^{1,3}

¹Сколковский институт науки и технологии, Сколково; ²Университет Эрлангена-Нюрнберга, Германия;

³МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Малые интерферирующие РНК (миРНК) стали новым классом лекарственных средств - несколько препаратов уже получило одобрение FDA и EMA, в России пока одобрен только нусинерсен. Одним из основных ограничений для разработки новых препаратов является адресность доставки, благодаря которой реализуется избирательность воздействия на определенные органы. В случае онкологических заболеваний отдельной проблемой остается селективность воздействия только на трансформированные клетки при минимальном воздействии на здоровые ткани.

Мы разработали 5'-блокированные миРНК (про-миРНК), активация которых будет возможна только при высоком уровне активных форм кислорода (АФК). В качестве защитных групп антисмысловой цепи миРНК были использованы соединения на основе фенолборной кислоты, которые ранее были успешно использованы для защиты гидроксильных/фенольных групп в пролекарствах на основе малых молекул [S. Daum et al, 2017; S. Li et al, 2020]. АФК-активируемые миРНК показали свою активность *in vitro* в присутствии перекиси водорода – индуктора АФК. Были получены липидные частицы с про-миРНК на основе липидоида C12-200 для адресной доставки в печень и проведена оценка токсичности АФК-зависимых миРНК при однократном и многократном введении липидных наночастиц здоровым животным. Анализ крови (определены уровни АСТ, АЛТ и билирубина), биораспределение, а также гистологические исследования срезов печени с окрашиванием эозином/гемаксилином не показал разницы между про-миРНК и свободными миРНК, используемыми в качестве контроля. При хроническом введении частиц с про-миРНК наблюдается их небольшая активация, что скорее всего связано с появлением небольшого количества АФК, вызванное развитием воспалительного ответа в печени в ответ на длительное воздействие липидных частиц. В контрольной же группе после введения частиц с инкапсулированными свободными миРНК наблюдалось эффективное ингибирование мишени (80±5%). Таким образом данный подход позволяет селективно подавлять экспрессию мишеней *in vitro* и *in vivo* при наличии повышенного уровня активных форм кислорода. Финансирование исследования: РФФИ 19-44-04111.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ АДЕНОЗИНА (m6A) В МРНК НА КЭП-ЗАВИСИМУЮ ИНИЦИАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ

Е.А. Смолин, Д.Н. Лябин

Институт белка РАН, Пущино

Каноническая эукариотическая инициация трансляции начинается со связывания 43S инициаторного комплекса с 5'-концом мРНК через формирование цепочки взаимодействий кэп-eIF4E-eIF4G-eIF3-40S. Последующий этап сканирования 5'-НТО области мРНК обеспечивает поиск инициаторного кодона. Затем происходит сборка 80S рибосомы и переход к следующей стадии трансляции - элонгации. Один из основных способов глобальной регуляции инициации трансляции основан на регуляции взаимодействия мРНК с инициаторным комплексом eIF4F (состоящего из 4A,4G,4E). Так, в результате действия различных клеточных стрессов (аминокислотное голодание, гипоксия и т.п.) снижается активность mTOR киназы, одной из основных мишеней которой является 4E-связывающийся белок (4EVP). В дефосфорилированном состоянии этот белок имеет большее сродство к кэп-связывающему фактору eIF4E и препятствует его вхождению в 4F комплекс. Тем самым подавляется инициация трансляции по кэп-зависимому механизму. В последние годы появляются данные о влиянии m6A - модификации в мРНК на регуляцию ее трансляции. В случае если m6A расположен в 5'-НТО мРНК, то он может способствовать кэп-независимой инициации трансляции за счет взаимодействия с eIF3 [Meyer, K.D. 2015]. Так же было показано, что мРНК чувствительные к ингибированию mTOR практически не метилированы [Dominissini, D. 2012] и, возможно, поэтому более кэп-зависимы и чувствительны к инактивации eIF4E. Более того, было показано, что при нокауте метилазы METLL3 тотальный белковый синтез становится более чувствительным к ингибиторам mTOR, или, другими словами, глобальная трансляция становится более кэп-

зависима. В настоящей работе исследовалось влияние т6А - модификации в мРНК на регуляцию ее трансляции в бесклеточной системе трансляции (БСТ) в нормальных условиях и в условиях ингибирования кэп-зависимой инициации. Нами было показано, что т6А - модифицированная мРНК менее чувствительна к ингибированию кэп-зависимой инициации трансляции, вызванная добавлением в БСТ кэп-аналога или же ингибированием mTOR киназы. Так же нами было продемонстрировано, что т6А -метилированная мРНК менее чувствительна к добавлению в БСТ мутантного белка eIF4A (R362Q) и гиппуристана, ингибиторов АТФ-зависимого сканирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-34-90047.

САЙТ-НАПРАВЛЕННОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК ПЕТЛЕОБРАЗУЮЩИМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-ПЕПТИДНЫМИ КОНЪЮГАТАМИ

Я.Ю. Староселец¹, Б. Амирлоо², С. Юсаф², А. Ломзов¹, К. К. Буруско², Е.В. Биченкова², Д. Кларк², М.А. Зенкова¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²School of Health Sciences, Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

Олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (ОПК) представляют собой особый класс искусственных рибонуклеаз (аРНКаз) сайт-направленного действия, способных к селективному расщеплению терапевтически значимой РНК-мишени. В состав ОПК входят два домена: РНК-узнающий олигонуклеотид, обеспечивающий селективность расщепления посредством гибридизации с целевой РНК, и каталитическая группа, расщепляющая фосфодиэфирную связь. Функции каталитической группы выполняет короткий амфифильный пептид (9–10 аминокислотных остатков), состоящий из чередующихся остатков лейцина и аргинина. Исследованы гибридизационные свойства и рибонуклеазная активность нескольких типов петлеобразующих конъюгатов (bulge-inducing conjugates, BCs), направленных против ТЧС-стебля дрожжевой тРНК^{Phe}. Лучшие структурные варианты ОПК расщепляли до 100% РНК-мишени за 24 ч, причем расщепление наблюдалось как по целевому участку C61-G65, так и вне его по связям, сближенным вследствие третичной структуры тРНК^{Phe}. Несмотря на то, что не удалось провести реакцию расщепления полноразмерной дрожжевой тРНК^{Phe} в каталитическом режиме, на более простой модели, повторяющей только фрагмент тРНК^{Phe}, было показано, что петлеобразующие ОПК расщепляют РНК каталитически, причем каждая молекула конъюгата расщепляет до 10 молекул РНК-мишени. Анализ кинетических параметров взаимодействия петлеобразующих конъюгатов с такими РНК-мишенями показал, что эффективность каталитической реакции постепенно снижается вследствие ингибирования расщепления продуктами реакции. На основе анализа степени и паттерна расщепления тРНК^{Phe} различными структурными вариантами ОПК, а также молекулярного моделирования взаимодействия конъюгатов с РНК-мишенью определены требования к структуре петлеобразующих ОПК: 1) присоединение 1–3 пептидов к олигонуклеотиду посредством аминокислотных линкеров через С1'-атомы рибозы АР-сайтов в α - или в β -конформации; 2) индукция формирования 3–5-звенной петли в структуре РНК-мишени, необходимой для приведения расщепляемой связи в конформацию «в линию», обеспечивающую расщепление; 3) использование вставок остатков глицина в структуру пептида для обеспечения конформационной подвижности пептида. *Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-14-00250.*

CRISPR/Cas9-НАПРАВЛЕННЫЙ НОКАУТ ВЫЯВИЛ РОЛЬ ГЕНОВ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК В СОЗРЕВАНИИ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНА-ХОЗЯИНА

А.М. Матвеева^{1,2}, Д.И. Виноградов^{1,2}, Е.С. Журавлев¹, Д.В. Семенов¹, Л.В. Крайникова^{1,2}, К.С. Ануфриева³, С.Ю. Маланин⁴, Т.В. Григорьева⁴, В.А. Рихтер¹, В.В. Власов¹, Г.А. Степанов^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск; ³ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва; ⁴Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Ген длинной некодирующей РНК GAS5 (Growth Arrest Specific 5), содержит в своих интронах гены 10 малых ядрышковых С/D-боксов-РНК (мяРНК), канонической функцией которых является участие в 2'-О-метилировании рРНК. В результате событий альтернативного сплайсинга описано формирование многочисленных вариантов зрелых изоформ GAS5, что вызывает интерес к изучению регуляции пост-транскрипционного созревания на модели гена GAS5. Первоначально с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 на основе клеток человека 293FT были получены клеточные линии, содержащие мутации в индивидуальных генах SNORD. При анализе набора культур было установлено, что при точечных изменениях в SNORD75 и SNORD81 в клетках формируются новые формы сплайсинга гена-хозяина GAS5. Биоинформатический анализ данных выявил, что мутации в генах SNORD75 и SNORD81 приводили к удалению консенсусного мотива, необходимого для связывания с т6А-метилтрансферазным комплексом METTL3/METTL14, что, по-видимому, и вызвало формирование новых продуктов альтернативного сплайсинга [1]. Кроме того, была получена коллекция клеточных линий, содержащих различные типы мутаций в гене SNORD74. При транскриптомном анализе было показано, что в клеточных линиях происходило значительное подавление вплоть до полного нокаута как зрелой днкРНК GAS5, так и всех малых ядрышковых РНК, закодированных в интронах гена GAS5. Далее были получены клеточные линии, содержащие протяженные делеции в гене GAS5. Транскриптомный анализ подтвердил нокаут сразу нескольких малых ядрышковых РНК в моноклональных линиях. При этом протяженные делеции, фланкированные фрагментами генов SNORD, приводили к созреванию укороченных форм длинной некодирующей РНК GAS5, содержащей только оставшиеся экзоны. Полученные результаты указывают на особую регуляторную роль генов малых ядрышковых РНК в регуляции ядерных стадий экспрессии гена-хозяина и возможность разработки стратегии направленной регуляции созревания заданных генов за счет редактирования генов малых ядрышковых РНК, расположенных в интронах. *Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-29-07073.*

1. Filippova J.A. et al. (2019) *Front. Pharmacol.* 10, 1246.

НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ДНК И РНК, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПО ФОСФАТНОЙ ГРУППЕ: ПОЛУЧЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

А.А. Фокина^{1,2}, А.Ш. Держалова^{1,3}, О.А. Марков³, Я. Шиохама⁴, Е.А. Буракова^{1,2}, С.Н. Бизяев^{1,5}, М. Фудзии⁶, Т.С. Зацепин^{7,8}, М.А. Зенкова³, Д.А. Стеценко^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск; ²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; ³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ⁴Университет Рюкю, Нишихара, Окинава, Япония; ⁵Институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск; ⁶Университет Киндай, Фукуока, Япония; ⁷Сколковский институт науки и технологий, Москва; ⁸МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Были получены новые производные ДНК и РНК, которые содержали 1-4 липофильные группы, а именно додецилфенильную или гексадецильную, в межнуклеотидных положениях вблизи 3'- или 5'-конца. Олигонуклеотиды были синтезированы путем автоматизированного твердофазного синтеза с использованием для введения модификаций реакции Штаудингера с соответствующим сульфонилазидом, и охарактеризованы офВЭЖХ, электрофорезом в ПААГ и масс-спектрометрией MALDI-TOF. Олигодезоксирибонуклеотиды, содержавшие одну или две липофильные группы рядом с 5'-концом, не проявили цитотоксичности до 20 мкм для макрофагов мыши RAW 264.7 или человека и поглощались клетками гораздо эффективнее, чем немодифицированный аналог. По данным лазерной конфокальной микроскопии, олигонуклеотиды локализовались в цитозоле в основном в эндосомах. Количество интернализированного олигонуклеотида зависело от типа модификации и клеточной линии. Олигонуклеотиды с гексадецильными группами проникали в клетки лучше, чем таковые с додецилфенильными группами, причем те, что несли две липофильные группы, захватывались клетками более эффективно, чем аналогичные производные с одной группой. Были также получены модифицированные малые интерферирующие РНК (siРНК), нацеленные на ингибирование биосинтеза гликопротеина RGMa, которые содержали две липофильные группы рядом с 3'-концом пассажирской цепи или четыре группы на 3'-концах обеих цепей. SiРНК с двумя липофильными группами показали аналогичную активность по подавлению экспрессии RGMa в клетках рака поджелудочной железы PK-59, как и немодифицированная анти-RGMa siРНК, в то время как siРНК, содержавшие четыре модификации в обеих цепях, были менее активны. SiРНК с двумя гексадецильными группами показала наиболее высокую ингибиторную активность [1]. Эта работа финансировалась грантом РФФИ № 19-74-30011 (цитотоксичность, конфокальная микроскопия), грантом РФФИ № 18-515-57006 (синтез РНК), Министерством науки и высшего образования РФ (проект Новосибирского государственного университета № FSUS-2020-0035, синтез олигодезоксирибонуклеотидов) и грантом Японского фонда медицинских исследований № 2018JP002 (биологическая активность).

1. Derzhalova A., Markov O., Fokina A., Shiohama Y., Zatsepin T., Fujii M., Zenkova M., Stetsenko D. Appl. Sci. 2021, 11, 1174. DOI: 10.3390/app11031174

РАЗНЫЕ УЧАСТКИ БЕЛКА Xmas-2, ОСНОВНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ TREX-2 КОМПЛЕКСА ЭКСПОРТА мРНК, УЧАСТВУЮТ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С мРНК ЧАСТИЦАМИ В НУКЛЕОПЛАЗМЕННОЙ И АССОЦИИРОВАННОЙ С ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНОЙ ФРАКЦИЯХ

М.М. Куршакова, Д.В. Копытова

Институт биологии гена РАН, Москва

Белковый комплекс TREX-2 является ключевым участником экспорта мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры. Ранее у *D. melanogaster* был выделен белковый комплекс, состоящий из комплекса TREX-2 и комплекса ORC, показано, что белки ORC взаимодействуют с мРНК частицей TREX-2-зависимым образом и необходимы для экспорта мРНК (Kopytova et al., 2016). Из всех белков ORC, входящих в состав TREX-2-ORC комплекса, с белком Xmas-2, платформой для сборки TREX-2 комплекса, наиболее эффективно взаимодействовал белок Orc3. Мы исследовали, какие участки Xmas-2 осуществляют взаимодействие с Orc3 и мРНК. Были созданы экспрессионные конструкции, кодирующие различные участки белка Xmas-2 в одной рамке считывания с FLAG-эпитопом в S2 клетках. Показано, что взаимодействие Xmas-2 и Orc3 в составе TREX-2-ORC комплекса осуществляется через С-концевую область Xmas-2, расположенную с 3'-стороны от CID-домена белка. N-конец Xmas-2 и содержащиеся там RRM-, M-домены не являются необходимыми для взаимодействия Xmas-2 с Orc3 (Куршакова и др., 2021). Затем исследовали, какие области Xmas-2 необходимы для взаимодействия с мРНК частицами. Так как TREX-2 присутствует как в нуклеоплазме, так и ассоциирован с ядерными порами, то сравнили взаимодействие Xmas-2-FLAG фрагментов с мРНК в ядерной и ассоциированной с ядерной мембраной фракциях. Результаты, полученные в экспериментах по соосаждению мРНК совместно с Xmas-2-FLAG фрагментами антителами к FLAG-эпитопу с количественным определением связанной РНК (RIP) и экспериментах по непосредственному связыванию с РНК-зондами Xmas-2-FLAG белков из двух типов фракций, указывают на то, что взаимодействие Xmas-2 с мРНК частицами происходит по-разному внутри ядра и вблизи ядерной поры. В нуклеоплазме для взаимодействия Xmas-2 с мРНК частицами необходимы области, расположенные как на N-конце белка, так и на С-конце белка. В ассоциированной с ядерной порой фракции для включения в мРНК частицу достаточно области Xmas-2, включающей CID-домен и С-концевую последовательность с 3'-стороны от него. Такие отличия во взаимодействии Xmas-2 с мРНК могут быть обусловлены реорганизацией TREX-2-ORC комплекса в связанном с ядерной порой состоянии. Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 19-04-00861).

ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Конкурс молодых ученых

КОНСТРУИРОВАНИЕ *PSEUDOMONAS PUTIDA* BS3701, ДЕФЕКТНОГО ПО *prgf*[4]

Т.Н. Абрамова, И.Ю. Позднякова-Филатова

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

В ходе изучения влияния дефицита железа на катаболизм нафталина бактерией *Pseudomonas putida* BS3701 возникла необходимость создания штамма, дефектного по гену *prgf*[4] – регуляторная некодирующая РНК, являющаяся гомологом *prf* 2. В качестве первоначального подхода использовался метод рестриктазно-лигазного клонирования в плазмиды *pEX18Gm* и *pEX18Tc* фрагмента, содержащего ген интереса, а также участки *upstream* и *downstream* размером 500 п.н. каждый. В качестве сайтов рестрикции выступали *Bam*HI/*Sal*I. Так как мультиклональный сайт входит в состав кодирующей последовательности *lacZ α* , то для селекции рекомбинантных плазмид можно использовать индикаторную среду *X-gal*. После трансформации *DH5 α* лигазной смесью на чашках с тетрациклином не обнаружили колоний, на чашках с гентамицином обнаружили около 40 колоний, 3 из которых были синего цвета. Для постановки ПЦР использовали универсальные праймеры *M13dirL* и *M13r*, в качестве контроля использовали колонии синего цвета. На геле, после проведения электрофореза, наблюдали продукт длиной около 125 пн для контрольных образцов, в остальных случаях ампликон отсутствовал. После выделения и гидролиза плазмид по сайтам *Bam*HI и *Hind*III не было получено ни одного фрагмента ожидаемого размера. Предположительно после попадания в клетки *E. coli* фрагмента ДНК *P. putida* BS3701, содержащего полноразмерный ген *prgf*[4] с собственным промотором, в рекомбинантных плаزمиде происходят неизвестные перестройки, из-за которых меняется размер плазмиды, исчезает один из сайтов *Pst*I, пропадают участки, комплементарные праймерам *M13dirL* и *M13r*. В связи с этим появилась необходимость сменить стратегию конструирования рекомбинантной плазмиды на такую, при которой будут клонированы лишь фрагменты *upstream* и *downstream*, но не сам ген *prgf*[4] с собственным промотором. В качестве альтернативного метода была использована T5 экзонуклеаз-зависимая сборка (TEDA), плазида *pEX18Gm* была использована в качестве плазмидного вектора. Отбор колоний клеток *DH5 α* проводился на среде *X-gal*. Данный способ сборки позволил получить вектор, содержащий фрагменты *upstream* и *downstream*, наличие которых подтверждали с помощью ПЦР с использованием праймеров *M13dirL* и *M13r*. Секвенирование позволило установить верность последовательности нуклеотидов во вставке рекомбинантной плазмиды.

СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЭЛЕМЕНТОВ SINE И LINE ОБЕСПЕЧИВАЕТ ИНГИБИРОВАНИЕ МЕТАСТАЗОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ ОПУХОЛЕЙ

Л.А. Алексеева, А.В. Сенькова, Н.Л. Миронова, М.А. Зенкова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Накоплено большое количество данных о составе циркулирующих внеклеточных ДНК (внДНК) в крови высших организмов при различных патологических состояниях, но биологическая функция внДНК еще остается предметом дискуссии. Известно, что опухоль-ассоциированные внДНК играют важную роль на разных стадиях опухолевой прогрессии, могут участвовать в злокачественной трансформации здоровых клеток и способствовать миграции и инвазии опухолей. В составе внДНК детектируют SNP протоонкогенов и онкосупрессоров, изменение характера метилирования ДНК, обогащенность фрагментами онкогенов и другими специфическими фрагментами ДНК, такими как тандемные повторы и мобильные генетические элементы. Неоднократно было отмечено, что в клетках опухоли и в пуле внДНК возрастает представленность мобильных генетических элементов – коротких диспергированных элементов (SINE), и реже длинных (LINE). Есть предположения, что SINE и LINE являются регуляторами, которые активируют онкогены и подавляют онкосупрессоры, а вставки или делеции различных SINE и LINE также приводят к развитию или подавлению различных форм рака и других заболеваний. Однако роль SINE и LINE в метастазировании пока не выяснена. В данной работе на моделях опухолей мышей – карциномы легких Льюис, меланомы B16 и лимфосаркомы RLS40, показано, что прогрессирование опухолей сопровождается увеличением уровня элементов SINE и LINE в пуле циркулирующих внДНК. Применение препаратов, разрушающих ДНК, в виде их внутримышечных инъекций животным-опухоленосителям, вызывало снижение и размера первичного опухолевого узла (в 1,5–2 раза), и количества и площади метастазов в печени и легких (в 3 – 10 раз), а также приводило к значительному (в 5–10 раз) уменьшению концентрации SINE и LINE. Кроме того, было показано, что фрагменты SINE и LINE в составе внДНК, выделенной из крови мышей с карциномой легких Льюис, способны проникать в клетки человека, что свидетельствует, во-первых, о возможности межвидового переноса ДНК, во-вторых, о возможном стимулирующем либо онкотрансформирующем действии SINE и LINE. Результаты показывают, что SINE и LINE могут быть важными участниками метастазирования, что позволяет рассматривать их как новые привлекательные мишени для противоопухолевой терапии. *Работа поддержана грантом РФФИ 19-74-30011.*

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК ДЛЯ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/Cas9

Е.А. Ахметова¹, Н.А. Логвина¹, Т.С. Зацепин^{1,2}

¹Сколковский институт науки и технологий; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Нецелевое расщепление мишени системой CRISPR/Cas9 является ключевым недостатком метода геномного редактирования, который ограничивает его применение в терапии. Для того, чтобы снизить нецелевой эффект, без существенной потери в эффективности редактирования *in vivo*, в направляющие РНК вносят модификации. Также известны мутантные форма белка Cas9 с повышенной специфичностью. К существующим паттернам модификаций sgРНК мы предлагаем добавлять алкансуль-

фонильные модификации, которые обладают рядом преимуществ над широко распространенными тиофосфатными модификациями. Мы считаем, что комбинация модифицированных РНК с известными мутантными формами Cas9 позволит повысить, как селективность, так и эффективность редактирования генома. Таким образом, цель нашего исследования – улучшить безопасность и эффективность геномного редактирования системой CRISPR/Cas9 посредством использования селективных мутантов Cas9 с химически модифицированными гидовыми РНК. В ходе работы были проанализированы 2 библиотеки сгРНК для мишени зеленого флуоресцентного белка, содержащие одиночные мезильные (метансульфонильные) и бузильные (бутансульфонильные) модификации во всех положениях внутри спейсерной части РНК. На основе данных об эффективности *in vitro* для библиотек к GFP мишени, были получены библиотеки к PCSK9 (пропротеиновая конвертаза), которая является перспективной терапевтической мишенью. В качестве мутантных белков Cas9 с повышенной селективностью использовали Sniper и Hi-Fi Cas9. Введение мезильных модификаций в меньшей степени сказывается на эффективности расщепления мишени системой CRISPR/Cas9 по сравнению с более объемной бузильной модификацией. Однако, для многих положений РНК, направленной на мишень PCSK9, эффективность разрезания осталась достаточно высокой даже в случае вставок бузильных групп. В ходе работы для обеих модификаций определены участки гидовой РНК, которые наиболее толерантны к модификациям. На основе этих результатов получены РНК с множественными мезильными и бузильными модификациями. Комбинация высокоселективных эндонуклеаз Cas9 и РНК с множественными алкансульфонильными модификациями потенциально может привести не только к эффективному, но и специфичному расщеплению ДНК *in vivo*. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-04-00298.

ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ПРОФИЛЯ *ESCHERICHIA COLI* K-12 SUBSTR. MG1655 В ОТВЕТ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ИММУНОГЛОБУЛИНОМ А *IN VITRO*

И.А. Байчурина¹, М.И. Маркелова¹, М.Н. Синягина¹, А.В. Лайков¹, Е.А. Булыгина¹, Я.К. Семин², А.А. Круглов^{2,3},
Д.С. Матюшкина⁴, В.А. Мусарова⁴, Т.В. Григорьева¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва; ³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Центр точного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины, Москва; ⁴ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Иммуноглобулин А (IgA) секретируется В-лимфоцитами слизистой оболочки кишечника для предотвращения вторжения патогенов и воспаления эпителия. Нарушения мукозального иммунитета ассоциированы с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), при которых часто отмечают увеличение доли *Escherichia coli*. Нами ранее было показано, что на геномном уровне вирулентный потенциал штаммов *E. coli*, выделенных из фекалий пациентов с ВЗК и здоровых людей, не отличается. В связи с этим, целью данного исследования являлось определение влияния секреторных IgA на *E. coli* K-12 substr. MG1655 *in vitro* методом транскриптомного анализа. Для этого 1,2x10⁸ клеток инкубировали с моноклональными IgA (300 мкг) и с фосфатно-солевым буфером (контроль) 1 час при 25°C. Тотальную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Деплецированные по рРНК библиотеки секвенировали на NextSeq 500. Полученные риды картировали на референсный геном *E. coli* MG1655 с помощью программы Bowtie2, подсчет производили с помощью featureCounts. Анализ дифференциально экспрессирующихся генов проводили с помощью пакета Deseq2. Было установлено, что воздействие IgA приводит к достоверному изменению экспрессии 517 генов ($p < 0,05$): экспрессия 253 генов увеличивалась и 264 генов - снижалась. Анализ показал, что инкубация с антителами приводит к увеличению экспрессии генов *hesA* и *lexA*, играющих ключевую роль в репарации ДНК и выживании бактерий. Наблюдалась повышенная экспрессия регуляторного гена *cusB*, участвующего в метаболизме цистеина. Также было отмечено увеличение экспрессии гена поверхностного белка *Wor*, являющегося одним из факторов вирулентности. Установлено снижение экспрессии генов *mtlA*, *nagE*, *ctr*, *manY* и *murP*, которые входят в фосфотрансферазную систему, участвующую в транспорте углеводов и важную для колонизации кишечника патогенами. Таким образом, взаимодействие IgA и *E. coli* приводит к изменению экспрессии ряда регуляторных белков и факторов вирулентности, способствующих эффективной колонизации кишечного эпителия.

Исследование выполнено за счет средств субсидии, выделенных Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности № 0671-2020-0058.

КООРДИНИРОВАННОЕ УЧАСТИЕ ГЕНОВ микроРНК, НО НЕ ДРУГИХ ГЕНОВ ИМПРИНТИРОВАННОГО ЛОКУСА DLK1-DIO3, В РАЗВИТИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Н.М. Баулина¹, А.Р. Кабаева², О.О. Фаворова¹

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ; ²Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва

Использование высокопроизводительного секвенирования в качестве скринингового метода позволило выявить повышенную экспрессию большого количества генов микроРНК из импринтированного локуса DLK1-DIO3 в мононуклеарных клетках периферической крови (МНК) больных с ремиттирующим рассеянным склерозом (РС) по сравнению со здоровыми контролями; эти изменения наблюдались у мужчин, но не у женщин [Baulina et al, 2019]. Помимо 54 генов микроРНК, этот локус содержит белок-кодирующие гены (DLK1, RTL1, DIO3), гены длинных некодирующих РНК (MEG3, MEG8, MEG9) и малых ядерных РНК (SNORD112, SNORD113, SNORD114). Гены импринтированных локусов обычно характеризуются координированной регуляцией экспрессии и как правило сообща участвуют в биологических процессах. Чтобы оценить, реализуется ли принцип универсальной согласованной экспрессии всех генов локуса в случае РС, провели комплексный анализ экспрессии в МНК генов микроРНК, белок-кодирующих и белок-некодирующих генов более чувствительным методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени. Анализ экспрессии 17 генов микроРНК (miR-431, -127-3p, -379, -376c, -381, -410, -656, -337-3p, -370, -655, -494, -323b-3p, -654-3p, -539, -668, -300 и -380) из локуса DLK1-DIO3 с последующим

ANOVA и post-hoc анализом показал повышение уровней этих микроРНК у мужчин с РС по сравнению со здоровыми мужчинами (0.944.06, $\text{padj} < 0.05$). У женщин уровни микроРНК в двух группах не различались. Корреляционный анализ выявил у здоровых мужчин и женщин 23% и 55% коррелированных пар микроРНК, соответственно, и 80% и 90% пар - у больных РС ($r > 0.52$, $p < 0.05$). Анализ экспрессии генов DLK1, RTL1, DIO3, MEG3, MEG8, MEG9, SNORD112, SNORD113 и SNORD114 не показал отличий в их уровнях у больных РС от здоровых контролей, как у мужчин, так и у женщин. Полученные результаты указывают на гендер-специфическую координированную вовлеченность по крайней мере 17 генов микроРНК, но не других генов локуса DLK1-DIO3, в развитие РС. Дальнейшее исследование изменений в экспрессии генов микроРНК в субпопуляциях МНК и влияния импринтинга на этот феномен могут расширить представления о происхождении полового диморфизма и причинах “недостающей наследуемости” при РС. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (грант №20-75-00046).*

ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ ПОЛИ(А) ХВОСТА ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ мРНК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ И СКВОЗНОГО ЧТЕНИЯ СТОП КОДОНОВ

Н.С. Бизяев, Т.В. Егорова, Е.Е. Соколова, А.В. Шувалов, Е.З. Алкалаева

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

Поли(А) хвост является важной структурой мРНК, необходимой для её трансляции. С ним связывается поли(А)-связывающий белок (РАВР), который взаимодействует как с факторами инициации трансляции, так и с фактором терминации трансляции eRF3a, активируя как инициацию, так и терминацию трансляции. мРНК в клетках эукариот имеют различную длину поли(А) хвоста, которая для каждой молекулы мРНК, кроме того, динамически изменяется. В некоторых работах [1-2] уже было показано, что длина поли(А) хвоста положительно коррелирует с эффективностью трансляции в целом в определенных условиях и клетках. Однако, в свете того, что РАВР может влиять на различные этапы трансляции, а также на системы деградации мРНК, влияние длины поли(А) хвоста именно на терминацию трансляции оставалась не исследованной. Используя реконструированную систему эукариотической трансляции, мы обнаружили, что РАВР, связанный с мРНК, активирует процесс формирования терминационного комплекса лишь на матрицах с поли(А)-хвостом длиной в 50 нуклеотидов и более, когда на мРНК может быть связано не менее 2 молекул РАВР. Также в лизатах для мРНК с различной длиной поли(А) хвоста мы определили уровень сквозного чтения преждевременного стоп кодона, конкурирующий с процессом терминации трансляции. Мы обнаружили, что уровень сквозного чтения наименьший для матриц с поли(А)-хвостом средней длины, для которых в данном лизате наблюдается максимальный уровень трансляции в отсутствие преждевременного стоп кодона. Таким образом, длина поли(А)-хвоста участвует регуляции терминации трансляции в клетке как на природных, так и преждевременных стоп кодонах. *Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-74-10078.*

1. Alekhina O.M. et al. Functional cyclization of eukaryotic mRNAs // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Т. 21. – №. 5. – С. 1677.
2. Subtelny A.O. et al. Poly (A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control // *Nature*. – 2014. – Т. 508. – №. 7494. – С. 66-71.

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ мРНК U6 НА КИНЕТИКУ СПЛАЙСИНГА

А.К. Болихова¹, С.С. Марьясина², А.Ю. Руденко³, О.А. Донцова^{4,5}, П.В. Сергиев^{2,4,5}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²Институт функциональной геномики, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Высший химический колледж РАН, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева; ⁴Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁵Сколковский институт науки и технологий, Москва

Одним из наиболее распространенных типов модификаций РНК, играющим к тому же важную роль в жизнедеятельности клетки, является метилирование. Ферменты, переносящие метильную группу от кофактора на молекулу РНК, называются РНК-метилтрансферазами. Посттранскрипционное метилирование может оказывать значительное влияние на функционирование молекулы РНК, поэтому изучение роли каждой модификации является важным для понимания природы разнообразных внутриклеточных процессов. Ранее нашей группой была идентифицирована метилтрансфераза (МТ), отвечающая за метилирование гуанозина в 72-м положении малой ядерной РНК (мяРНК) U6 человека. Данная мяРНК входит в состав сплайсосомного комплекса. Метилирование сплайсосомных РНК может оказывать влияние на скорость сплайсинга, причем степень проявления данного эффекта варьирует для различных интронов. В настоящей работе мы постарались понять, как модификация m2G72 в сплайсосомной РНК U6 влияет на сплайсинг. Для сравнения скорости сплайсинга были выбраны интроны, сплайсинг которых наиболее сильно нарушается при исчезновении метилирования U6. Для выбора таких интронов мы сравнили результаты высокопроизводительного секвенирования мРНК из клеток, нокаутных по гену МТ, и клеток дикого типа. В ходе анализа отобрали участки мРНК, соотношение сплайсированной и несплайсированной форм которых в клетках вышеперечисленных типов отличалось наиболее значимо. Чтобы изучить динамику сплайсинга в клетках, нокаутных по гену МТ, и клетках дикого типа, клетки данных линий проинкубировали с этинилуридином в течение определенных промежутков времени. Далее с использованием клик-химии выделили меченную этинилуридином РНК и сравнили относительное количество сплайсированной и несплайсированной форм методом ПЦР в реальном времени. Таким образом было показано, что кинетика сплайсинга выбранных участков мРНК в клетках двух типов значительно различается. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №20-04-00736.*

ПРОМОТОРНАЯ ОБЛАСТЬ ГЕНА RPL32 ВЛИЯЕТ НА mTOR-ЗАВИСИМУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ТРАНЛЯЦИИ

Д.А. Жилин, М.И. Васильева, Е.А. Смолин, И.В. Кулаковский, К.С. Будкина, И.А. Елисеева

Институт белка РАН, Пушкино

mTOR сигнальный каскад играет важную роль в пролиферации клеток и в ответе на стрессовые воздействия. Трансляция мРНК рибосомных белков специфически снижается при ингибировании mTOR. Известно, что многие из этих мРНК транскрибируются со специального класса ТСТ-промоторов, и содержат на 5'-конце олигопиримидиновую последовательность (TOP) необходимую для ингибирования трансляции. Корректное позиционирование стартов транскрипции, определяемое транскрипционными факторами, крайне важно для трансляционной регуляции. Недавно было обнаружено, что кроме позиционирования стартов транскрипции, транскрипционные факторы могут привлекать на мРНК регуляторные РНК-связывающие белки или определять модификацию мРНК, что в дальнейшем влияет на регуляцию трансляции и стабильность мРНК. В данной работе, на примере гена RPL32, мы изучали, как влияют промоторные области на mTOR-зависимую регуляцию трансляции. Ранее, было обнаружено, что промоторные области мРНК-мишеней mTOR обогащены участками связывания транскрипционных факторов YY1 и E2F-семейства. Мы решили проверить, как повлияют мутации в этих участках на mTOR-зависимую регуляцию трансляции. Оказалось, что мутации не изменяют старт транскрипции, однако приводят к уменьшению mTOR-зависимой регуляции трансляции мРНК, транскрибированной с такого промотора. Известно, что в специфичном ингибировании трансляции TOP-мРНК принимает участие белок LARP1. Мы предположили, что транскрипционные факторы YY1 и E2F могли бы определять ко-транскрипционную посадку LARP1 на TOP-мРНК, и как следствие mTOR-зависимую регуляцию трансляции. Для того, чтобы выяснить задействован ли белок LARP1 в промотор-зависимой регуляции трансляции мРНК RPL32, мы провели эксперименты на клетках нокаутных по белку LARP1. Оказалось, что в отсутствие LARP1 полностью исчезает mTOR-зависимая регуляция трансляции мРНК RPL32, транскрибированной с промотора с мутациями в участках связывания YY1 и E2F. При этом, наблюдается лишь частичное снижение mTOR-зависимой регуляции трансляции мРНК RPL32, транскрибированной с промотора дикого типа. Таким образом, LARP1-зависимый и промотор-опосредованный механизмы mTOR-зависимой регуляции трансляции реализуются для мРНК RPL32 независимо.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-74-10079.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ANCHOR ДЛЯ IN VIVO ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЛОКУСА MYC В ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ

В.С. Вьюшков¹, Н.А. Ломов¹, М.А. Рубцов^{1,2}

¹Кафедра молекулярной биологии, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва

Хромосомная транслокация между локусами MYC (хромосома 8) и IGH (хромосома 14) приводит к развитию В-клеточной лимфомы, называемой лимфомой Беркитта. Вероятность развития этой лимфомы увеличивается у ВИЧ-инфицированных людей. Ранее с помощью метода FISH было показано, что белок tat ВИЧ вызывает перемещение локуса MYC к локусу IGH в ядре [1]. Тем не менее, до сих пор не исследовалась динамика локусов MYC и IGH и формирование транслокации в живой клетке. Целью данной работы было создание клеточной линии, в которой можно в реальном времени наблюдать за перемещением локуса MYC. В качестве метода визуализации была выбрана система ANCHOR, состоящая из двух частей: последовательность ANCH, которая интегрируется в интересующий локус, и флуоресцентный белок OR, который связывается с последовательностью ANCH [2]. В ходе работы в ген MYC в линии лимфобластоидных клеток человека (LCL) с помощью CRISPR-опосредованной гомологичной рекомбинации были интегрированы кассеты из трех или пятнадцати повторов последовательности ANCH1. Для визуализации полученные клетки трансфицировали плазмидами, кодирующими ген OR1-EGFP или ген OR1-EGFP с сигналом ядерной локализации (NLS). Трансфицированные клетки исследовали с помощью конфокальной микроскопии. Флуоресцентные фокусы не удалось обнаружить при трансфекции плазмидой с геном OR1-EGFP клеток LCL, содержащих три или пятнадцать повторов ANCH1. Однако сигналы стали видимыми, когда к OR1-EGFP был добавлен сигнал ядерной локализации. Отношение сигнал/шум было выше в клетках с пятнадцатью повторами ANCH1, чем с тремя повторами ANCH1. Наблюдаемые фокусы располагались преимущественно на периферии ядер. Таким образом, можно заключить, что система ANCHOR в исходном виде не позволяет визуализировать локус MYC в клетках LCL. Однако, ее адаптация, состоящая в интеграции пятнадцати повторов ANCH1 и использовании OR1-EGFP с NLS, позволяет добиться визуализации локуса MYC с высоким отношением сигнал/шум. Полученные клетки будут использоваться для дальнейшей интеграции последовательности ANCH3 в локус IGH и для исследования влияния ВИЧ на близость изучаемых локусов. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-54-16002_НЦНИЛ_a.

1. D. Germini et al., *Leukemia*. 31(11), 2515–2522 (2017).

2. H. Saad et al., *PLoS Genet*. 10(3), e1004187 (2014).

ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МИРНКазы: ДИЗАЙН, СТАБИЛЬНОСТЬ, РИБОНУКЛЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

С.К. Гапонова¹, О.А. Патутина¹, Е.В. Биченкова², Д.А. Чиглинцева¹, Б. Амирлоо², В.В. Власов¹, М.А.Зенкова¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Manchester Pharmacy School, University of Manchester, Manchester, UK

Регуляция активности малых некодирующих РНК, в частности, миРНК, ассоциированных с процессами онкотрансформации, является перспективным терапевтическим подходом в наши дни. Ранее нашей группой были впервые созданы и всесторонне исследованы миРНКазы – конъюгаты миРНК-21-направленных олигонуклеотидов и пептида [(ArgLeu)2Gly]2, осуществляющих гуанин-специфичное расщепление миРНК-мишени. Такие миРНКазы показали высокую биологическую актив-

ность как на культуре клеток, так и на модели опухолевого роста лимфосаркомы *ex vivo*. Поскольку олигонуклеотидная компонента созданных миРНКаз представляла собой немодифицированный дезоксирибонуклеотид, мы предположили, что введение химических модификаций в состав адресующего олигонуклеотида может дополнительно улучшить стабильность, гибридационные и каталитические свойства, а также биологическую активность миРНКаз в опухолевых клетках. В данной работе нами было разработано два типа химически модифицированных миРНКаз: (1) двойные миРНКазы, направленные к миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-21 и миРНК-155, состоящие из каталитического пептида, соединённого с двумя короткими линейными миРНК-направленными олигонуклеотидами, в которых аденины заменены на 2'-аминоаденины, и (2) 2'-ОМе-миРНКазы, адресованные к миРНК-21, которые являются конъюгатами пептида и шпилечных олигонуклеотидов с различными вариантами расположения 2'-ОМе-модификаций в области связывания миРНК. Мы показали, что введение модификаций в состав миРНКаз способствует улучшению их биологических свойств: наблюдается увеличение их аффинности к миРНК-мишеням, а также многократное увеличение скорости и эффективности их расщепления. Для двойных конъюгатов, содержащих 2'-аминоаденины, выявлено синергическое расщепление миРНК совместно с РНКазой H. Проведена оценка нуклеазоустойчивости миРНКаз в среде с 50%-ной FBS и в сыворотке крови мыши, а также исследовано влияние модифицированных миРНКаз на пролиферативную и миграционную активность опухолевых клеток. В ходе работы выявлены наиболее перспективные модифицированные миРНКазы-кандидаты для подавления опухолевого роста *in vivo*, и сформулированы принципы рационального дизайна миРНК-направленных химически модифицированных искусственных рибонуклеаз.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-14-00250.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРА ВНУТРИНУКЛЕОСОМНЫХ ПЕТЕЛЬ ПРИ ТРАНСКРИПЦИИ НУКЛЕОСОМ

Н.С. Герасимова¹, М.Е. Валиева^{1,2,3}, В.М. Студитский^{1,4}

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²Институт молекулярной генетики Макса Планка, Берлин, Германия; ³Институт медицинской и человеческой генетики, Университетская Клиника Шарите, Берлин, Германия; ⁴Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, США

Нарушение сахарофосфатного остова ДНК – одно из наиболее часто возникающих в клетке повреждений. Разрыв матричной цепи *in vitro* вызывает остановку транскрибирующей РНК-полимеразы (РНКП), однако такого не наблюдается при нарушениях комплементарной цепи. Ранее в экспериментальной системе *in vitro* было показано, что односторонний разрыв (ник) нематричной цепи также может вызывать остановку РНКП, но только при организации ДНК в нуклеосоме (1). Места остановки фермента расположены после повреждения и имеют выраженную 10-пн периодичность, а эффективность зависит от положения разрыва относительно места остановки. Наблюдаемый эффект объясняли в рамках модели транскрипции хроматина с образованием внутринуклеосомных петель – интермедиатов, в которых фермент оказывается остановленным в петле ДНК на гистоновом октамере (1, 2). Согласно модели, разрыв цепи уменьшает вызываемое транскрипцией напряжение в структуре ДНК и затрудняет раскрытие петли и дальнейшую элонгацию. Остановка транскрипции в клетках приводит к активации системы репарации. Предположительно, обнаруженный эффект в живых организмах может ускорять репарацию разрывов нематричной цепи ДНК, которые в других случаях могут оставаться незаметными для системы репарации из-за взаимодействия с гистонами. В данной работе определены границы таких внутринуклеосомных петель. Для этого получены нуклеосомы с различным расположением односторонних разрывов нематричной цепи, и проведена их транскрипция *in vitro*. Определено, что образование контактов ДНК и гистонов позади РНКП происходит примерно на расстоянии 20 п.н.. Также определено, что белковый комплекс ФАСТ (Facilitates Chromatin Transcription) – кофактор транскрипции и репликации, который может стимулировать элонгацию транскрипции через хроматин *in vitro* (3) – позволяет ферменту преодолеть такие индуцированные паузы. Присутствие белкового комплекса значительно повышает выход полноразмерных транскриптов. Предположительно, он способствует разрешению петель и переводит элонгационные комплексы в активное состояние.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №19-44-02013).

1. Pestov NA, et al. *Sci. Adv.* 2015. e1500021

2. Gerasimova NS, et al. *Transcription.* 2016. 7(3):91-5

3. Hsieh FK, et al. *PNAS.* 2013. 110(19):7654-9

РНК-ТАРГЕТОМ БЕЛКА CspA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

А.С. Григоров¹, А.А. Острик², Е.Г. Салина², Т.Л. Ажикина¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шенякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Институт биохимии им А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Семейство бактериальных белков, содержащие функциональный домен «холодового шока» (cold shock-domain), Csp (cold shock protein) – высококонсервативные, связывающие нуклеиновые кислоты белки. Белки холодового шока являются одним из важных клеточных компонентов, участвующих в регуляции транскрипции бактерий. Для многих бактерий показано, что эти белки регулируют экспрессию различных генов, в том числе генов, вовлеченных в вирулентность и устойчивость бактерий к стрессам. Туберкулез, хроническое инфекционное заболевание, вызываемое бактерией *Mycobacterium tuberculosis*, уносит ежегодно почти 2 млн жизней. Спектр проявлений инфекции зависит как от особенностей иммунного ответа хозяина на патоген, так и от способности микобактерий противостоять этому ответу, в чем чрезвычайно важную роль играют механизмы регуляции экспрессии. Регуляторные РНК-связывающие белки и их мишени составляют сложные регуляторные сети, позволяющие патогену адаптировать свой метаболизм на различных стадиях развития инфекции. Однако в геноме рода *Mycobacteria* не найдено классических бактериальных шаперонов, таких как Hfq и ProQ. В этом исследовании впервые была изучена РНК-связывающая активность белка CspA *M. tuberculosis* и определен его РНК-таргетом. Нами был создан штамм *M. tuberculosis*, конститутивно экспрессирующий белок CspA с присоединённым FLAG-тагом. С помощью метода аффинной хроматографии

на носителе с антителами к FLAG-тагу, нами был выделен пул связавшихся РНК, проведено секвенирование на платформе Illumina. Полученные данные представляют расширение имеющихся сведений по связыванию РНК белками семейства CspA, а также демонстрируют, что у *M. tuberculosis* CspA является РНК шапероном. Проведенное исследование открывает новые перспективы для снижения вирулентности микобактерий: модуляция транскриптомного профиля *M. tuberculosis* через CspA может иметь в практическое значение. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-34-90149.*

НАПРАВЛЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК И ИХ РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГЛИОБЛАСТОМЫ

А.С. Доме, Г.А. Степанов, Д.В. Семёнов, Е.В. Кулигина, В.А. Рихтер

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Глиобластома является наиболее частой и наиболее агрессивной формой онкологических заболеваний головного мозга. Разработка эффективного терапевтического средства для борьбы с глиобластомой затруднена в том числе недостаточным пониманием патогенеза данного заболевания. Для изучения молекулярных механизмов формирования и течения глиобластомы существуют модельные клеточные линии, например, U87MG, U251MG, U343MG. Благодаря инструментам геномного редактирования стало возможным таргетно управлять экспрессией тех или иных генов-мишеней, что позволило существенно расширить понимание процессов, протекающих на молекулярном уровне в норме и при патологии. Стоит отметить, что чаще всего мишенями для систем геномного редактирования являются белок-кодирующие гены. Однако существует целый класс РНК – длинные некодирующие РНК (lncРНК), которые играют важную, а иногда – ключевую роль в патогенезе. Одним из новых белков геномного редактирования является белок RfxCas13d (CasRx), позволяющий направленно и специфично снижать уровень РНК-мишеней с высокой эффективностью в клетках млекопитающих. Использование CasRx позволяет подавлять экспрессию в том числе различных lncРНК. Для поиска таких мишеней нами был выполнен транскриптомный анализ клеток линий U87MG и U343MG, и проведено сравнение полученных результатов с транскриптомными данными линий HEK293FT, WI-38, BEAS2B, HEV, IMR90, полученных из базы SRA NCBI. По результатам анализа данных были найдены lncРНК, с повышенной экспрессией в группе глиомных линий по сравнению с немалигнизированными клетками. Три lncРНК – LINC00461, LINC01152, LINC01272 – были выбраны в качестве мишеней для системы CasRx. Были созданы клеточные линии, стабильно экспрессирующие CasRx. Подобраны направляющие РНК для нокдауна выбранных lncРНК. Направляющие РНК доставляли в клетку с помощью лентивирусного вектора 3 поколения и отбирали клеточные линии со стабильно сниженным уровнем LINC00461, LINC01152, LINC01272. Полученные линии будут использованы для исследований молекулярных механизмов функционирования выбранных lncРНК-мишеней в регуляции процессов онкотрансформированных клеток и для поиска стратегий направленного подавления роста клеток глиобластомы. *Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 21-14-00195.*

ИНФЕКЦИЯ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА A549 ВИРУСОМ ГРИППА А АКТИВИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ УКРОЧЕННЫХ ФОРМ ПРОЦЕССИНГА МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК

Е.С. Журавлев¹, М.В. Сергеева², М.М. Тимофеева², А.Б. Комиссаров², Г.А. Степанов¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург

Данная работа направлена на изучение функций коротких регуляторных РНК, а именно класса малых ядрышковых РНК, в клетках человека в условиях заражения вирусом гриппа А. В качестве модельной системы были подготовлены препараты клеток линии аденокарциномы легких человека A549, зараженных вирусом гриппа А/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Было проведено транскриптомное исследование изменений в уровне представленности мРНК и ncРНК, а также коротких РНК (<200 н.) в клетках человека в условиях вирусной инфекции (исследование проводили на платформе NextSeq Illumina 500, single-end 1×75). Биоинформационный анализ результатов секвенирования poly-A-фракции подтвердил активацию основных функциональных кластеров, характерных для инфекции клеток вирусом гриппа. Анализ фракции коротких РНК позволил выявить укороченные формы малых ядрышковых РНК, представляющие собой 5'- и 3'-фрагменты зрелых C/D-боксов-РНК, со значительно повышенным и пониженным содержанием в клетках в условиях вирусной инфекции (отбор проводили с использованием параметров adj. p-value < 0.05, |log₂(FC)| > 1). Обнаруженные изменения в уровне экспрессии ряда малых ядрышковых РНК были верифицированы методом ОТ-ПЦР, в том числе с использованием stem-loop-обратных праймеров для селективной детекции 5'- и 3'- укороченных форм процессинга малых ядрышковых РНК. Выявленные изменения в профиле экспрессии C/D-боксов-РНК позволяют предположить наличие неканонических функций этих РНК в регуляции инфекции клеток человека вирусом гриппа. Можно предположить, что обнаруженные короткие формы 5'- и 3'- процессинга коротких регуляторных РНК могут функционировать в клетках по RISC-зависимому механизму.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-34-90168.

СТРУКТУРНЫЕ МОДИФИКАЦИИ КАК СПОСОБ УПРАВЛЕНИЯ СВОЙСТВАМИ ХОЛЕСТЕРИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

У.А. Карелина, И.В. Черников, Д.В. Гладких, М.И. Мещанинова, А.Г. Веняминова, М.А. Зенкова, В.В. Власов,

Е.Л. Черноловская

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Малые интерферирующие РНК (siРНК) являются наиболее перспективным типом терапевтических нуклеиновых кислот. Одной из основных проблем для применения siРНК в биомедицине является её низкие фармакокинетические параметры, по-

сколькo siРНК быстро выводится из кровотока. Поэтому для оптимизации данных параметров мы исследовали влияние структуры холестеринoвых конъюгатов супрамолекулярных siРНК (Ch-sMsiРНК, M=1, 3, 4, 6 и 8) на их накопление в клетках и эффективность подавления экспрессии гена-мишени *in vitro* и *in vivo*. В работе использовались холестеринoвые конъюгаты полностью модифицированной Ch-sMsiРНК с различной молекулярной массой, содержащей 2'F и 2'O-Me модификации. В экспериментах *in vitro* показано, что увеличение молекулярной массы дуплекса повышает биологическую активность мультимерных конъюгатов Ch-sMsiРНК по сравнению с мономерным конъюгатом siРНК (Ch-s1siРНК) при доставке в клетки с помощью Липофектамина 2000. Однако, при доставке конъюгатов без носителя эффективность накопления и биологическая активность при увеличении молекулярной массы дуплекса снижается. Наиболее активным среди исследуемых Ch-sMsiРНК был дуплекс, состоящий из трех молекул антисмысловой цепи и двух полуторных смысловых цепей (Ch-s3siРНК), на одной из которых был присоединен холестерин. Определение динамики изменения концентрации Ch-sMsiРНК в крови мышей после внутривенного введения показало, что Ch-s1siРНК, Ch-s3siРНК и Ch-s4siРНК существенно дольше остаются в кровотоке, чем Ch-s6siРНК и Ch-s8siРНК (период полувыведения составил 9, 9, 12, 0.5 и 0.2 часов для Ch-s1-, -s3-, -s4-, -s6- и -s8siРНК, соответственно). В экспериментах *in vivo* на мышах линии SCID с ксенографтной опухолью KB-8-5 было показано, что все исследованные конъюгаты с одинаковой эффективностью накапливаются в опухоли после внутривенной инъекции. Однако, эффективность накопления в печени Ch-s3siРНК и Ch-s4siРНК была на 2 порядка выше, чем для Ch-s1siРНК, дальнейшее увеличение молекулярной массы до 6 и 8 эквивалентов мономерной siРНК не приводило к увеличению накопления конъюгатов в органах. Таким образом, можно ожидать, что конъюгаты Ch-s3siРНК и Ch-s4siРНК будут обладать высокой биологической активностью в печени животных после внутривенного введения.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-14-00251.

РОЛЬ СИСТЕМ ИМПОРТА БЕЛКОВ В МИТОХОНДРИИ В ЗАЩИТЕ ОТ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ мтДНК

Н.Д. Кашко¹, Д.А. Кнорре^{1,2}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В клетках эукариот обычно содержится множество молекул митохондриальной ДНК (мтДНК), последовательность которых может различаться, — такое состояние называется гетероплазмией. Для изучения внутриклеточной конкуренции разных вариантов мтДНК удобным модельным объектом являются пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, в которых гетероплазмия может быть искусственно создана в зиготе при скрещивании гаплоидных штаммов, несущих отличающиеся мтДНК. Мы исследовали, как ядерный геном влияет на взаимную конкуренцию двух вариантов мтДНК в пределах клетки: мтДНК дикого типа (Rho+) и мутантного варианта, содержащего большую делецию (Rho-). Для этого мы скрестили штамм с ядерным геномом дикого типа и Rho- мтДНК с коллекцией Rho+ штаммов, в которых была понижена экспрессия жизненно важных генов. Из коллекции полученных гетерозиготных диплоидных штаммов мы отобрали те, в которых Rho+ мтДНК вытеснила Rho- мтДНК в наибольшем количестве клеток. В результате такого скрининга мы обнаружили, что снижение экспрессии генов TIM50 и, в меньшей степени, TOM22, увеличивает вероятность сохранения Rho+ мтДНК. TIM50 и TOM22 кодируют компоненты систем импорта белков в митохондрии, расположенных во внутренней мембране (TIM-комплекс) и во внешней мембране (TOM-комплекс) митохондрий, соответственно. Таким образом, нарушение системы импорта белков в митохондрию препятствует вытеснению Rho+ мтДНК мутантным вариантом Rho- с обширной делецией. Мы провели ряд подтверждающих экспериментов со штаммами, в которых была нарушена функция других компонентов этих комплексов, и показали, что снижение экспрессии TIM17 и делеция TOM5 также препятствует распространению Rho- мтДНК в условиях гетероплазмии. При этом продукты генов TOM5, TOM22, TIM50 и TIM17 последовательно взаимодействуют друг с другом и осуществляют координацию TOM- и TIM-комплексов для транспорта белков через обе митохондриальные мембраны. Мы предполагаем, что ингибирование импорта белков в митохондрии при скрещивании защищает Rho+ митохондрии от прекурсоров белков, нарабатываемых в избытке в Rho- штамме, и способствует сохранению полноразмерной Rho+ мтДНК.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00782

МЕХАНИЗМЫ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ L-АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

А.П. Ковина, А.В. Лужин, О.Л. Кантидзе

Институт биологии гена РАН, Москва

В последние годы появляется все больше данных о молекулярных механизмах, лежащих в основе физиологического действия L-аскорбиновой кислоты (аскорбат, витамин С). Наиболее важными в данный момент выглядят исследования, проливающие свет на роль фармакологически значимых (миллимолярных) концентраций аскорбата в регуляции редокс-статуса и эпигенома эукариотической клетки. На основании обнаруженных механизмов действия аскорбата можно выработать стратегии его эффективного клинического использования в терапии онкологических заболеваний и регенеративной медицине. Вопрос о том, может ли аскорбат использоваться в качестве противоракового средства, обсуждается на протяжении десятилетий. Для большинства раковых клеток, культивируемых *in vitro*, концентрации аскорбата в диапазоне 2–5 мМ достаточны для того, чтобы значительно уменьшить выживаемость клеток. В то же время, многие нераковые клетки сохраняют нормальную жизнедеятельность при концентрациях аскорбата около 20 мМ. Точное понимание механизмов действия фармакологического аскорбата поможет определить, пациенты с какими типами онкологических заболеваний могут извлечь выгоду из адьювантного лечения высокими дозами аскорбата. Для выявления механизмов действия фармакологического аскорбата в раковых клетках мы провели поиск генов, которые синтетически летальны с высокими концентрациями L-аскорбиновой кислоты. Это было

сделано с использованием полногеномного CRISPR/Cas9-опосредованного деплеционного скрининга. В результате проведения скрининга были выявлены гены, мутации в которых приводят к чувствительности и, напротив, к резистентности раковых клеток к обработке высокими дозами L-аскорбиновой кислоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 21-64-00001).

АКТИВНОСТЬ ДНК-ЗАВИСИМЫХ ДНК-НУКЛЕАЗ ИЗ СЕМЕЙСТВА АРГОНАВТОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Е.В. Кропачева¹, Л.А. Лисицкая¹, А.В. Кузьменко^{1,2}, А.А. Аравин², Д.М. Есюнина¹, А.В. Кульбачинский¹

¹Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ²Калифорнийский технологический университет, Пасадина, США

Аргонавты – нуклеазы, способные распознавать целевые участки нуклеиновых кислот с помощью коротких олигонуклеотидов за счет принципа комплементарности. В последние годы широко исследуются Аргонавты из прокариотических организмов. Предполагается, что они могут участвовать в защите хозяйской клетки от чужеродных генетических элементов. В отличие от Аргонавтов эукариот, Аргонавты бактерий и архей более разнообразны и обладают более широкой субстратной специфичностью. В нашей работе мы исследовали активность трех цианобактериальных белков-Аргонавтов: MaAgo, CeAgo и SmAgo. Гены выбранных белков были получены путем химического синтеза и клонированы в экспрессионный вектор. Затем белки были экспрессированы в гетерологической системе *E. coli*, выделены и очищены. Для тестирования биохимической активности полученных Аргонавтов использовали систему *in vitro*: Аргонавт загружали короткой гидовой нуклеиновой кислотой и наблюдали за расщеплением комплементарной нуклеиновой кислоты – мишени. Полученные продукты расщепления анализировали в денатурирующем полиакриламидном геле. В описанной системе было изучено влияние различных параметров на каталитическую активность исследуемых белков, в том числе, зависимость эффективности реакции разрезания мишени от температуры, катионов двухвалентных металлов, структуры гидовых молекул и мишеней. Показано, что все три изученные нуклеазы предпочтительно используют ДНК в качестве гида и мишени, однако MaAgo и SmAgo также обнаруживают следовую активность при разрезании ДНК с помощью РНК-гида. Все изученные белки активны в диапазоне температур от 37 до 60 градусов и требуют для своей активности присутствия ионов марганца или магния. Измерение кинетических параметров ДНК-зависимого расщепления ДНК в условиях однораундной реакции показало, что наибольшей скоростью реакции обладает SmAgo. Добавление белка SSB, стабилизирующего однонитевую ДНК, ускоряет реакцию в случае MaAgo и CeAgo. Наличие в определенных позициях мисматчей между гидом и мишенью значительно снижает эффективность расщепления мишени. В целом, проведенные исследования цианобактериальных белков-Аргонавтов позволяют рассматривать их как возможный инструмент для специфического узнавания и расщепления ДНК в широком диапазоне условий.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-29-07086.

ИЗУЧЕНИЕ ВКЛАДА СОМАТИЧЕСКИХ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ DNMT3A В РАЗВИТИЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРОВИ

А.Г. Лойко, Е.С. Громова

МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва

Метилирование ДНК является одним из наиболее интенсивно изучаемых механизмов, отвечающих за эпигенетические явления у эукариот. У млекопитающих метилирование осуществляется *de novo* ДНК-метилтрансферазой DNMT3A по остаткам цитозина в CpG-динуклеотидах. У онкогематологических больных в белке часто обнаруживаются мутации в функционально важных областях, в том числе они затрагивают регуляторный PWWP-домен. Данный домен опосредует взаимодействие белка с нуклеосомой за счет узнавания ДНК и хвоста гистона H3, триметилированного по 36-ому остатку лизина (H3K36me3). В рамках настоящего исследования были изучены детали взаимодействия мутантных вариантов DNMT3A с компонентами нуклеосомы и оценена их метилирующая активность. Были выбраны мутации, наиболее часто встречающиеся в PWWP-домене DNMT3A у онкогематологических больных. С помощью сайт-направленного мутагенеза получены плазмидные конструкции, несущие различные мутантные варианты PWWP-домена (P307R, R326H и W409R) с N-концевым GST-тегом. Также получены конструкции с аналогичными мутациями на основе вектора, несущего ген His6-тагированного полноразмерного DNMT3A с дополнительными заменами Y526A и Y528A для снятия аутоингибирования. В качестве модельных систем в работе использованы 19-звенный модифицированный пептид rH3K36me3, имитирующий хвост гистона (остатки 26-44) и 30-звенный CpG-содержащий ДНК-субстрат f-DNA. Мутантные варианты изолированного PWWP-домена P307R и W409R подвергались протеолитической деградации в бактериальных клетках, при этом эти же мутации не приводили к внутриклеточной фрагментации полноразмерного белка. Мутации в изолированном PWWP-домене приводили к ухудшению связывания белка с rH3K36me3 и f-DNA. Все мутации, вводимые в PWWP-домен DNMT3A, нарушали активность полноразмерного белка, при этом данные аминокислотные остатки не располагаются в мотивах, непосредственно отвечающих за метилирование. Проведенное исследование позволит установить связь между неправильным функционированием мутантных вариантов DNMT3A и развитием патологий. *Поддержано грантом РФФИ №19-04-00533.*

ВЫЗВАННЫЕ ЭТОПОЗИДОМ РАЗРЫВЫ УВЕЛИЧИВАЮТ ПОДВИЖНОСТЬ ГЕНА AML1 В ПРОСТРАНСТВЕ ЯДРА

Н.А. Ломов¹, В.С. Вьюшков¹, С.В. Ульянов^{1,2}, М.А. Рубцов^{1,3}

¹Кафедра молекулярной биологии, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биологии гена РАН; ³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва

Вторичный лейкоз — подтип острого лейкоза, который возникает как отдаленный побочный эффект химиотерапии опухолей. Для вторичных лейкозов характерно наличие хромосомных транслокаций, часто это транслокация с участием гена AML1 (RUNX1, Chr 21). Механизмом действия некоторых противоопухолевых препаратов является ингибирование ДНК-

топоизомеразы II типа — фермента, активного в делящихся раковых клетках. Цитотоксичность таких препаратов проявляется в образовании множественных двуцепочечных разрывов ДНК. Однако есть побочное действие терапии — образование разрывов ДНК в здоровых клетках организма, что может приводить к хромосомным транслокациям и раковому перерождению клетки. Было показано, что в гене AML1 под действием этопозиды возникают разрывы. Но чтобы произошла перестройка, кроме образования разрывов в генах-партнерах, они должны сблизиться в пространстве ядра. Однако не известно, влияет ли внесение разрыва на подвижность гена AML1, и существует ли направленное к определенным локусам движение этого гена после обработки клеток этопозидом. Для ответа на эти вопросы были проведены следующие эксперименты. Клетки линии Jurkat обрабатывались этопозидом в течение часа. Затем проводилась фиксация клеток и 3D FISH с флуоресцентной двуцветной break-apart пробой к AML1, и пробой третьего цвета на 21 хромосому. Было показано, что разорванные аллели гораздо чаще локализируются вне границ своей территории, чем интактные аллели. Также был проведен 4С-анализ, позволяющий выявить контакты между изучаемым геном и любыми другими участками генома. Выяснилось, что после обработки этопозидом количество контактов AML1 со своей хромосомой уменьшается. С другой стороны, не было выявлено предпочтений в контактах этого гена с любыми другими локусами ни до, ни после обработки этопозидом. Из полученных результатов можно сделать вывод, что ген AML1 при возникновении в нем разрывов, опосредованных действием этопозиды, приобретает повышенную подвижность в пространстве ядра, однако это движение не является направленным к какому-либо другому локусу.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00531_А.

АЛТИОМИЦИН – ЗАБЫТЫЙ ИНГИБИТОР БАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСЛЯЦИИ

Д.А. Лукьянов¹, О.И. Ибитоев¹, В.И. Марина², И.М. Лисевич¹, П.В. Сергиев^{1,2,3,4}, О.А. Донцова^{1,2,4,5}, И.А. Остерман^{1,2}

¹Сколковский институт науки и технологий; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет; ³МГУ им. М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики; ⁴МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского; ⁵Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

Коронавирусный кризис 2020 года показал незащищенность человечества перед различными патогенами. Несмотря на открытие антибиотиков в начале прошлого века, бактериальные заболевания являются одной из серьезнейших угроз для современного общества. По данным Всемирной организации здравоохранения, к 2050 смертность от резистентных форм бактерий вырастет более чем в 10 раз. А в Российской Федерации в 2015 году более 40% инфекций были вызваны бактериями устойчивыми к антибиотикам. Таким образом задача поиска новых антибиотиков остро стоит перед современной наукой. Ранее в нашей лаборатории был произведен масштабный поиск веществ с антибиотической активностью при помощи штамма *E. coli* JW5503 (ΔtolC) трансформированного репортерной плазмидой pDualrep2. В результате был обнаружен штамм *Streptomyces althioticus*, культуральная жидкость (КЖ) которого проявила антибиотическую активность против штамма *E. coli* JW5503 (ΔtolC). Штамм был предоставлен Всероссийской коллекцией микроорганизмов. В КЖ данного штамма было найдено соединение алтиомицин (Alt). Структура молекулы была подтверждена методом масс спектрометрии, а УФ спектр соответствовал описанному в литературе. Эта молекула была открыта группой японских ученых в 1957 году, но механизм действия детально изучен не был. На основании данных, полученных с помощью репортерного штамма *E. coli*, была выдвинута гипотеза, что Alt может быть ингибитором трансляции. Это предположение было подтверждено с помощью *in vitro* трансляции в экстракте клеток *E. coli*, проведённой с очищенным при помощи ВЭЖХ образцом Alt. При помощи метода toe print было подтверждено прерывание трансляции в присутствии Alt, а также этим методом показано что остановка трансляции происходит на этапе элонгации. Alt не показал активности в бесклеточной системе трансляции основанной на экстракте человеческих клеток. В ходе МТТ-теста данное соединение оказалось не токсичным в концентрации 12,5 мМ, при этом минимальная ингибирующая концентрация для штамма *E. coli* JW5503 (ΔtolC) составила 1,0 мМ. Исходя из представленных данных можно заключить что алтиомицин может быть потенциально интересен как для фундаментального исследования, так и для практической деятельности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90048.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ НОВЫЕ ВАРИАНТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК, КАК ПОДХОД К РЕГУЛЯЦИИ СПЛАЙСИНГА

А.М. Матвеева^{1,2}, Е.С. Журавлев¹, Д.В. Семенов¹, В.В. Власов¹, Г.А. Степанов^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Сплайсинг предшественников мРНК – основной этап их созревания в клетках эукариот. Альтернативный сплайсинг может приводить к образованию многочисленных изоформ одного и того же гена, обеспечивая транскриптомное разнообразие, и, как следствие, широкий спектр биологических функций генов. Регуляция сплайсинга позволяет осуществлять тонкую настройку экспрессии гена-мишени без вмешательства в его структуру. Малые ядрышковые РНК (мяоРНК) – класс малых некодирующих РНК, канонической функцией которых является участие в созревании рибосомной РНК в клетках эукариот. C/D-бокс-мяоРНК участвуют в 2'-О-метилировании нуклеотидов рРНК благодаря наличию в своей структуре консервативных элементов и специфической области узнавания, комплементарной региону рРНК. Ранее нами была продемонстрирована возможность CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования индивидуальных генов мяоРНК в клетках человека [1]. В данной работе предложена стратегия модуляции сплайсинга путем изменения области узнавания в структуре гена C/D-бокс-мяоРНК с перенаправлением ее канонической активности на критичные для сплайсинга нуклеотиды пре-мРНК гена-мишени. Объектом исследования были выбраны закодированные в интронах гена GAS5 C/D-бокс-мяоРНК, в качестве модельного гена был выбран ген интерферон-индуцируемого мембранного белка IFITM3. На основе клеток человека 293FT с помощью системы CRISPR/Cas9 были получены клеточные линии, несущие ген мяоРНК с измененной областью узнавания, комплементарной целевому региону пре-мРНК IFITM3. Полученные линии были охарактеризованы на наличие неспецифических мутаций в гене

мяоРНК-мишени. Независимыми методами ОТ-ПЦР и секвенирования фракции коротких РНК было показано созревание новой «регуляторной» формы мяоРНК, направленной на пре-мРНК гена-мишени, и выявлено специфичное снижение уровня мРНК гена IFITM3. На основе полученных результатов сформулированы базовые принципы редактирования генов мяоРНК для перенаправления их активности на пре-мРНК заранее заданных генов. Данная стратегия может найти применение в регуляции терапевтически значимых генов в клетках млекопитающих. *Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-29-07073 и проекта Госзадания ИХБФМ СО РАН (0245-2019-0001) (разработка методов).*

1. Filippova J. et al. *Front. in Pharm.*, 2019. doi:10.3389/fphar.2019.0124

РАСПОЗНАВАНИЕ И УДАЛЕНИЕ КЛАСТЕРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК С ПОМОЩЬЮ NE

Н.В. Науменко, И.О. Петрусева, А.А. Ломзов, О.И. Лаврик

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Кластерные повреждения – это множественные (два или более) повреждения, расположенные в пределах одного-двух витков спирали ДНК. Состоящие из повреждений различной структуры кластеры могут возникать в результате интенсивных повреждающих воздействий, особенно если воздействиям подвергаются клетки со сниженным репаративным статусом. В данной работе проведен анализ того, как присутствие аналога AP сайта, ненуклеозидной вставки на основе фосфодиэфира диэтилленгликоля (DEG) влияет на узнавание и удаление из ДНК объемного повреждения N-[6-(dipivaloyl-5(6)-fluoresceinyl-carbamoyl)hexanoyl]-O1-(4,4'-dimethoxytrityl)-O2-[(diisopropylamino)(2-cyanoethoxy)phosphino]-3-amino-1,2-propanediol (nFlu), системой NER млекопитающих. Показано, что фактор ХРС обладает повышенным сродством к кластероносущим ДНК по сравнению с ДНК, содержащей одиночный nFlu. Эффективность удаления объемного повреждения из ДНК с расположенными в составе тандема nFlu и DEG прямо коррелировала с возрастанием сродства ХРС к данной структуре. В случае ДНК с nFlu и DEG, образующими двухцепочечный кластер, сродство ХРС возрастало по мере приближения позиции DEG к позиции nFlu. Эффективность элиминации объемного повреждения из таких ДНК, напротив, была снижена вплоть до полного подавления при расположении DEG напротив nFlu. Оценены изменения геометрии дцДНК, вызванные присутствием кластерного повреждения. Полученные экспериментальные данные в совокупности с результатами моделирования молекулярной динамики (Molecular Dynamic simulation) вносят вклад в понимание механизмов репарации кластеров, содержащих объемные повреждения, различной топологии в клетке млекопитающих. *Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-74-10056.*

РАСЩЕПЛЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК-МИШЕНЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ-АРГОНАВТАМИ

А.В. Олина, А.А. Агапов, Л.А. Лисицкая, Е.В. Кропачева, Д.М. Есюнина, А.В. Кульбачинский

Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Белки-аргонnavты – ключевые игроки процессов РНК-интерференции в клетках эукариот. Эукариотические аргонnavты используют короткие РНК в качестве гидов для распознавания РНК-мишеней. Гены аргонnavтов также были обнаружены в геномах бактерий и архей, однако аргонnavты прокариот способны связывать в качестве гидов и мишеней не только РНК, но и ДНК. Мы обнаружили новую группу прокариотических белков-аргонnavтов, которые с помощью ДНК-гидов специфически распознают и разрезают исключительно РНК-мишени. Удивительно, но при этом связывание ДНК- и РНК-мишеней происходит с одинаковой эффективностью. Мы обнаружили, что ключевым элементом, определяющим предпочтение исследуемых нуклеаз к РНК-мишеням, является структура сахарофосфатного остова мишени в сайте разрезания: при модификации 2'-ОН группы в сайте разрезания мишени эффективность нуклеазной реакции резко снижается. Наоборот, если внести в ДНК-мишень единственный рибонуклеотид в сайте разрезания, то такая мишень становится доступной для внесения разрыва. Таким образом, строгая специфичность аргонnavтов новой группы к РНК-мишеням определяется на стадии разрезания. В последние годы является всё больше данных, свидетельствующих о важной биологической роли модификаций нуклеиновых кислот в различных организмах. Мы проверили влияние целого спектра модификаций азотистых оснований в РНК-мишени на эффективность её разрезания белками-аргонnavтами. Мы показали, что некоторые модификации способны препятствовать разрезанию мишени, при этом эффект зависит от положения модифицированного нуклеотида в дуплексе гид-мишень. Таким образом, аргонnavты новой группы чувствительны к целому ряду модификаций мишени, что позволяет рассматривать эти белки как новый перспективный инструмент для детекции и расщепления РНК-транскриптов *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-29-07086.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК Mcr11 И DrrS MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS И ИХ РОЛЬ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ «ПАТОГЕН–ХОЗЯИН»

А.А. Острик¹, А.С. Григоров², Ю.В. Скворцова², А.С. Капрельянц¹, Т.Л. Ажикина², Е.Г. Салина¹

¹Институт биохимии им А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) обладает широким спектром механизмов защиты от угнетающих факторов, действующих со стороны макроорганизма при инфекции. Так, бактериальная клетка способна быстро изменять уровень экспрессии генов в ответ на меняющиеся условия внешней среды, активируя или подавляя трансляцию целевых кодирующих транскриптов посредством регуляторных элементов; одним из классов таких регуляторов являются малые некодирующие РНК. Обнаружено, что малые некодирующие РНК Mcr11 и DrrS, присутствующие только у микобактерий туберкулезного комплекса, содержатся в значительном количестве в клетках Mtb *in vitro* в стационарной фазе роста и в покоящемся состоянии, а также *in vivo* у инфицированных мышей, что указывает на их активное участие во взаимодействии «патоген-хозяин». Поскольку Mcr11 и DrrS экспрессируются в похожих условиях, а зрелые вторичные структуры этих малых РНК

имеют участок комплементарности, мы предположили, что две эти малые РНК могут взаимодействовать друг с другом, модифицируя метаболизм Mtb в стрессовых условиях внешней среды, возникающих при инфекции. Был сконструирован штамм Mtb с делецией двух малых некодирующих РНК $\Delta\Delta\text{Mcr11_DrrS}$, изучены его фенотипические характеристики *in vitro* и характер выживаемости при инфекции мышей *in vivo* и макрофагальных линий *ex vivo*, и проведено сравнение с характеристиками штаммов Mtb с однократной делецией малых РНК ΔMcr11 и ΔDrrS , а также с клетками дикого типа. При культивировании штамма Mtb с двойной делецией $\Delta\Delta\text{Mcr11_DrrS}$, а также штаммов с однократной делецией ΔMcr11 и ΔDrrS на средах различного состава не обнаруживалось отличий в характере их роста *in vitro* по сравнению со штаммом дикого типа. Однако, после выделения мутантных штаммов из органов инфицированных мышей линии BALB/c их рост на стандартных лабораторных средах существенно зависел от типа источника углерода и его концентрации. Наиболее сложно культивируемым был штамм Mtb с двойной делецией $\Delta\Delta\text{Mcr11_DrrS}$. Транскриптом костномозговых макрофагов мышей при инфекции их штаммом $\Delta\Delta\text{Mcr11_DrrS}$ показал существенное изменение уровня экспрессии провоспалительных медиаторов, связанное с активацией иммунного ответа хозяина.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-90015).

СРАВНЕНИЕ СИСТЕМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКОПРЕДСТАВЛЕННОЙ АЛЛЕЛЬНОЙ ФРАКЦИИ МУТАЦИЙ ПРОМОТОРА ГЕНА ТЕРТ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ: ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ, ЧИСЛОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР И СИСТЕМЫ УЗНАВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК МЕТОДОМ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕИВАНИЯ

Э.К. Писарев¹, И.А. Черданцев², В.Д. Макарова²; Н.Р. Яренков², Т.С. Зацепин^{2,3}, И.А. Веселова², М.Э. Зверева²

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Факультет наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва

Мутации в промоторе гена теломерной обратной транскриптазы человека (hTERT), возникающие с высокой вероятностью в опухолевых клетках глиом, рака мочевого пузыря и некоторых других опухолевых поражениях, активируют теломеразу. Доказано, что для рака мочевого пузыря их появление является ранним событием. Это позволяет использовать определение таких мутаций в жидкостях организма высокочувствительными методами в качестве неинвазивной диагностики возникновения и рецидивирования опухолевых процессов. Одна из проблем разработки такой эффективной неинвазивной диагностики состоит в деградации опухолевой ДНК и низкое количество фрагментов ДНК опухолевых клеток на фоне фрагментов ДНК из здоровых клеток организма (низкопредставленная мутантная аллельная фракция). Необходимость определения низкопредставленной мутантной аллельной фракции, трудоёмкость пробоподготовки для высокочувствительных методов определения нуклеиновых кислот со своими техническими ограничениями определяют необходимость создания универсальной системы сравнения аналитических методов обнаружения специфической опухолевой ДНК и разработку новых методов, не вносящих ошибку при амплификации ДНК, сопоставимую по значениям с низкопредставленной мутантной аллельной фракцией. В качестве нового безамплификационного метода определения мутаций в промоторе гена hTERT мы разрабатываем систему сиквенса-специфичного определения фрагментов ДНК с использованием гигантского комбинационного рассеивания (ГКР). Нами была создана система плазмидных ДНК, несущих фрагменты промотора гена hTERT с заменами нуклеотидных остатков, соответствующих клинически значимым мутациям, оптимизированы условия проведения измерений различными методами, позволяющие получать стабильный сигнал от низкой мутантной аллельной фракции на фоне избытка ДНК дикого типа и проверены применимость для методов (на основе ПЦР в реальном времени и числовой капельной ПЦР, разрабатываемого в проекте) и определены пределы обнаружения для числовой капельной ПЦР.

Работа поддержана грантом РФФИ: 18-29-08040.

ЭВОЛЮЦИЯ НЕКОТОРЫХ ГИСТОН-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ H-NS У ПСЕВДОМОНАД

И.Ю. Позднякова-Филатова, А.А. Фролова, М.В. Захарова

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

Нуклеоид-ассоциированные белки не только участвуют в упаковке хромосомы внутри клетки, но и вовлечены в регуляцию экспрессии генов. Некоторые из генов, кодирующих NAPs псевдомонад, представлены в геноме в нескольких копиях. Так, ген *mvaT* *Pseudomonas aeruginosa*, кодирующий белок семейства H-NS, имеет гомолога *mvaU*. При этом ряд фенотипических изменений, например активации профага, проявляется лишь при удалении и *mvaT*, и *mvaU*. Белки *MvaT* (*P. aeruginosa*) и *TurA* (*P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. syringae* и *P. putida*) образуют общую кладу, ранее описанную в литературе, как I группа *MvaT*-подобных белков, белки *MvaU* (*P. aeruginosa*) и *TurB* (*P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. syringae* и *P. putida*) образуют общую кладу, ранее описанную в литературе, как II группа *MvaT*-подобных белков. III группа *MvaT*-подобных белков формируется исключительно за счет представителей, обнаруженных в геномах *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. syringae* и *P. putida*, которые являются ортологами *MvaU*, но не *MvaT*. Внутри самой III группы *MvaT*-подобных белков можно выделить 2 подгруппы. Подгруппа 3.1 формируется за счет последовательности, представленные исключительно в *P. putida*. В ряде случаев, по-видимому, произошла дупликация последовательности, что привело к формированию паралогов *TurD/TurE* в штамме KT2440, *MvaT34/MvaT41* в штамме BS3701, AFK72751.1/AFK71572.1 в штамме ND6, ADR59749.1/ADR60349.1 в штамме BIRD-1. В подгруппе 3.2 располагаются последовательности, представленные и в *P. fluorescens*, и в *P. protegens*, и в *P. syringae*, и в *P. putida*. В этой группе так же наблюдается дупликация и, соответственно, образование паралогов ABQ76186.1/ABQ79088.1 в *P. putida* F1, AFO50018.1/AFO48638.1 в *P. putida* DOT-T1E, AAO58185.1/AAO53827.1 в *P. syringae* pv. tomato DC3000, ABA74752.1/ABA74536.1 в *P. fluorescens* Pf0-1. Ранее, Baehler с соавторами выдвинул предположение, что III группа *MvaT*-подобных белков является видоспецифичной. Наши данные указывают на то, что первая дупликация последовательности *MvaU* произошла у ближайшего общего предка *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. syringae* и *P. putida* (бутстреп-поддержка клады 94%), что дало начало III группе, а последующая дупликация происходила независимо от принадлежности к конкретному виду. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта 18-29-05071.

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ *EX VIVO*

А.А. Попов¹, К.Е. Орищенко^{2,3}, К.Н. Науменко¹, А.Н. Евдокимов¹, И.О. Петрусева¹, О.И. Лаврик¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Институт цитологии и генетики СО РАН;

³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск

Экцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН) – одна из основных систем репарации, которая отвечает за удаление широкого спектра объемных повреждений ДНК. Разработан метод анализа активности ЭРН в клетке (*ex vivo*), основанный на восстановлении продукции флуоресцентного белка TagRFP в результате репарации повреждений, блокирующих экспрессию соответствующего гена. Показано, что сконструированные плазмиды, содержащие объемные повреждения nFlu или nAnt вблизи промотора гена tagRFP, подвергаются репарации в эукариотических клетках (НЕК 293Т) и могут быть использованы для анализа активности ЭРН *ex vivo*. Сравнительный анализ временной зависимости накопления флуоресцентных клеток после трансфекции nFlu- и nAnt-ДНК выявил различия в эффективности их репарации системой ЭРН клеток НЕК 293Т. Разработанный метод может быть использован для сравнения репаративного статуса клеток и эффективности репарации повреждений разной структуры. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-10056).

УВЕЛИЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 *IN VITRO* ЗА СЧЕТ ВВЕДЕНИЯ ПРИРОДНЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ В НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК

Д.В. Прохорова^{1,2}, Е.С. Журавлев¹, П.О. Толстова^{1,2}, А.С. Доме¹, Г.А. Степанов¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

В настоящее время продолжается активный поиск путей применения системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 в медицине, сельском хозяйстве и фундаментальных биомедицинских исследованиях. Однако одной из основных проблем остается возникновение неспецифичных эффектов при редактировании генов системой CRISPR/Cas9 в эукариотических клетках. Перспективным подходом к её решению является разработка новых вариантов, модифицированных направляющих РНК. В данной работе было исследовано влияние природных модифицированных нуклеотидов: N6-метиладенозина (m6A), 5-метилцитидина (m5C) и псевдоуридина (psiU) – на активность и специфичность функционирования системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. Было показано, что включение природных модифицированных мономеров в структуру как единых направляющих РНК, так и транс-активирующих РНК позволяет сохранить высокую эффективность гидролиза модельных ДНК-субстратов *in vitro*. Основным преимуществом введения N6-метиладенозина, 5-метилцитидина и псевдоуридина в направляющие РНК, которое было обнаружено в ходе исследования, является увеличение точности функционирования системы CRISPR/Cas9 по сравнению с немодифицированным вариантом. Кроме того, использование модифицированных направляющих РНК обеспечивает снижение уровня иммуностимулирующей и цитотоксической активности при трансфекции их в клетки человека за счет ингибирования взаимодействия искусственных РНК с РНК-зависимыми рецепторами каскадов врожденного иммунного ответа.

Работа выполнена при поддержке Нацпроекта «Наука» 0245-2019-0001.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИМЕРНЫХ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК С ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫМИ ГРУППАМИ ПОВЫШАЕТ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 *IN VITRO*

Д.В. Прохорова^{1,2}, М.С. Купрюшкин¹, И.С. Довыденко¹, Г.Ю. Шевелёв¹, А.С. Доме¹, Д.В. Пышный¹, Г.А. Степанов¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

На данный момент разработано большое количество способов усовершенствования работы системы CRISPR/Cas9. Одним из основных методов является модификация направляющих РНК, которая позволяет: увеличить устойчивость РНК к гидролизу, повлиять на иммуногенные и цитотоксические эффекты, а также уменьшить количество неспецифичных эффектов при редактировании генов системой CRISPR/Cas9 в эукариотических клетках. В предыдущих работах была продемонстрирована возможность использования РНК/ДНК-химерных направляющих для улучшения, как эффективности, так и специфичности работы системы CRISPR/Cas9 [1,2]. В данной работе были описаны новые химерные направляющие РНК, содержащие единичные фосфорилгуанидиновые группы (ФГ), и была исследована активность и специфичность функционирования системы CRISPR/Cas9 *in vitro* при их использовании. Было показано, что включение единичных фосфорилгуанидиновых мономеров в дистальную область протоспейсера РНК/ДНК-химерных направляющих РНК позволяет сохранить высокую эффективность гидролиза модельных ДНК-субстратов *in vitro*. Далее на системе ДНК-субстратов, содержащих мутации в области протоспейсера, было проведено сравнение специфичности системы CRISPR/Cas9 с ФГ-модифицированными направляющими РНК относительно системы с немодифицированной РНК. Было выявлено, что введение одной фосфорилгуанидиновой модификации в зависимости от положения мутации позволяет увеличить от 2 до 15 раз специфичность работы системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. Таким образом, введение фосфорилгуанидиновых модификаций в химерные направляющие РНК позволяет улучшить свойства системы CRISPR/Cas9, что открывает перспективы внедрения новых направляющих в решение прикладных задач. Работа выполнена при поддержке РФФИ 21-64-00017.

1. O'Reilly D. et al., *Nucleic Acids Res.*, 2019.

2. Kim H.Y. et al., *Chem. Commun.*, 2019.

ЦЕРЕБРАЛЬНАЯ ИШЕМИЯ ИЗБИРАТЕЛЬНО ВЛИЯЕТ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ НЕЙРОСИГНАЛИЗАЦИИ И ВОСПАЛЕНИЯ В КОНТРАЛАТЕРАЛЬНОМ ПОЛУШАРИИ МОЗГА КРЫС

Ю.А. Ремизова^{1,2}, И.Б. Филиппенков¹, В.В. Ставчанский¹, А.Е. Денисова², Л.В. Валиева¹, Д.Д. Бородко², Л.В. Губский^{2,3}, С.А. Лимборская¹, Л.В. Дергунова¹ *¹Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт»; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ; ³Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва*

Ишемический инсульт относится к остро протекающим патологиям головного мозга с высоким уровнем летальности. Он является мультифакториальным заболеванием, в патогенезе, диагностике и лечении которого значительное место занимает геномная составляющая. Ранее на модели обратимой окклюзии правой средней мозговой артерии (tMCAO) у крыс под контролем магнитно-резонансной томографии с помощью RNA-Seq в масштабах полного генома нами была изучена роль кодирующих и нескольких типов регуляторных РНК в развитии ишемического повреждения ипсилатерального полушария. Так, через 24 часа после tMCAO была показана активация множества генов системы воспалительного ответа и снижение активности генов систем передачи нервного импульса. Однако особенности реакций генома клеток вне зон повреждения, в том числе контралатерального полушария, остаются практически невыясненными, несмотря на то что данная зона мозга нередко используется в качестве контроля при изучении механизмов ишемического повреждения мозга и нейропротекции. В данной работе изучена активность отдельных генов воспаления (*Hspa1*, *Hspb1*, *Cd14*, *Nfkb2*, *Socs3*) и нейросигнализации (*Grm3*, *Drd1*, *Chrm1*, *Neurod6*, *Cplx2*) в контралатеральном полушарии у крыс через 24 часа после 90-минутной tMCAO относительно ложнопериорванных животных с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Для нормализации данных ПЦР были использованы гены *Gapdh* и *Rpl3*. В результате было показано достоверное ($p < 0,05$) повышение экспрессии генов воспаления *Hspa1*, *Hspb1*, *Cd14*, *Socs3* в 3,0 и более раза и гена *Nfkb2* – в 1,8 раза. Вместе с тем среди генов нейросигнализации нами было зафиксировано значимое изменение экспрессии только гена *Cplx2*, увеличившего уровень мРНК в 4,8 раза. При этом изменение экспрессии остальных исследованных генов нейросигнализации в контралатеральном полушарии через 24 часа после tMCAO было недостоверным.

Таким образом, в контралатеральном полушарии выявлен специфический ответ генома на церебральную ишемию, который частично совпадает с реакцией в ипсилатеральном полушарии. Результаты указывают на наличие сложной пространственно-временной регуляции ишемического процесса в мозге на транскриптомном уровне. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта №21-34-70048.*

ВЛИЯНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ КРОВИ НА КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Ю.И. Савиновская, А.А. Нуштаева, А.В. Савельева, В.В. Морозов, Е.И. Рябчикова, Е.В. Кулигина, В.А. Рихтер, Д.В. Семенов *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

Внеклеточные везикулы такие как экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца переносят биомолекулы клеток-доноров к клеткам-реципиентам, модулируя в последних физиологические и патологические процессы. Однако молекулярные механизмы процессов, активируемых или подавляемых в клетках-реципиентах при взаимодействии с внеклеточными везикулами, исследованы частично. Целью данной работы является анализ влияния внеклеточных везикул крови человека на жизнеспособность, пролиферацию и экспрессию генов в клетках аденокарциномы легких линии A549. Для выделения и очистки внеклеточных везикул крови человека использовали метод центрифугирования и ультрацентрифугирования. По данным анализа траектории (NTA) внеклеточных везикул установлено, что полученные препараты содержат несколько субпопуляций частиц с гидродинамическим диаметром ~85, 155, 255 и 350-400 нм. Из данных просвечивающей электронной микроскопии установлено, что препараты внеклеточных везикул крови (фракции 160 000g) представлены наборами частиц, размер которых варьирует в диапазоне от 50 до 150 нм. По данным массового параллельного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 1500 установлено, что наборы РНК внеклеточных везикул обогащены мРНК, транскрипция которых контролируется транскрипционными факторами RBMX, NFKB1, SP1, TAF7, MYC, NLF2. Кроме того, в наборе достоверно повышен вклад мРНК, кодирующих белки рибосом, белки циркулирующих внеклеточных везикул. С использованием полнотранскриптомного секвенирования проведен анализ изменения экспрессии генов клеток аденокарциномы легких A549 под действием внеклеточных везикул крови. Установлено, что внеклеточные везикулы крови приводят к изменению экспрессии генов, контролируемых транскрипционным фактором NF-κB, а также генов регуляции апоптотического каскада, мембран эндосом и внеклеточных везикул. Полученные данные позволяют заключить, что внеклеточные везикулы крови, взаимодействуя с клетками A549 6 ч, активируют NF-κB сигнальные каскады, которые в дальнейшем (24 ч) вызывают масштабные изменения экспрессии генов контроля апоптотических процессов и индуцируют вторичные метаболические и структурные изменения в клетках-реципиентах. *Работа поддержана финансированием по бюджетному проекту ИХБФМ СО РАН № АААА-А17-117020210023-1.*

ВЛИЯНИЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ХРОМАТИН-РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА RBAF-BAF200 НА ЭКСПРЕССИЮ NF-κB ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ

А.В. Феоктистов¹, С.Г. Георгиева², Н.В. Сошникова¹

¹Институт биологии гена РАН; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

NF-κB индуцирует экспрессию различных провоспалительных генов. Такая индуцируемая экспрессия отличается от базальной экспрессии многократным увеличением уровня мРНК соответствующих генов в считанные минуты после получения клеткой сигнала. Молекулярные механизмы, отвечающие за индуцируемую и базальную транскрипцию, различны. Комплекс MEDIATOR является коактиватором NF-κB-индуцируемой транскрипции. MEDIATOR способствует пространственному сближению энхансеров и промоторов, участвует в привлечении ремоделирующих и модифицирующих гистоны дополнительных коактивационных комплексов, которые меняют структуру хроматина при индукции транскрипции. Киназный модуль комплекса MEDIATOR состоит из четырех белков (MED12, MED13, CDK8/19, CYCS), и особенно важен в регуляции экспрессии провоспалительных генов. В данной работе мы изучили взаимодействие субъединиц ремоделирующего хроматин комплекса RBAF и комплекса MEDIATOR, а также их влияние на индуцируемую транскрипцию провоспалительных генов. Мы

показали, что при осаждении специфическими антителами из клеточного лизата субъединица специфического модуля комплекса PBAF, отвечающего за связывание с хроматином – BAF200, осаждала субъединицы киназного модуля: CDK8, MED12 и коровую субъединицу MED1. Также антитела против коровой субъединицы PBAF – BAF155 осаждали MED1 и MED12. В реципроктных преципитациях антитела против MED12 осаждали BAF155 и другую субъединицу специфического модуля PBAF – BRD7. Эти взаимодействия специфичны для комплекса семейства PBAF, но не BAF и позволяют предположить функциональную вовлеченность комплекса PBAF в регуляции индуцируемой транскрипции. В процессе активации NF- κ B-зависимой транскрипции с помощью TNF- α при нокдауне BAF200 среди генов, стимулируемых CDK8 киназой, мы выявили три группы генов: увеличивающих, уменьшающих и не меняющих свою транскрипцию. В дальнейшем мы планируем изучить рекрутирование и распределение субъединиц комплексов MEDIATOR и PBAF на промоторы в процессе индукции провоспалительных генов и выяснить роль субъединиц киназного модуля MEDIATOR в этих процессах.

Данная работа поддержана Центром высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИМБ РАН (соглашение № 075-15-2019-1660 Министерства науки и образования Российской Федерации).

ПЕТЛЕОБРАЗУЮЩИЕ МИРНК-НАПРАВЛЕННЫЕ ИСКУССТВЕННЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ: ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

О.А.Патутина¹, Д.А.Чиглицева¹, Е.В.Биченкова², Б.Амирлоо², С.К.Гапонова¹, В.В.Власов¹, М.А.Зенкова¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Университет Манчестера, Манчестер, Великобритания

В настоящее время активно ведётся разработка таргетных препаратов на основе нуклеиновых кислот для терапии различных патологий, сопровождающихся aberrантной экспрессией малых некодирующих РНК – миРНК. Известно, что при развитии онкологических заболеваний происходит многократное увеличение экспрессии онкогенных миРНК. Одной из перспективных стратегий снижения их патологически высокого уровня является применение сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз (иРНКаз), которые представляют собой конъюгаты, состоящие из олигонуклеотида, связывающегося с миРНК-мишенью, и ковалентно присоединенной каталитической группы, вызывающей деградацию РНК. В данной работе разработаны и исследованы петлеобразующие миРНК-направленные иРНКазы (BC), которые состоят из адресующего олигонуклеотида и одного или двух каталитических пептидов [(LeuArg)₂Gly]₂, расположенных напротив тринуклеотидной петли, формируемой при гибридизации конъюгата с миРНК-мишенью. Разработанные конъюгаты были направлены к онкогенным миРНК миРНК-17 и миРНК-21. Согласно гель-шифт анализу разработанные конъюгаты способны связываться с миРНК с эффективностью 75-95% в зависимости от последовательности мишени. Исследование рибонуклеазной активности показало, что BC, направленные к миРНК-21, расщепляют мишень с эффективностью 19%, а BC, направленные к миРНК-17, обеспечивают 50%-ную деградацию миРНК. Основными сайтами расщепления являются С-А и U-А связи в области тринуклеотидной петли миРНК. Введение в структуру петлеобразующих конъюгатов двух каталитических пептидов увеличивает эффективность расщепления миРНК-мишени до 96%. Кроме того, установлено, что скорость деградации миРНК конъюгатами значительно увеличивается в присутствии РНКазы Н. Суммарная эффективность расщепления миРНК-17 под действием BC с двумя пептидами и РНКазы Н в 1.5 раза выше по сравнению с действием только конъюгата и в 4 раза выше, чем расщепление РНКазой Н в комплексе с олигонуклеотидом. Комбинированное действие конъюгата и РНКазы Н способствует расщеплению миРНК как по петле, так и в области гетеродуплекса, что, несомненно, приводит к её полной инактивации. Таким образом, разработанные конъюгаты могут оказаться перспективными миРНК-ингибирующими агентами *in vitro* и *in vivo*.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-14-00250.

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК, АССОЦИИРОВАННОЙ С РАКОМ ПЕЧЕНИ, И ЕЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ГОМОЛОГА В МЫШИ

О.Ю. Буренина¹, Н.Л. Лазаревич^{2,3}, И.Ф. Кустова², Т.С. Зацепин^{1,4}, М.П. Рубцова⁴, О.А. Донцова^{1,4}

¹Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий; ²НИИ канцерогенеза, РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ;

³Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁴НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Как известно, уровень экспрессии многих некодирующих РНК (нкРНК) сильно изменяется при канцерогенезе и пролиферации клеток, что позволяет рассматривать эти молекулы в качестве потенциальных онкомаркеров. Наиболее перспективным представляется поиск специфичных нкРНК, ассоциированных с определенным типом рака. Однако, проведение подобных исследований часто осложнено отсутствием подходящей животной модели и/или невозможностью предсказания потенциальных гомологов в мыши или других лабораторных организмах. В рамках данного проекта мы впервые охарактеризовали новую нкРНК СНОЛ и показали, что она довольно слабо экспрессируется в нормальных тканях печени, однако активируется при холангиокарциноме (ХЦР) – высокозлокачественном подтипе рака печени, происходящем из клеток желчных протоков. При этом в образцах тканей гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) I–III стадии уровень экспрессии СНОЛ снижается на 1–2 порядка. Удивительно, но в случае ГЦК IV стадии, а также в культуре клеток гепатомы человека HepG2, продемонстрирована, наоборот, существенная активация экспрессии СНОЛ, что может указывать на возможное участие этой нкРНК в процессах метастазирования. В случае протоковой аденокарциномы поджелудочной железы значимых изменений в экспрессии СНОЛ по сравнению с прилежащими условно нормальными тканями зафиксировано не было, что позволяет рассматривать данную нкРНК преимущественно как маркер ХЦР. Как правило, большинство нкРНК имеют очень низкий процент гомологии даже среди млекопитающих. В наших исследованиях нам удалось идентифицировать не охарактеризованный ранее мышинный транскрипт (mCHOL), содержащий 27-звенную последовательность, идентичную участку СНОЛ РНК человека. Данный регион является предполагаемой мишенью для связывания микроРНК, также гомологичной для человека и мыши. Мы показали, что mCHOL является тканеспецифичной и экспрессируется только в тестикулах, предположительно в сперматогонияльных стволовых клетках. Таким образом, обе нкРНК СНОЛ человека и мыши могут участвовать в регуляции клеточной пролиферации по схожему механизму. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 20-74-00141.*

Х РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

Поиск, выделение и синтез новых природных пептидов и белков

Устные доклады

ПЕПТИДЫ МОРСКИХ АНЕМОН С ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ И РЕГЕНЕРАТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Я.А. Андреев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва

Воспаление – это одна из необходимых стадий процесса регенерации тканей. Однако воспалительный процесс может стать хроническим, и тогда восстановления тканей не происходит. Существует множество причин развития хронического воспаления: бактериальное заражение, дисфункция иммунной системы, а также психосоматические расстройства. Фармакологическое воздействие на вышеперечисленные факторы может способствовать улучшению регенеративных процессов. Каналы TRPV1 и TRPA1 играют важную роль в процессах нейрогенного воспаления практически во всех органах человека. Нами были найдены пептиды морских анемонов, модулирующие активность каналов TRPV1 и TRPA1. Полипептид APHC3, выделенный из морской анемоны *Heteractis crispa*, модулирует активность канала TRPV1. Из морской анемоны *Metridium senile* были выделены пептиды Ms9a-1, который усиливает активацию TRPA1 канала при действии прямых агонистов в тестах *in vitro*. Оба этих пептида обладают анальгетическими и противовоспалительными свойствами. Также эффективно уменьшается симптом артрита у крыс. Также при интраназальном введении APHC3 способен изменять ответ микроглии на провоспалительный стресс и цитокиновый профиль гиппокампа. Поскольку каналы TRPV1 и TRPA1 играют важную роль в инициации и развитии нейрогенного воспаления и нейродегенерации, эти пептиды представляют огромный интерес для изучения их влияния на процессы нейродегенерации под влиянием различных стрессовых факторов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-15-00322, <https://rscf.ru/project/21-15-00322/>

НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ТОКСИНА СКОРПИОНА, БЛОКИРУЮЩЕГО КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ

А.М. Гиголаев¹, В.М. Табакмахер^{1,2}, А.И. Кузьменков¹, Э.Л. Пиньейро-Жуниор³, С. Пеньёр³, А.О. Чугунов^{1,4,5}, Р.Г. Ефремов^{1,4,5}, Я. Титгат³, А.А. Василевский^{1,5}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Школа биомедицины, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток; ³Лёвенский университет, Лёвен, Бельгия ⁴НИУ «Высшая школа экономики», Москва; ⁵Московский физико-технический институт (НИЦ), Долгопрудный

Потенциал-чувствительные калиевые каналы (KV-каналы) – важная группа ионных каналов, участвующих в таких процессах, как клеточная коммуникация, потенциал действия и формирование иммунного ответа. Помимо этого, они задействованы в развитии ряда заболеваний. Так, канал KV1.3 связан с различными аутоиммунными, онкологическими, хроническими воспалительными и метаболическими заболеваниями. В свою очередь, мутации в канале KV1.1 связывают с развитием атаксии, эпилепсии, системного головного кровообращения. Все эти данные говорят о том, что KV-каналы представляют интерес как объекты для исследований, и для их изучения необходимы тонкие инструменты, способные различать их изоформы. Такими инструментами являются, в частности, пептидные токсины из яда скорпионов. Объектом наших исследований стал ранее охарактеризованный в нашей лаборатории токсин MeKTx13-3 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*. Он представляет собой поровый блокатор различных изоформ KV-каналов. В данной работе мы решили попробовать увеличить селективность этого токсина к каналам KV1.1 и KV1.3, так как он особенно хорошо действует именно на них (полумаксимальная ингибирующая концентрация ИК50 составляет ~2 и 9 нМ соответственно). Для поиска аминокислотных замен, которые повлияют на селективность, нами были созданы и проанализированы компьютерные модели комплексов токсина с различными изоформами KV-каналов. Производные токсина были получены в бактериальной системе экспрессии, а их активность исследовалась методом двухэлектродной фиксации потенциала на панели KV-каналов, экспрессированных в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*. В результате были получены два производных с увеличенной селективностью: MeKTx13-3_RMRH, более селективное по отношению к KV1.1 за счет увеличения аффинности к данной изоформе (ИК50 ~0,1 нМ); и MeKTx13-3_AAAR, более селективное к KV1.3 за счет снижения аффинности к KV1.1 (ИК50 ~550 нМ).

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 20-44-01015).

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ НОВОГО ПОРООБРАЗУЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ МОРСКОЙ БАКТЕРИИ *MARINOMONAS PRIMORYENSIS*

Е.А.Зелепуга¹, О.Л. Воронина², О.Ю.Портнягина¹, О.Д.Новикова¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток; ²НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва

Недавно нами был охарактеризован новый порообразующий белок из морской психрофильной бактерии *Marinomonas primoryensis* КММ 3633Т (MrOmp). Бактерия *M. primoryensis*, обитающая в экстремальных условиях, выделена из образца прибрежного морского льда в Амурском заливе Японского моря. Аминокислотный состав MrOmp отличается высоким содержанием кислых и низким содержанием серосодержащих аминокислот и отсутствием триптофана. Согласно генетическим признакам MrOmp был классифицирован как Pori_{in} 4. Теоретическая модель пространственной структуры MrOmp впервые построена методом гомологичного моделирования с привлечением в качестве прототипов нескольких поринов (OmpF и OmpC порины из *E. coli*, Omp32 из *Delftia acidovorans* и OmpK36 из *Klebsiella pneumoniae*), последующим уточнением конформации петель, оптимизацией и минимизацией энергии в силовом поле Amber14:ЕНТ с помощью программного пакета MOE2020.09

ССГ. Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности MrOmp и пространственное картирование позволили определить predisпозицию конформационно гибких и внутренне неупорядоченных регионов (Intrinsically Disordered Protein Regions, IDPRs). Оказалось, что 53,8% остатков MrOmp предсказаны как внутренне неупорядоченные, что указывает на принадлежность морского порина к группе высоко неупорядоченных белков. С-концевой фрагмент β -барреля MrOmp включает несколько конформационно гибких участков в отличие от OmpF и OmpC поринов иерсиний (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. ruckeri*) и классического порина *E. coli*, для которых этот домен высоко структурирован и отличается повышенной стабильностью. Внешние петли MrOmp, формирующие вестибуль поры белка, с вероятностью 85-98% включают протяженные IDPRs. Обнаружена аномально высокая конформационная подвижность функционально важной для парообразующих белков петли L3. В случае морского порина она значительно короче и образует внутри поры сеть нековалентных внутримолекулярных взаимодействий с гибкими участками β -барреля, что не наблюдается у поринов наземных бактерий. Полученные результаты дают основание предполагать, что увеличение количества IDPRs и регионов с повышенной конформационной пластичностью в MrOmp связано с большим адаптивным потенциалом морских бактерий. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00318.

ПОЛУЧЕНИЕ И СТРУКТУРА АНТИПОЛИМЕРИЗАЦИОННОГО ПЕПТИДА ИЗ САПРОПЕЛЯ

Е.П. Калинин, Н.Н. Буслаева

Тюменский государственный медицинский университет МЗ РФ, Кафедра биологической химии, Тюмень

Исследования биологически активных соединений растений являются одним из ключевых источников новых фармакологических кандидатов. Получение легко модифицируемых веществ из природных источников позволяет быстрее достигать клинически значимых результатов и побуждает проводить скрининговые исследования групп растений, содержащих целевые молекулы. В ряду таких соединений особое положение занимают пептиды, поскольку методы изучения их структуры отрабатаны, первичные структуры молекул варьибельны, а широкие возможности для химических модификаций позволяют управлять биологической активностью молекул, повышая возможности создания новых фармакологических средств. При этом известно, что короткоцепочечные пептиды могут одновременно демонстрировать множественные биологические эффекты, влияя одновременно на несколько ферментативных, транспортных или рецепторных систем.

Представляет теоретический и практический интерес изучение структуры и механизмов оказываемых биологических эффектов изучаемого в лабораториях Тюменского ГМУ антиполимеризационного пептидного соединения, которое было выделено из сапропеля и очищено до приемлемых для дальнейшего исследования характеристик. В ходе выполнения работы была идентифицирована первичная структура пептида, было произведено моделирование пространственной структуры и сформулированы предположения о локализации функционально значимых участков в структуре с помощью методов *in silico*. В экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* было показано, пептид из сапропеля замедляет скорость образования фибринового сгустка, причем этапом реализации его биологического действия является процесс полимеризации фибринмономеров. Также исследовано состояние коагуляции и микроциркуляции у лабораторных животных на фоне введения эффектора. Установлено, что пептид, помимо взаимодействия с коагуляционными факторами или рецепторами тромбоцитов, что напрямую влияет на активность свертывания крови, изменяет реологические характеристики кровотока, наблюдаемые при повреждении эндотелия.

Полученные результаты позволяют оценить перспективность дальнейшего изучения антиполимеризационного пептида из сапропеля по схеме, предусмотренной для доклинических испытаний, и приемлемость нового соединения для разработки новых средств фармакологической коррекции гемостаза.

ПРИРОДНЫЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ В СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

И.Е. Кашеверов¹, Д.С. Кудрявцев¹, Е.В. Крюкова¹, И.А. Иванов¹, И.В. Шелухина¹, С. Луо², М. Зуридакис³, Ю.Н. Уткин¹, В.И. Цетлин¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Университет Хайнаня, Хайкоу, Китай; ³Греческий институт Пастера, Афины, Греция

В большом арсенале соединений, взаимодействующих с различными подтипами никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (НАХР), пептиды занимают особое место. К настоящему времени выявлено их большое количество в ядах животных, но существенный прогресс в изучении структурно-функциональных свойств различных НАХР сыграли α -конотоксины. Эти небольшие пептиды, выделяемые из морских моллюсков рода *Conus*, в силу простоты синтеза, высокой специфичности по отношению к определенным подтипам НАХР и возможности направленного конструирования их аналогов позволяют понять различия в тонкой организации лиганд-связывающих участков близких по структуре подтипов НАХР. Возможности современных структурных методов исследования и компьютерного моделирования позволяют определять аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии лиганда с мишенью, целенаправленно создавать новые соединения с исключительной селективностью к определенному подтипу рецептора, видоселективные вещества, потенциальные лекарственные средства. Последнее обусловлено участием определенных подтипов НАХР в ряде заболеваний и патологических состояний – болезнях Альцгеймера и Паркинсона, шизофрении, миастении, аутизма, болевых синдромах, никотиновой зависимости. В частности, α -конотоксины Tx1B и Reg1A стали базой для создания видоселективных соединений, эффективно различающих $\alpha 7$ подтип НАХР человека и крысы. Структурные исследования, компьютерное моделирование и направленное создание аналогов α -конотоксина Lv1A выявили аминокислотные остатки, участвующие в образовании комплекса рецептор-лиганд и определяющие исключительное сродство этого пептида к $\alpha 3\beta 2$ НАХР. Аналогичный подход позволил нам установить предпочтительные участки связывания α -конотоксина Rg1A на $\alpha 9\alpha 10$ подтипе НАХР человека, который рассматривается в качестве мишени при лечении некоторых типов болевых синдромов. Высокая холинергическая активность природных пептидов, содержащих в своем составе большое количество положительно заряженных аминокислот (конотоксины, ваглерины и аземиопсин из яда змей), привела нас к открытию способности синтетических олигоаргининов эффективно взаимодействовать с определенными

подтипами nAHR. Некоторые из исследованных пептидов (конотоксины, аземиопсин, олигоаргинины) показали высокий клинический потенциал в тестах *in vivo*.

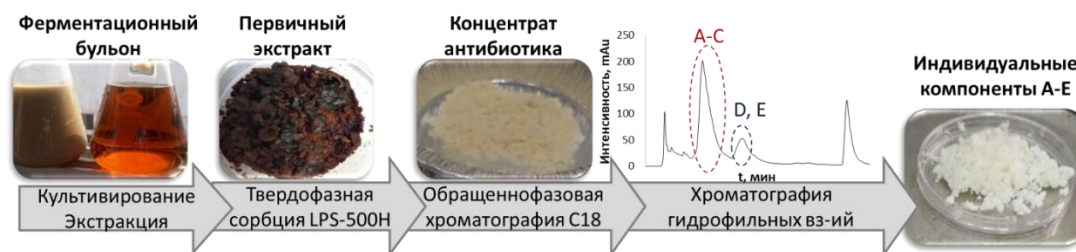
ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЛИПОГЛИКОПЕПТИДНОГО АНТИБИОТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ГАУЗЕМИЦИНА

Т.В. Кравченко^{1,2}, В.А. Алферова^{1,2}, А.П. Тюрин^{1,2}, А.С. Парамонов¹, О.А. Лапчинская², З.О. Шенкарев¹, В.А. Коршун^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

Антибиотики являются главным средством в сдерживании бактериальных инфекций. Однако возникновение полирезистентных к известным терапевтическим средствам штаммов патогенов представляет собой серьезную угрозу для здоровья человека во всем мире и требует поиска новых препаратов. Многие исследователи направляют свои усилия на поиск новых антибиотиков, чтобы удовлетворить острую потребность в терапии инфекционных заболеваний [1].

Ранее был обнаружен штамм *Streptomyces tendae* ВКПМ Ас-1980, продуцирующий более 20 химически родственных липогликопептидов и обладающий активностью в отношении грамположительных бактерий [2]. В данной работе предложена технология выделения индивидуальных компонентов из ферментационного бульона. Она заключается в экстракции культуральной жидкости штамма *n*-бутанолом, обогащении сырца методами твердофазной экстракции на сорбенте LPS-500H и обращеннофазовой хроматографии на сорбенте C18 и дальнейшим препаративным разделением путем хроматографии гидрофильных взаимодействий в условиях ВЭЖХ.



Данная технология позволила получить три основных (с массами 1847, 1916 и 1930 Да) и два минорных (с массами 1786 и 1800 Да) индивидуальных компонента антибиотического комплекса и определить их физико-химические и биологические свойства. Соединения были названы гауземицинами А–Е в честь советского микробиолога Г.Ф. Гаузе. Антибиотики являются многообещающими для разработки новых препаратов, как природных, так и полусинтетических. Выделение, установление структуры и спектра биологической активности компонентов, помимо перспектив клинического применения, позволит расширить представления о взаимосвязи структуры и активности в данном семействе антибиотиков. Эффективные методы разработки пептидных антибиотиков открывают широкие возможности для их химической модификации, в том числе получения конъюгатов с векторными молекулами для адресной доставки. Работа частично поддержана грантом РНФ 20-15-00361.

1. Gunjal V. B., and et. al. *J of Med. Chem.* 2020, 63, 21, 12171-12195.

2. Lapchinskaya O. A., and et. al. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017, 42, 6, 664–671.

ДВОЙСТВЕННАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ АНАЛОГОВ А-НЕЙРОТОКСИНОВ ИЗ ЯДА КОБРЫ *N. MELANOLEUCA*

Е.В. Крюкова, Л.В. Сон, Р.Х. Зиганшин, Т.В. Андреева, В.Г. Старков, Д.С. Кудрявцев, И.Е. Кашеверов, В.И. Цетлин, Ю.Н. Уткин

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

Яды кобр состоят из смеси белков и пептидов, значительную часть которых составляют разнообразные трехпетельные токсины (ТПТ), в том числе – α -нейротоксины, являющиеся антагонистами никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAHR). Недавно было показано, что α -нейротоксины способны блокировать рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-А), также как и nAHR, принадлежащие к семейству цис-петельных лиганд-зависимых ионных каналов. Важная роль в связывании с этими рецепторами принадлежит центральной петле ТПТ. Целью настоящей работы была проверка гипотезы о ключевой роли положительного заряда (Arg36) в центральной петле нейротоксина для его взаимодействия с ГАМК-А рецептором. Предполагалось сравнить активность известных α -нейротоксинов 1 и 2 из яда кобры *N. melanoleuca*, аминокислотные остатки которых различаются в этой позиции. Методами жидкостной хроматографии из яда кобры *N. melanoleuca* были выделены три длинных α -нейротоксина, и определена их аминокислотная последовательность. Только один нейротоксин (ТХ-NM4) был идентичен известному нейротоксину 2 *N. melanoleuca*, другой (ТХ-NM3-1) был его аналогом с 5 заменами, а вместо нейротоксина 1 мы выделили его аналог с 3 заменами (ТХ-NM2). Замены не затрагивали позицию 36. Методом конкурентного радиолигандного анализа с использованием ¹²⁵I- α -бунгаротоксина определены параметры связывания токсинов с nAHR мышечного и нейронального $\alpha 7$ типов. Все токсины высокоэффективно взаимодействовали с данными рецепторами с наномолярным средством. При взаимодействии с ацетилхолин-связывающим белками самым активным оказался Тх-NM2, два других токсина показали микромолярное средство. Функциональная активность токсинов оценивалась электрофизиологическим методом двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах, экспрессирующих разные подтипы ГАМК-А. Проведенный анализ показал, что токсины взаимодействуют с ГАМК-А, но намного слабее, чем с nAHR. Эффективное ингибирование $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ГАМК-А (IC₅₀~1мкМ) было показано для ТХ-NM3-1 и ТХ-NM2, а ТХ-NM4 проявил слабую активность. При концентрации 10 μ M

Tx-NM3-1 почти полностью блокировал $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ и $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ рецепторы, Tx-NM4 и Tx-NM2 были менее активны. Гипотеза о роли Arg36 не подтвердилась. Результаты молекулярного моделирования показали, участие петли III нейротоксинов в связывании токсина с рецептором.

НОВЫЙ ИНГИБИТОР АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИЗ ЯДА АНЕМОНЫ *METRIDIDIUM SENILE*

К.И. Лубова¹, И.Е. Кашеверов¹, Я.А. Андреев^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва

Яды анемонов – богатый источник пептидов с самой разной биологической активностью. На сегодняшний день известны молекулы, модулирующие активность ионных каналов семейств Kv, Nav, ASIC и TRP. Короткие пептиды из ядов имеют значительный потенциал как инструментальные молекулы для изучения своих мишеней, так и в качестве потенциальных фармакологических субстанций. Мы предположили, что в ядах морских анемонов могут содержаться также и модуляторы активности ацетилхолиновых рецепторов мышечного типа, так как многие анемоны питаются подвижными морскими животными, которых необходимо быстро обездвигать. С этой целью мы проанализировали яд питающейся рыбой морской анемоны *Metridium senile* и выявили компоненты с антихолинергической активностью. Наиболее биологически активным среди выделенных пептидов оказался пептид Ms11a-3, эффективно блокирующий ацетилхолиновый рецептор мышечного типа у рыб. Мы определили первичную структуру данного пептида, получили рекомбинантный аналог и определили его пространственную структуру. Ms11a-3 обладает уникальной укладкой, являющейся видоизменённым цистиновым узлом с большим положительным зарядом, сконцентрированным в С-концевой части молекулы. Моделирование показало, что именно остатки аргинина обуславливают эффективное связывание пептида с мишенью. Таким образом, мы впервые показали наличие антихолинергических компонентов в ядах анемонов, которые видоспецифично блокируют активность ацетилхолиновых рецепторов и обладают уникальной структурой. Проект поддержан РФФИ, грант 20-04-00761 А.

ЛИГАНДЫ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИЗ ЯДОВ ПАУКООБРАЗНЫХ

П.Б. Опарин, Д.С. Кудрявцев, И.Е. Кашеверов, А.А. Василевский

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

Яды паукообразных являются богатым источником нейротоксинов, воздействующих на разнообразные потенциал- и лиганд-активируемые ионные каналы. При этом в литературе до недавнего времени отсутствовали сведения о токсинах скорпионов или пауков, взаимодействующих с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR), одной из наиболее изученных групп лиганд-активируемых ионных каналов. В ходе скрининга коллекции ядов паукообразных нами было установлено, что некоторые из них содержат компоненты, конкурирующие с α -бунгаротоксином за сайт связывания в nAChR. Наиболее выраженной активностью обладали яды черного скорпиона *Orthochirus scrobiculosus* и южнорусского тарантула *Lycosa singoriensis*. В результате их многостадийного фракционирования хроматографическими методами были выделены индивидуальные токсины, взаимодействующие с nAChR. Нами было показано, что в яде *O. scrobiculosus* ингибирующей активностью в отношении nAChR обладает ранее описанный блокатор калиевых каналов OSK1. Из яда паука *L. singoriensis* были выделены сразу пять полипептидных компонентов, обладающих сродством к nAChR. Методом автоматического секвенирования по Эдману были установлены их частичные N-концевые последовательности. Все эти компоненты ранее не были описаны, хотя для некоторых из них в открытых базах данных нами были обнаружены гомологи с высокой степенью сходства. Для OSK1 и одного из токсинов *L. singoriensis* (Ls8.1) были определены концентрации полумаксимального ингибирования nAChR. Примечательно, что они оба обладали активностью в отношении как мышечного, так и нейронального $\alpha 7$ подтипов nAChR. При этом для обоих токсинов сродство к мышечному подтипу было более сильным. Полученные данные указывают на потенциально широкое разнообразие лигандов nAChR в ядах паукообразных. В перспективе эти вещества могут стать эффективными инструментами в исследовании различных nAChR, а также физиологических и патологических процессов, в которых они задействованы.

ТОКСИНЫ ЗМЕЙ – НОВЫЕ АНАЛОГИ И НОВЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

Ю.Н. Уткин¹, А.В. Осипов¹, Е.В. Крюкова¹, Т.И. Терпинская², Р.Х. Зиганшин¹, Т.В. Андреева¹, В.Г. Старков¹, И.Е. Кашеверов¹, В.И. Цетлин¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Яды змей исследуются довольно давно, все основные токсины и их биологические эффекты достаточно хорошо изучены. Одним из наиболее обширных семейств змеиных токсинов являются так называемые трех-петельные токсины (ТПТ); их структура характеризуется компактным ядром, из которого выходят три петли, образованные антипараллельными бета-тяжами. Тем не менее большое разнообразие ядов позволяет открывать новые аналоги, а у известных токсинов обнаруживаются новые свойства. Так, впервые в яде гадюк, в частности гадюки *Azemiops feae*, мы обнаружили ТПТ и показали, что их рекомбинантные аналоги взаимодействуют с никотиновыми холинорецепторами (nXp). В яде кобры *Naja melanoleuca* мы обнаружили новые аналоги α -нейротоксинов, относящихся к ТПТ, и показали, что они с различным сродством взаимодействуют с ионотропными рецепторами ГАМК. Это позволило высказать предположение об участии петли 3 токсинов в связывании с рецептором ГАМК. Один из обнаруженных токсинов с различным сродством взаимодействовал с двумя участками связывания агонистов/антагонистов в nXp, таким же свойством обладал известный нейротоксин 1 из яда кобры *Naja oxiana*. Наряду с открытыми нами ранее α -бунгаротоксинами они образуют новую группу α -нейротоксинов, различающих участки связывания в мышечных nXp. Известно, что nXp вовлечены в онкогенез, а их роль зависит от типа рака. Мы показали, что ТПТ α -кобраток-

син, блокатор некоторых типов нХР, включающих мышечный и альфа7, подавляет развитие карциномы Эрлиха, но стимулирует пролиферацию клеток глиомы С6. Исследование биологической активности других ТПТ показало, что цитотоксины кобры обладают антипролиферативной активностью и вызывают гибель инфузории *Tetrahymena pyriformis* за счет разрушения их мембраны. Мы также впервые обнаружили, что белок, подобный цитотоксину, из яда кобры *Naja kaouthia* обладает антибактериальной активностью. Приведенные данные свидетельствуют о перспективности исследования ядов змей с целью открытия новых соединений и новых биологических эффектов уже известных токсинов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 20-54-00033 и 21-54-54005 и гранта БРФФИ М20Р-254.

Стендовые доклады

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО ПРОФИЛЯ СЫВОРОТКИ МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА, КОРОВЫ И КОЗЫ

А.С. Бакланова, Т.В. Гришина, И.Е. Красовская, В.Е. Стефанов, Л.Е. Леонова

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Молоко является не только источником питательных веществ для млекопитающих, но и содержит широкий спектр белков, пептидов, и других компонентов, необходимых для роста и развития новорожденных, а также защиты от вирусных и бактериальных инфекций. Целый ряд биохимических процессов осуществляется биологически-активными белками и пептидами в составе белковых комплексов, способных сохранять и транспортировать функционально значимые компоненты в агрессивной среде желудочно-кишечного тракта. Характеристика и идентификация белков молока, включая белковые комплексы, важна для понимания биологической роли молока. Целью данной работы было получение сравнительных характеристик белкового профиля и выявление белковых комплексов сыворотки молока человека, козы и коровы. Были использованы препараты молока и сыворотки, а также фракций сыворотки молока человека, коровы и козы после ультрафильтрации на Vivaspin с диаметром пор, отсекающих молекулярные массы 1000, 300, 100, 50, 30, 10 и 3 кДа. Анализируемые пробы были охарактеризованы методами электрофореза, ОФ ВЭЖХ, MALDI MS и иммунохимическими методами. Результаты показали сходства и различия белкового профиля препаратов молока человека, коровы и козы. Основным отличием молока, сыворотки и фракций сыворотки молока человека после ультрафильтрации от соответствующих препаратов молока коровы и козы является отсутствие β -лактоглобулина, наличие лизоцима, менее выраженной казеиновой фракции и более выраженной фракции высокомолекулярных белков, в том числе лактоферрина. Показано наличие низкомолекулярных белков в составе высокомолекулярных фракций сыворотки молока человека, коровы и козы после ультрафильтрации. Выявлены отдельные биологически активные белки и пептиды (HNP 1-3 и HNP4, α -лактальбумин, лизоцим, лактоферрин, лактопероксидаза и миелооксидаза) в препаратах молока человека и сыворотки, а также фракциях сыворотки после ультрафильтрации более 1000 кДа и 100–300 кДа и фракциях ОФ ВЭЖХ. Низкомолекулярные белки α -лактальбумин и β -лактоглобулин были обнаружены в составе высокомолекулярных комплексов сыворотки молока козы во фракциях 30–50, 50–100, 100–300 и более 1000 кДа и коровы во фракциях – 50–100, 100–300, 300–1000 и более 1000 кДа.

ПОЛУЧЕНИЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОГО БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ЗЕЛЁНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА ДЛЯ УЛЬТРАВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СКРИНИНГА АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

М.Н. Баранова^{1,2}, С.С. Терехов^{1,2}, Ю.А. Мокрушина^{1,2}, М.А. Юнин¹, И.В.Смирнов^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Устойчивость бактерий к антибиотикам – серьёзная угроза общественному здоровью, признанная ВОЗ и Министерством здравоохранения России. Для её решения важную роль играет разработка методов идентификации веществ, обладающих антибактериальной активностью. При поиске новых антибиотиков особенно важно рассматривать в качестве мишени грамотрицательных бактерий, по своей природе устойчивых к действию большинства современных антимикробных средств. Ранее нами была разработана ультравысокопроизводительная платформа профилирования микробиомов, позволяющая идентифицировать биологическую активность отдельных компонентов микробных сообществ. В её основе лежит сочетание микрофлюидной инкапсуляции единичных клеток в каплях двойной эмульсии и флуоресцентно-активируемой сортировки получаемых капель для отбора интересующего фенотипа. Для обнаружения антимикробной активности с помощью платформы важно наличие флуоресцентного штамма-сенсора. Требования к репортерному штамму включают высокий уровень флуоресцентного сигнала, его равномерное распределение в бактериальной популяции и отсутствие агрегации клеток при культивации в жидкой среде. В ходе данного исследования на основе *E. coli* был получен грамотрицательный биосенсор, удовлетворяющий вышеперечисленным критериям. Панель штаммов *E. coli* была протестирована для оптимизации условий роста, морфологии клеток и однородности культуры. По данным уровня флуоресценции в культуре, проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии была выбрана оптимальная комбинация штамма BL21, гена зелёного флуоресцентного белка sfGFP и сильных промоторов T7 и pglpT при росте на средах ВНИ и ТВ, обеспечивающая оптимальные параметры биосенсора. Полученные штаммы могут быть использованы для ультравысокопроизводительного скрининга для поиска новых антибиотиков, активных в отношении грамотрицательных бактерий. *Работа поддержана грантом РНФ 19-14-00331.*

НОВАЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНАЯ ЭНДОГЛЮКАНАЗА СЕМЕЙСТВА GH12 ИЗ *THIELAVIA TERRESTRIS*

А.И. Селимзянова, Н.В. Цурин, С.В. Рыков, О.В. Березина

НИЦ «Курчатовский институт», ГосНИИгенетика, Курчатовский геномный центр, Москва

Зерно составляет основу кормовых смесей для сельскохозяйственных животных. Гемиллюлозы (ГЦ), входящие в состав зерна, являются основной причиной высокой вязкости кормовых смесей и кормовой массы в ЖКТ свиней и домашней птицы, значительно снижая усвояемость и перевариваемость. Ферментативный гидролиз – эффективный способ снижения вязкости кормов, содержащих значительное количество ГЦ, главным образом, β-глюканов (БГ). Поскольку многие промышленные и сельскохозяйственные технологические процессы протекают при высоких температурах, особый интерес представляют термостабильные ферменты из термофильных микроорганизмов. Гликозил-гидролазы из семейства 12 (GH12) способны специфически гидролизовать (1,4)-β-D-глюкозидные связи БГ злаков, а также целлюлозы, лихенана и ксилоглюкана. Природными продуцентами ферментов семейства GH12 являются мицелиальные грибы – эффективные деструкторы растительной биомассы. Нами сконструирован штамм *Pichia pastoris* – продуцент термостабильной эндоглюканазы семейства GH12 из термофильного гриба *Thielavia terrestris*. Кодирующую часть гена *ThiTheEgh12*, не содержащую интронов и сигнального пептида, клонировали в вектор pPICZαA для интеграции в *P. pastoris* под контроль промотора AOX1. Секретция целевого белка обеспечивалась сигнальной последовательностью pre-pro-α-F из *S. cerevisiae*, а очистка – His-хвостом на C-конце белка. Клетки *P. pastoris* X33 трансформировали плазмидной ДНК pPIC-ThiTheEgh12. Интеграция целевого гена в хромосому *P. pastoris* происходила по механизму гомологичной рекомбинации. В результате метанол-индуцированной экспрессии целевого гена в *P. pastoris* был получен белок *ThiTheEgh12*, очищенный затем из культивационной жидкости с помощью металл-хелатной хроматографии. Рекombинантный фермент проявлял максимальную активность на БГ при pH 4,6, 70°C, а также был активен на лихенане, карбоксиметилцеллюлозе и ксилоглюкане. Время полуинактивации при 55, 60, 65 и 70°C составило, соответственно, 936, 202, 138 и 12 мин. Удельная активность *ThiTheEgh12* на БГ при pH 4,6, 50°C составила 578 Ед./мг белка. Широкая субстратная специфичность и высокие термостабильность, температурный оптимум и удельная активность делают фермент *ThiTheEgh12* перспективным кандидатом для биотехнологического применения.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВОЙ ФРАКЦИИ ЭКСТРАКТА ПРЕПУЦИАЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАБАРГИ СИБИРСКОЙ

М.С. Нестеров, Р.А. Агельдинов, Д.В. Хвостов, С.Л. Люблинский, В.Н. Каркищенко

Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России, пос. Светлые горы, Московская область

Масс-спектрометрия белков и пептидов биоматериалов животного происхождения в настоящее время быстро совершенствуется как методологическая основа протеомики как в плане качественного, так и количественного анализа. Результатом расшифровки белкового профиля белковой фракции из экстракта мускуса кабарги и их классификации стали аннотированные группы идентифицированных белков. ВЭЖХ-МС анализ высокого разрешения после ферментативного гидролиза трипсином продемонстрировал идентификацию большого числа белковых компонентов. Суммарно из фракции экстракта препуциальной железы было идентифицировано 66 белковых компонентов различной природы, из которых 15 на момент анализа считались устаревшими. Выполнено комплексное исследование белкового состава биологически активных компонентов экстрактов препуциальной железы кабарги сибирской методами гель-размерной эксклюзионной хроматографии и пептидного картирования высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) высокого разрешения с применением ферментативного расщепления трипсином. Установлено молекулярно-массовое распределение характерное для белковых экстрактов мускуса кабарги. Выявлены оптимальные условия экстракции, хроматографического разделения и относительного количественного определения главных компонентов. Подробно представлены результаты идентификации наиболее значимых белковых компонентов в экстрактах мускуса кабарги в соответствии с алгоритмом поисковой программы Spectrum Mill MS Proteomics Workbench и белковой базой данных Uniprot. Данные белкового профилирования кластеризованы по молекулярным и биологическим функциям. Установлены связи идентифицированных белков с возможными механизмами биологического действия и мишенями, на которые могут оказывать воздействие белковые компоненты изучаемых объектов. По результатам исследования сделаны выводы о многокомпонентности белкового состава экстрактов. Идентифицированы предшественники нейропептидов, которые являются природными агонистами опиоидного рецептора ORL1. Один из белков этой группы носит название препроноцицептин (PНОС) и является предшественником ноцистатина, ноцицептина и орфанина FQ2. Изучен спектр его биоактивности: в тестах на гипералгизию, аллодинию, тревожность и депрессию.

Конкурс молодых ученых

ХИМИЧЕСКОЕ МНОГООБРАЗИЕ АНТИМИЦИНОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ШТАММОМ *STREPTOMYCES ALBIDOFILAVUS* A10, АССОЦИИРОВАННЫМ С МУРАВЬЯМИ-ДРЕВОТОЧЦАМИ *CAMPONOTUS VAGUS*

А.А. Баранова¹, В.А. Алферова¹, А.П. Тюрин¹, А.А. Чистов^{2,3}, В.А. Коршун^{1,3}, М.В. Бирюков^{1,4}, В.Ю. Закалюкина⁴

¹НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе; ²НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ⁴МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Антибиотики, продуцируемые симбиотическими микроорганизмами, играют важную роль в регуляции экологических сообществ. Актинобактерии-симбионты могут защищать своих хозяев, производя антимикробные соединения. При изучении

микроорганизмов, ассоциированных с муравьями-древоточцами *Camponotus vagus*, мы выделили штамм-продуцент A10 *Streptomyces albidoflavus*. Было обнаружено, что штамм A10 подавляет рост различных грибов, в том числе и энтомопатогенных грибов. Экстракты культуральной жидкости штамма A10 фракционировали с использованием гр-HPLC с контролем антифунгальной активности. Фракции анализировали методом ESI LC/MS с масс-фрагментацией. Дерепликация с использованием библиотеки спектров GNPS MS/MS показала, что в этих фракциях содержатся известные антибиотики антимицины. Эти циклические депептиды представляют собой семейство природных соединений, которые имеют консервативный 3-формамидосалицилатный фрагмент. Эти соединения продуцируются многими видами актиномицетов и обладают значительным структурным разнообразием, в основном обусловленным различиями в размере цикла и вариациями в боковых гидрфобных алкильных цепях. Несмотря на то, что большинство соединений соответствуют по массе компонентам комплекса антимицина А, некоторые из полученных антибиотиков демонстрируют необычный характер фрагментации в ESI CID MS/MS. Отличия в массе фрагментного иона, соответствующего консервативному 3-формамидосалицилатному ядру, позволяют предположить, что некоторые обнаруженные вещества образуют отдельный структурный подтип антимицинов [1].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-33-70215).

1. Baranova et al., *Microorganisms* 2020, 8, 1948

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ С ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

Н.Н. Буслаева

Тюменский государственный медицинский университет МЗ РФ, кафедра биологической химии, Тюмень

Растения остаются одним из природных источников новых химических соединений, обладающих потенциалом для создания на их основе новых лекарственных средств. Объектом нашего исследования стали растения семейства бурачниковых, являющиеся источниками пептидов, тормозящих гемокоагуляцию на уровне полимеризации мономерного фибрина. Роль этих соединений в растениях и потенциал их медицинского использования недостаточно изучены, в первую очередь, потому что не установлена их первичная структура и происхождение в растении-продуценте. Представляется целесообразным установить зависимость антикоагуляционного действия пептидов от их первичной структуры и установить на какие коагуляционные процессы, кроме полимеризации фибрина, могут влиять полученные соединения. В ходе выполнения работы из растений окопник лекарственный (*Symphytum officinale*), нонья темная (*Nonea pulla*), медуница мягчайшая (*Pulmonaria mollissima*) и чернокорень лекарственный (*Cynoglossum officinale*) были выделены и очищены пептиды с молекулярными массами от 1,5 до 1,8 кДа, что соответствует полипептидной цепи около 20 аминокислотных остатков. В силу небольшой длины пептидов, их аминокислотная последовательность была установлена методом деградации по Эдману, а впоследствии сопоставлена с результатами масс-спектрометрического анализа. Установлено, что пептиды данных представителей семейства бурачниковых высокомолекулярны, что говорит об их общем происхождении, однако поиск эквивалентных нуклеотидных последовательностей и сопоставление первичной структуры пептидов с уже описанными белками растений результатов не дал. Биологическую активность пептидов оценивали по способности тормозить тромбообразование при постановке стандартных клинических коагуляционных тестов: активированного частичного тромбопластинового времени, протромбинового времени, тромбинового времени и торможения полимеризации фибринмономеров. Изменение агрегации тромбоцитов в присутствии пептидов оценивали методом Бора, регистрируя развитие агрегации тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме при внесении различных индукторов тромбоцитов. Различия в первичной структуре полученных пептидов обуславливают и различия в их антиполимеризационной активности, причем удлинение цепи сопровождается повышением способности пептидов тормозить гемокоагуляцию и ингибировать агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ и эпинефрином. Использование этих индукторов в присутствии полученных пептидов приводит к снижению скорости и максимума развития агрегации в сравнении с контрольными пробами. При стимуляции агрегации тромбоцитов коллагеном скорость агрегации, как и ее максимальные значения, характеризующие ответ тромбоцитов на внесение индуктора, соответствуют результатам, полученным в контрольных пробах. При использовании всех индукторов регистрируется выраженная деградация образовавшихся агрегатов, что свидетельствует о нарушении взаимодействия фибриногена и тромбоцитарных рецепторов. Данное наблюдение подтверждает механизм противосвертывающего действия исследуемых пептидов — ингибирование полимеризации мономеров фибрина.

Наличие нескольких точек ингибирования гемостаза свидетельствует о высоком потенциале пептидов растений семейства бурачниковых как фармакологических средств и обуславливает необходимость их дальнейшего изучения.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ АНДАЛУСИЦИНА – ДВАЖДЫ МЕТИЛИРОВАННОГО ЛАНТИБИОТИКА ТРЕТЬЕГО КЛАССА ИЗ *BACILLUS THURINGIENSIS* SV. *ANDALOUSIENSIS*

А. Григорьева^{1,2}, Ю. Андреева^{1,2}, М. Серебрякова^{2,5}, С. К. Найр⁶, Г. Липпенс⁷, К. Северинов^{1,3,4,8}, С. Дубилей^{1,2}

¹Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва; ²Институт биологии гена РАН, Москва;

³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена РАН,

Москва; ⁴Институт молекулярной генетики РАН, Москва; ⁵НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁶Кафедра биохимии, Университет Иллинойса в Урбана-Шампейн, Иллинойс, США;

⁷Институт биотехнологии Тулузы, Университет Тулузы, Франция ⁸Институт микробиологии им. Ваксмана, Писка-тауэй, Нью-Джерси, США

Лантипептиды – рибосомально синтезируемые посттрансляционно-модифицируемые пептиды, характеризующиеся образованием циклов за счет тиоэфирных связей аминокислотных остатков. Лантипептиды подразделяются на пять классов в зависимости от их структуры и путей биосинтеза. Представители I и II классов подробно охарактеризованы, в то время как о пептидах других трех классов и их биосинтезе известно меньше. В данной работе описывается новое подсемейство лантипептидов III класса, представители которого отличаются простой структурой – единичным C-концевым лабионином. В работе

был описан новый лантибиотик – андалусин. Масс-спектрометрический анализ MALDI-MSMS и исследование пептида методом ЯМР, позволили определить его уникальную структуру – единственный лантионин на С-конце, множественные остатки дегидробутирина, образованные дегидратацией остатков треонина, и ранее неизвестная для лантипептидов III класса пост-трансляционная модификация – диметилирование α -аминоконца пептида. Биосинтетический кластер, ответственный за производство пептида, был определен в геноме продуцирующего штамма, верифицирован и охарактеризован молекулярно-биологическими методами. Создана система гетерологической экспрессии андалусина в *B. subtilis*; активность метилтрансферазы AncMT, ответственной за дополнительную пост-трансляционную модификацию пептида, подтверждена *in vivo* и восстановлена *in vitro* с использованием рекомбинантных белков и частично-модифицированного субстрата. На основе системы гетерологической экспрессии были созданы конструкции с точечными мутациями аминокислот пептида-предшественника, вовлеченных в образование лантионина. Такие системы позволили показать способность лантионинсинтазы AncKS образовывать не только лантионин, но и лантионин, а также толерантность метилтрансферазы AncMT к С-концевой структуре пептида. Зрелый андалусин проявляет антимикробную активность в отношении различных грамположительных бактерий, однако, активность сильно зависит от α -N диметилирования пептида. Описанные результаты делают ферменты биосинтеза андалусина потенциально применимыми для модификации существующих и создания искусственных антимикробных препаратов, что является крайне актуальной биотехнологической задачей.

[1] Grigoreva et al, *iScience*, 2021, ISSN2589-0042, DOI:10.1016/j.isci.2021.1024

СРАВНЕНИЕ ВНЕШНИХ ВЕСТИБЮЛЕЙ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ hERG И EAG — ПЕРСПЕКТИВА РЕДИЗАЙНА ПЕПТИДА-БЛОКАТОРА ВеКм-1

Н.А. Доброхотов^{1,2}, А.А. Василевский^{1,2}, А.О. Чугунов^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Потенциал-чувствительные калиевые каналы (Kv) — семейство транспортных порообразующих белков клеточных мембран. Их главная функция — поддержание и регуляция трансмембранной разности потенциалов. Многие представители этого семейства нуждаются в дальнейшем исследовании. Например, из группы Kv10–Kv12 наиболее изучены два канала: human Ether-à-go-go Related Gene 1 (hERG1 или Kv11.1), отвечающий за реполяризацию в клетках сердца, и Ether-à-go-go-1 (EAG1 или Kv10.1), встречающийся в мозге и участвующий в клеточной пролиферации. Для канала hERG1 известны селективные блокаторы, например пептидный токсин ВеКм-1 из яда скорпиона. Несмотря на схожее строение, для EAG1 аналогичных блокаторов не известно, хотя они могли бы стать ключом к лечению некоторых опухолевых заболеваний, в патогенезе которых EAG1 играет важную роль. Знание молекулярной структуры входных вестигулей этих каналов поможет разработать селективный лиганд EAG1 на основе модели комплекса hERG1–ВеКм-1. Сравнение структур hERG1 (канал человека) и EAG1 (крысы) выявило важное отличие: внешний вестигуль EAG1 меньше за счет остатков Q394 и L397. Мы построили модели комплексов hERG1–ВеКм-1 (по данным двойного мутагенеза [1]) и EAG1–ВеКм-1 и провели их молекулярную динамику. Сравнение рассчитанных межмолекулярных взаимодействий позволило установить, что мешает ВеКм-1 блокировать схожий с hERG1 канал EAG1: это потеря ионных взаимодействий между остатками пептида R1, R20, R27 и остатком канала D591 в случае hERG1, на месте которого у EAG1 находится L397. На основе проведенных расчетов мы предлагаем редизайн активной поверхности токсина ВеКм-1, предположительно увеличивающий сродство к каналу EAG1: замены R20→K и R27→K улучшат взаимодействие с остатком Y393, F36→K позволит образовать ионную связь с D398, а F14→S уменьшит объем лиганда в “узком” месте вестигуля. В дальнейшем предложенное производное ВеКм-1 будет синтезировано, а его активность изучена на канале EAG1. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-44-01015).

1. Tseng GN et al. Probing the outer mouth structure of the HERG channel with peptide toxin footprinting and molecular modeling. 2007. *Biophys. J.* 92, 3524–3540. doi: 10.1529/biophysj.106.097360

Х РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

Биологические функции и механизмы действия пептидов и белков

Устные доклады

БИОСИНТЕЗ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НОВОГО СЕМЕЙСТВА ПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ ГАУЗЕМИЦИНОВ
**Т.В. Кравченко^{1,2}, А.П. Тюрин^{1,2}, А.С. Парамонов², А.А. Баранова^{1,2}, Н.В. Равин³, А.В. Марданов³, С.С. Терехов²,
О.А. Лапчинская², З.О. Шенкарев², В.А. Коршун^{1,2}, В.А. Алферова^{1,2}**

¹НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ³Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

В нашей лаборатории был обнаружен штамм *Streptomyces tendae* ВКПМ Ас-1980, продуцирующий более 20 химически родственных липогликопептидов и обладающий активностью в отношении грамположительных бактерий [Lapchinskaya O. A., and et. al. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017, 42, 6, 664–671]. Основные компоненты антибиотического комплекса были выделены в индивидуальном виде и установлена их структура, которая, как оказалось, обладает крайне высокой структурной новизной. Полногеномное секвенирование штамма-продуцента *Streptomyces tendae* ВКПМ Ас-1980 позволило предложить путем *in silico* анализа основные биосинтетические пути, ведущие к этим оригинальным структурам. Более того, предполагаемый путь биосинтеза новой небелковой аминокислоты 2-амино-4-гидроксис-4-фенилбутановой кислоты, входящей в состав гауземицинов, из фенилаланина был подтвержден экспериментально. Помимо уникальной структуры и необычного пути биосинтеза, изучаемые соединения обладают также и оригинальным механизмом действия. Изучение морфологии клеток и накопления прекурсоров биосинтеза клеточной стенки под действием гауземицинов показало, что их механизм действия в наибольшей степени напоминает мембрано-активные соединения, прежде всего даптомицин. Тем не менее, спектры активности этих соединений сильно отличаются, что говорит об оригинальной молекулярной мишени этих соединений.

Работа поддержана грантом РФФИ 20-15-00361.

ГОВОРЯТ ЛИ МЕМБРАНЫ БЕЛКАМ, КАК СВЕРНУТЬСЯ: ОТ КОНФОРМАЦИОННОЙ СВОБОДЫ ДО БЕЛКОВОЙ ДЕМОКРАТИИ?

М. Богданов

Кафедра биохимии и молекулярной биологии Техасского университета, Медицинская школа Макговерна, Хьюстон, Техас, США; Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань

В ходе эволюции и белки, и липиды коэволюционировали вместе или реэволюционировали конвергентно в контексте липидной среды мембранных систем, в которых они взаимно зависят друг от друга. Благодаря уникальной гетерогенной липидной среде, в которую они встраиваются, интегральные мембранные белки должны следовать общим основным архитектурным принципам и правилам сборки. В какой степени липидный бислой приспосабливается к встраиваемому и встроенному мембранному белку и наоборот? Существует ли конформационная белковая память? Является ли мембранный белок “наивным” в том смысле, что он не сохраняет никакой “конформационной памяти”, передаваемой данным липидным профилем? Должны ли молекулярные шапероны быть белками? Действительно ли липидный бислой не является зоной переворота (флип-флоп) для интегральных мембранных белков? Является ли конформационная свобода мембранных белков фундаментальным принципом поведения и сборки мембранного белка?

Несколько новых анализов и методик были разработаны и использованы для проверки действия липошаперонов (Eastern–Western блот, бесклеточный биосинтез липидов и т.д.) и недавно сформулированное Правило Баланса Зарядов (SCAM™ технология флипосом, определение трансмембранного распределения (асимметрии) индивидуальных липидов и т. д.), а также исследование того, как липиды могут выполнять свои липошаперонные и топогенные функции: либо через их химическую структуру, либо через асимметричное распределение? Оказалось, что действительно мембранные белки могут сворачиваться с помощью липидов, и белки-перевертыши, кувыркающиеся (“flip-flopping”) в мембранах способны “изменить своё решение” после того, как «сделали свой выбор», и “пересмотреть” свою конформацию и ориентацию в зависимости от липидного профиля, в котором они оказались во время или после встраивания.

Новые результаты предполагают, что липидная и белковая композиционная и физическая асимметрия метаболически контролируются, чтобы сбалансировать относительную скорость синтеза, встраивания и транслокации липидов и белков, удовлетворить способность роста оболочки, поддерживать общую жесткость бислоя и трансмембранный баланс зарядов.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ Т КЛЕТОК С ХИМЕРНЫМ АНТИГЕННЫМ РЕЦЕПТОРОМ (CAR-T) ПРОТИВ КЛЕТОЧНЫХ И ЖИВОТНЫХ МОДЕЛЕЙ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

**А.Х. Валиуллина¹, Е.А. Змиевская¹, Р.Р. Мифтахова¹, А.Р. Рахматуллина¹, М.Н. Журавлева¹, А.В. Петухов^{1,3},
А.А. Ризванов¹, Э.Р. Булатов^{1,2}**

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ³НМИЦ им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

Иммунотерапия модифицированными лимфоцитами, в частности CAR-T клетками, является молодой и перспективной ветвью современной фундаментальной и клинической онкологии. Данный вид клеточной терапии показал значительные результаты при лечении гематологических новообразований, однако на данный момент обладает невысокой эффективностью против солидных опухолей. Это обусловлено рядом факторов, таких как, ограниченная эффективность миграции CAR-T клеток в ткань солидной опухоли, наличие иммуносупрессивного опухолевого микроокружения, а также небольшое коли-

чество пригодных для таргетирования антигенов. Нами оценена эффективность цитотоксического действия CAR-T клеток *in vitro* против двумерных и трехмерных клеточных моделей солидных опухолей, трансдуцированных антигеном CD19, а также *in vivo* на ксенографтных мышинных моделях. В качестве пары CAR/антиген использовались FMC63-28Z и CD19, так как данная пара в последние годы зарекомендовала себя в качестве удобной модели за счет детальной охарактеризованности и доказанной эффективности *in vitro*, *in vivo* и в клинической практике. Согласно полученным данным МТТ-теста, биосенсорного анализа в режиме реального времени и флуоресцентной микроскопии – добавление CAR-T клеток привело к существенному снижению пролиферативной активности клеток солидных опухолевых линий MDA231(CD19⁺) и MCF7(CD19⁺). Способность CAR-T клеток к проникновению вглубь многослойной трехмерной конструкции, полученной с помощью биопринтера, оценена методом конфокальной микроскопии. Для оценки эффективности CAR-T терапии на ксенографтных животных моделях с подсаженными клетками карциномы предстательной железы PC-3M(CD19⁺Kat⁺) проводился мониторинг роста опухоли и прижизненная визуализация с помощью молекулярного имиджера IVIS Spectrum. При этом отмечена умеренная эффективность CAR-T клеток и снижение случаев метастазирования в экспериментальной группе животных. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-74-20026 и стипендии Президента Российской Федерации СП-227.2019.

ПАРЫ ПРОТЕАЗА-ИНГИБИТОР У БАКТЕРИЙ: ЯДЫ И ПРОТИВОЯДИЯ

И.В. Демидюк, К.Н. Чухонцева, И.М. Бердышев, А.О. Светлова, М.А. Карасева, С.В. Костров

Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Протеолиз принципиально важен для функционирования всех живых организмов. Существенную роль в регуляции протеолиза играют белковые ингибиторы протеаз. Однако многие принципы такой регуляции остаются невыясненными. Недавно мы обнаружили, что за генами протеазинподобных протеаз (ППП) в геномах бактерий находятся гены их ингибиторов (ИНГ), относящихся к новому семейству. Во многих случаях гены ППП и ИНГ формируют бицистронный оперон, однако достаточно часто транскрипция этих генов осуществляется независимо. В отличие от описанных ранее бактериальных протеаз, находящихся в паре с ингибитором, ППП не секретируются конститутивно. Для *Serratia proteamaculans* нами показано, что протеазин (Плн), прототип ППП, накапливается в клетках в виде неактивного предшественника, и ингибитор, эмфоприн, не нужен для подавления внутриклеточной активности Плн. Это привело к гипотезе, что ППП и ИНГ являются элементами неизвестной системы межбактериальной конкуренции, где протеаза является токсином, доставляемым в клетки-жертвы, а ингибитор – иммунный белок, защищающий сестринские клетки. На модели протеазы S (PrtS), ППП из инсектопатогена *Photorhabdus luminescens*, мы показали, что ППП может оказывать токсическое действие на бактериальные клетки, а ИНГ могут его предотвращать, что свидетельствует в пользу высказанной гипотезы. Однако PrtS, в отличие от Плн, активируется внутри клетки-продуцента, а ингибитор предотвращает эту нежелательную активацию. Следовательно, функции пар ППП-ИНГ у разных бактерий не идентичны. На это указывает и то, что у *Ph. luminescens*, в отличие от *S. proteamaculans*, гены ППП и ИНГ независимы. При этом не ясно, отличаются ИНГ только дополнительными функциями, или основные функции ППП и ИНГ у бактерий также различны. Таким образом, протеазы могут выступать в качестве бактериотоксинов, а ингибиторы защищать клетки от такого их действия. При этом, вероятно, токсичность протеаз может быть неспецифическим, побочным эффектом, в этом случае ингибитор предотвращает нежелательную активацию фермента, но может являться основной функцией, и тогда ингибитор способен работать как иммунный белок. По-видимому, изменение функций в паре протеаза-ингибитор сопровождается изменением регуляции активности соответствующих генов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00756.

ЭНДОЦИТОЗ ПО КЛАТРИН-ЗАВИСИМОМУ ПУТИ ВОВЛЕЧЕН В ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СЕКРЕТИРУЕМОГО ГЛИКОПРОТЕИНА KPILP ИЗ *NICOTIANA BENTHAMIANA*, СТИМУЛИРУЮЩЕГО МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ТРАФИК МАКРОМОЛЕКУЛ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Н.М. Ершова¹, Е.В. Шешукова¹, К.А. Камарова^{1,2}, Т.В. Комарова^{1,2}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Стрессовые воздействия биотической и абиотической природы требуют скоординированных и быстрых реакций у растений. Такой ответ возможен благодаря межклеточной коммуникации, которая осуществляется через плазмодесмы (ПД), уникальные нанопоры, которые обеспечивают контролируемый симпластный обмен белков, РНК и сигнальных молекул, объединяя цитоплазму и эндоплазматический ретикулум (ЭР) соседних клеток. Белки, регулирующие пропускную способность ПД, преимущественно являются ее негативными регуляторами (Dorokhov et al., 2019). Наши исследования белка KPILP (Kunitz protease inhibitor like protein) *Nicotiana benthamiana*, показали, что KPILP является позитивным регулятором межклеточного трафика. Он не обнаруживается в интактных листьях, но накапливается в клетках только после воздействия абиотического и биотического стресса (Sheshukova et al., 2017). KPILP содержит сигнальный пептид и во время секретируется через аппарат Гольджи (АГ) N-гликозилируется. Обработка листьев, экспрессирующих KPILP:GFP, антибиотиком брэфельдином А, который нарушает транспорт из ЭР в АГ, изменяет паттерн внутриклеточного распределения KPILP:GFP, указывая, что KPILP проходит путь традиционной внутриклеточной секреции. При ингибировании эндоцитоза за счет сверхпродукции C-концевого фрагмента тяжелой цепи клатрина KPILP:GFP диффузно распределяется в апопласте, в контрольных же условиях белок распределен в виде точечных структур внутри клетки и скапливается в районе ПД. Таким образом, KPILP благодаря наличию сигнального пептида секретируется в апопласт, подвергаясь N-гликозилированию, а затем происходит интернализация белка в цитоплазму при участии клатрин-зависимого эндоцитоза и концентрирование в районе ПД. Стресс-индуцированное накопление KPILP приводит к активации межклеточного транспорта макромолекул, а присутствие всех сайтов N-гликозилирования является обязательным для проявления этой функции. Для объяснения механизма действия KPILP, мы предложили гипотетическую модель, в которой этот гликопротеин в стрессовых условиях «выключает» или «вы-

тесняет» факторы, ответственные за уменьшение апертуры ПД. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№19-74-20031)*

1. Dorokhov Y.L. et.al.(2019). *Plants*, 8, 595
2. Sheshukova E.V. et.al.(2017). *Front Plant Sci.*, 8, 2137

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ НА ПОРООБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЛИМИКСИНА Б

А.А. Захарова, С.С. Ефимова, О.С. Остроумова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Полимиксин Б (ПМБ) представляет собой катионный антибиотик, механизм действия которого заключается в нарушении целостности мембран грамотрицательных бактерий посредством связывания заряженных аминокислотных остатков липо-пептида с карбоксильными и фосфатными группами липополисахаридных компонентов в составе мембран клеток-мишеней (Yu et al., *Biomed. Res. Int.*, 2015; Zavascki et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007; Hancock et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999;). В настоящее время ПМБ используется при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными бактериальными возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью, обуславливающих такие социально-значимые заболевания как внебольничная пневмония, сепсис, менингит, сальмонеллез и др. (Nation et al., *Lancet. Infect. Dis.*, 2015). Целью исследования являлось установление влияния изменения физико-химических свойств липидных бислоев на порообразующую активность ПМБ. Путем варьирования липидного состава модельных мембран было показано, что ключевым фактором, определяющим способность тестируемого липопептида к порообразованию, является отрицательный заряд мембраны, что, вероятно, обусловлено положительным зарядом молекул ПМБ. Кроме того, в пользу электростатических взаимодействий свидетельствует рост ПМБ индуцированного трансмембранного тока при снижении дипольного потенциала мембраны в присутствии дипольных модификаторов мембран. Показано, что увеличение латерального давления в углеводородном коре мембраны за счет инкорпорирования в состав бислоя фосфолипидов с разветвленными ацильными цепями, а также введения в систему низкомолекулярных модификаторов эластических свойств мембраны, увеличивающих отрицательную спонтанную кривизну липидных монослоев, ингибирует каналобразующую активность ПМБ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 19-14-00110.

ЛИПИД-БЕЛКОВЫЙ СИНЕРГИЗМ В МОРФОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Д.В. Ивченков, А.М. Варижук, В.Н. Лазарев, И.А. Лацис П.В. Башкиров

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Липидный бислой в клетке – это сложная динамическая система, чьи свойства, геометрия и состав постоянно меняются. Механизмы морфогенеза клеточной мембраны включают в себя полимеризацию белков на поверхности мембраны (клатрин, динамин), прикладывание точечной силы перпендикулярно поверхности мембраны (актин, различные белковые моторы), а также механизм «краудинга». Для ряда периферийных белков, в том числе и домена ENTH белка эписина было показано, что стерическое взаимодействие между молекулами белка может приводить к спонтанной тубуляции гигантских униламеллярных везикул. При этом предполагается, что амфифильные полипептиды выполняют только роль «якоря», закрепляющего белок на мембране. В данной работе мы диспутируем о роли амфипатических мотивов периферийных белков, которую они могут играть в процессе морфогенеза клеточных мембран. На примере Н0 пептида ENTH домена нами проведено исследование взаимодействия таких пептидов с липидным бислоем различной геометрии и липидного состава, а также влияния пептидов на изменение формы и эластических параметров мембран. Методами спектроскопии КД нами показано, что в растворе пептид находится в состоянии статистического клубка. В присутствии отрицательно заряженных липидов пептид адсорбируется на поверхности мембраны, происходит его конформационное изменение клубок -> альфа-спираль. В случае неспецифического взаимодействия с заряженной мембраной пептид обладает большей аффинностью к мембранам с большей кривизной поверхности. На липидной нанотрубке (НТ), было показано, что при встраивании Н0 спирали во внешний монослой НТ наблюдается почти двукратное уменьшение изгибной жесткости, в результате чего происходит сужение НТ. При наличии небислоевого липида DOPЕ в составе гигантской униламеллярной везикулы встраивание Н0 пептидов приводит к спонтанному вытягиванию из везикул тубул. В отсутствие небислоевых липидов такого эффекта не наблюдалось. На основании полученных результатов можно выдвинуть предположение о существовании универсального механизма регуляции геометрической формы мембран, в основе которого лежит липид-белковый синергизм.

РОЛЬ БЕЛКОВ С АМИЛОИДНЫМИ СВОЙСТВАМИ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ДРОЖЖЕЙ

Т.С. Калебина, В.В. Рекстина

Кафедра молекулярной биологии, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Клеточная стенка и плазматическая мембрана, разделенные периплазматическим пространством, формируют поверхность дрожжей, которая является компартментом, ответственным за взаимодействие их клеток с окружающей средой, а также играет важную роль во взаимоотношениях патоген-хозяин при развитии кандидозов. В докладе будут суммированы результаты серии работ, в которых авторами показано, что белки с амилоидными свойствами, локализованные в клеточной стенке и плазматической мембране клеток дрожжей, в первую очередь ферменты, участвующие в ремоделировании основного структурного полисахарида глюкана, играют определяющую роль в формировании и функционировании молекулярного ансамбля клеточной поверхности этих микроорганизмов. Изучены посттрансляционные модификации этих белков и способ их закрепления.

Показано, что изучаемые белки представлены в клеточной стенке в виде разных пулов молекул, имеющих различную прочность прикрепления к глюкану. Для одного из белков с амилоидными свойствами, локализованного в клеточной стенке, а именно глюканозилтрансглюкозилазы Bgl2p, продемонстрирована способность фибриллироваться после выделения, изучены условия фибриллизации. Выявлены микрокомпарменты, формируемые белками с амилоидными свойствами, расположенные мозаично на поверхности клеток дрожжей. Предложена гипотеза функционирования изучаемых белков в этих микрокомпартаментах.

Собственные экспериментальные данные о способах закрепления, посттрансляционных модификациях и компартиментализации белков с амилоидными свойствами клеточной поверхности дрожжей в совокупности с данными литературы позволяют представить новый взгляд на молекулярную организацию клеточной поверхности дрожжей.

ОПУХОЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ФОЛДИНГ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Р.Г. Киямова

НИЛ «Биомаркер», Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Поиск опухоль-специфических мишеней, среди которых мембранные белки занимают особое место, важен для разработки новых эффективных противоопухолевых препаратов и чувствительных диагностических тест-систем. Интересно отметить, что трансмембранные белки, которые демонстрируют измененные паттерны посттрансляционных модификаций в опухолевых клетках, как правило, имеют в своем составе большой внеклеточный домен, с потенциальными дисульфидными связями и сайтами гликозилирования, роль которых мало изучена.

На примере натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b, который имеет 8 трансмембранных доменов и большой экстрамембранный (внеклеточный) домен 4 (ЭМД4, 250-360 а.о.), с 4 цистеинами и 6 потенциальными сайтами гликозилирования мы изучаем особенности распознавания мембранных белков моноклональными антителами.

Антитела L2 (20/3), MX35, а также гуманизированные терапевтические антитела Rebmb200, ХМТ-1536 и ХМТ-1592 распознают один и тот же эпитоп в пределах ЭМД4 транспортера NaPi2b, который чувствителен к действию восстанавливающих агентов типа ДТТ. Особенности распознавания этого эпитопа моноклональными антителами, наличие цистеинов и потенциальных сайтов гликозилирования в составе ЭМД4 NaPi2b, а также тот факт, что эти антитела специфично накапливаются именно в опухолевых клетках при введении их *in vivo*, позволили нам сделать предположение о существовании опухоль-специфической конформации большого внеклеточного домена транспортера NaPi2b.

Нам удалось впервые показать роль дисульфидных связей и N-гликозилирования в формировании конформации большого внеклеточного домена NaPi2b, обеспечивающей разную доступность эпитопа MX35 в составе ЭМД4 натрий-зависимого транспортера NaPi2b. Показана роль ЭМД4 в регуляции его транспортной активности и представлен новый потенциальный механизм этой регуляции за счет изменения конформации ЭМД4 из-за ре-аранжировки дисульфидных связей внутри ЭМД4 транспортера. Полученные результаты вносят свой вклад в понимание структурных и функциональных особенностей мембранных белков на примере фосфатного транспортера NaPi2b, в том числе в опухолевых клетках, что представляет большой интерес для разработки более специфичных противоопухолевых препаратов.

ОБРАТИМО ГЛИКОЗИЛИРУЕМЫЙ ПОЛИПЕПТИД КЛАССА 1 NICOTIANA BENTHAMIANA АССОЦИИРОВАН С МЕМБРАНАМИ АППАРАТА ГОЛЬДЖИ И ЛОКАЛИЗОВАН В ПЛАЗМОДЕСМАХ

Т.В. Комарова^{1,2}, Е.В. Шешукова², К.А. Камарова^{1,2}, Н.М. Ершова²

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, ²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Обратимо гликозилируемые полипептиды класса 1 растений (¹RGP, reversibly glycosylated polypeptide) получили название за способность автогликозилироваться *in vitro*. Позже были обнаружены другие функции RGP: УДФ-арабинопиранозамутазная активность, участие в синтезе структурных сахаров клеточной стенки, а также в негативной регуляции пропускной способности плазмодесма [Saqib, A. et al. (2019) *Glycobiology* 29, 839–846]. Показана ассоциация ¹RGP с мембранами аппарата Гольджи (АГ), а относительно локализации в плазмодесмах имеются противоречивые данные. Но несмотря на многочисленные исследования, посвященные ¹RGP в растениях разных видов, остается ряд вопросов относительно внутриклеточного трафика и функции этих белков. Целью нашей работы было выделение гена ¹RGP из *Nicotiana benthamiana* и определение локализации ¹NbRGP в клетке.

В результате поиска гомологов белка ¹AtRGP1 в базе данных SolGenomics для *N. benthamiana* была обнаружена последовательность с 92% идентичностью. Как и другие гены, кодирующие белки этой группы, ¹NbRGP содержит интрон. Был создан ряд генноинженерных конструкций для экспрессии в *N. benthamiana*, кодирующих ¹NbRGP, слитый с флуоресцентными белками. ¹NbRGP:GFP распределяется как в цитоплазме, так и точно по периферии клетки, проявляя характеристики белка, ассоциированного с плазмодесмами (ПД). Одним из общепринятых маркеров ПД является транспортный белок вируса табачной мозаики (МР_{TMV}). При одновременном синтезе ¹NbRGP:GFP и МР_{TMV}:RFP флуоресцентные сигналы этих белков ко-локализуются по периферии клетки. Для оценки возможности взаимодействия ¹NbRGP с МР_{TMV} и белком ПД PDL1 была использована система бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC) на основе YFP. В случае пары МР_{TMV} / ¹NbRGP сигнал YFP был распределен в соответствии с паттерном, характерном для ПД. При анализе пары ¹NbRGP / PDL1 также наблюдалось формирование YFP, указывающее на ко-локализацию этих белков. Используя маркер АГ, GONST, мы показали, что ¹NbRGP ассоциирован с мембранами АГ, но со стороны цитоплазмы. Таким образом, внутриклеточный транспорт ¹NbRGP осуществляется с участием мембран АГ, а пунктом его финальной локализации, по-видимому, является цитоплазматический «рукав» ПД.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (№19-74-20031).

ГЛОБАЛЬНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЗМА УБИКВИТИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ТРЕКИНГА

А.А. Кудряева, А.А. Белогуров

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

АТФ-зависимый протеолитический фактор 1 (APF-1), сегодня известный как убиквитин, играет центральную роль в клеточном протеостазе, поскольку служит ключевым сигналом для деградации белков и органелл, как в убиквитин-протеасомной системе, так и при аутофагии, соответственно. Несмотря на продолжительную и насыщенную историю изучения убиквитин-протеасомной системы на протяжении уже почти четырех десятилетий ряд ключевых вопросов, таких как длина убиквитиновой цепи, круговорот и деградация самого убиквитина до сих пор остаются нерешенными. Использование метода PRIME (PRobe Incorporation Mediated by Enzymes), в котором используется мутированная липоат-лигаза, способная внутриклеточно присоединять молекулу низкомолекулярного флуорофора резорурфина к специфичной аминокислотной последовательности LAP, слитной с белком-мишенью, позволило получить качественно новые данные о метаболизме убиквитина. Сочетанием метода PRIME с прижизненной флуоресцентной микроскопией, визуализацией флуоресценции в полиакриламидном геле, а также флуоресцентно-активированным клеточным сортированием (FACS) было впервые установлено, что (1) время полужизни убиквитина составляет 4 часа; (2) динамическое внутриклеточное равновесие достигается при шести мономерах убиквитина на молекулу субстрата; (3) в среднем каждый четвертый акт взаимодействия убиквитинированного субстрата с протеасомой сопровождается разрушением одной молекулы убиквитина; (4) включение убиквитина в определенные типы цепей напрямую коррелирует с периодом их полураспада; и (5) аминокислотный остаток лизина K27 в последовательности убиквитина имеет важнейшее значение в терминах его внутриклеточной стабильности. Суммируя полученные результаты, в рамках настоящего исследования нами были получены основополагающие данные, раскрывающие особенности функционирования убиквитин-протеасомной системы на качественно новом уровне.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ 19-14-00262 «Исследование особенностей функционирования убиквитин-протеасомной системы с применением методов геномного редактирования».

1. Kudriaeva AA, Livneh I, Baranov MS, Ziganshin RH, Tupikin AE, Zaitseva SO, Kabilov MR, Ciechanover A, Belogurov AA Jr. In-depth characterization of ubiquitin turnover in mammalian cells by fluorescence tracking. *Cell Chem Biol.* 2021

ЛИНКЕРНЫЕ КОНЬЮГАТЫ АМИНОПЕНИЦИЛЛИНОВ С БЕЛКАМИ КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ ИММУНОГЕНЫ И МЕЧЕННЫЕ ЛИГАНДЫ В БИОАНАЛИЗЕ

О.С. Куприенко, И.И. Вашкевич, А.И. Зильберман, О.В. Свиридов

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

В биоаналитических системах, предназначенных для скрининга вредных остаточных количеств бета-лактамов антибиотиков (пенициллинов и цефалоспоринов) в животноводческой продукции, используются конъюгаты бета-лактамов с пероксидазой из корней хрена (HRP) и микропланшетные сорбенты с иммобилизованными рекомбинантными рецепторами – пенициллинсвязывающими белками (PBP) бактерий или антителами, получаемыми иммунизацией лабораторных животных бета-лактамами гаптенами, конъюгированными с инертными белками. В настоящей работе синтезированы новые линкерные конъюгаты аминопенициллинов ампициллина (Amp) и амоксициллина (Amox), определены их иммуногенные свойства при введении кроликам и установлены иммуноаналитические характеристики в рецепторном (ELRA) и иммуноферментном (ELISA) анализах. Ацилирование аминогрупп Amp и Amox проводили ди-NHS эфиром адипиновой или п-фталевой кислоты. После добавления продукта реакции к HRP или тироглобулину (TG) получали конъюгаты, в которых молекула антибиотика через шестичленный алифатический мостик или ароматическое ядро присоединена пептидной связью к первичным аминогруппам остатков аминокислот полипептидной цепи белка. Полученные производные аминопенициллинов сохранили способность взаимодействовать с сайтом PBP, распознающим интактную структуру бета-лактамового кольца. В модельной биоаналитической системе ELRA с применением конъюгатов Amp или Amox с HRP диапазон определяемых концентраций Amp составил 0,125–2,0 нг/мл. Антисыворотка с высокими аналитическими параметрами получена в результате иммунизации кроликов конъюгатом Amp-TG, в структуре которого между антибиотиком и белком присутствует ароматический линкер. Перекрестная реактивность антител, определенная в прямом ELISA, %: Amp – 100, Amox – 140, пенициллин G – 47, клоксациллин – 21, цефалексин < 0,05, гидролизованый шлочною или кислотой Amp < 0,05. Предложена конструкция тест-системы ELISA, включающая иммунохимически иммобилизованные анти-Amp поликлональные антитела и конъюгат Amox-HRP, с рабочим диапазоном определения Amp 0,06–2,0 нг/мл. Таким образом, получены и охарактеризованы специфические реагенты, составившие основу модельных систем высокочувствительных прямых ELRA и ELISA, которые могут служить прототипами наборов реагентов для биоанализа пенициллинов в пищевых продуктах.

ПРИМЕНЕНИЕ АКТИВАТОРОВ СИНТЕЗА БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА В КАЧЕСТВЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ

В.Ф. Лазарев¹, Е.А. Дутышева¹, И.А. Утепова², Б.А. Маргулис¹, И.В. Гужова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ²Институт органического синтеза УрО РАН, Екатеринбург

В защите клеток при нейродегенеративных процессах важную роль играют белки теплового шока (шапероны), которые участвуют в блокировании апоптоза, и, что важно, является ключевым элементом клеточной системы распознавания и деградации белков с нарушенной конформацией. Один из представителей молекулярных шаперонов – Hsp70 – предотвращает образование так называемых апоптосом, связывает апоптоз-индуцирующий фактор AIF и предотвращает клеточную гибель. Воспалительная реакция, как правило, сопровождающая процесс нейродегенерации, также регулируется Hsp70, который через связь с рецепторами TLR способен снижать реакцию на про-воспалительные цитокины. Уровень шаперонов в клетках

человека снижается с возрастом, в результате чего возрастает риск развития нейродегенеративных патологий. В связи с этим представляется актуальным поиск веществ, способных повышать уровень экспрессии шаперонов и, следовательно, активность и эффективность шаперонного аппарата. Ранее мы обнаружили, что производное пирролилазина способно вызывать накопление Hsp70 в клетках крысы и человека. Кроме того, мы показали, что найденное соединение может подавлять апоптоз и развитие вторичных повреждений после черепно-мозговой травмы у крыс. Эти данные позволили предположить, что среди пирролилазинов и химически близкой группы индолилазинов могут быть вещества с повышенной нейропротекторной активностью. Мы синтезировали новые соединения и апробировали их на клеточной модели болезни Альцгеймера. Соединения продемонстрировали выраженный нейропротекторный эффект. Эти вещества увеличивают выживаемость нейронов, блокируют активацию β -галактозидазы и предотвращают апоптоз в нейронах, культивируемых в присутствии β -амилоида.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-74-10087

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЕПТИДОВ КУНИТЦ-ТИПА МОРСКИХ АНЕМОН

Е.В. Лейченко, И.Н. Гладких, О.В. Синцова, А.Н. Кветкина

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

Пептиды Кунитц-типа морских анемонов – перспективная и многообещающая структурная группа морских пептидов с низкой токсичностью, огромным разнообразием и направленностью на различные мишени. Среди представителей данной группы обнаружены соединения, проявляющие сродство сразу к нескольким фармакологическим мишеням, обладающие мультитаргетностью, что является сейчас одним из трендов в разработке лекарственных препаратов. Основной мишенью пептидов Кунитц-типа морских анемонов *Heteractis crispa* и *H. magnifica* являются сериновые протеазы: все исследуемые нами пептиды ингибируют трипсин и химотрипсин (K_i 10^{-8} – 10^{-7} М), некоторые взаимодействуют с протеазами, участвующими в воспалительных процессах и протеазами каскада коагуляции. Кроме того, нами найдены пептиды, которые способны блокировать потенциал-зависимые калиевые и TRPV1 каналы. Изучен эффект блокатора TRPV1 канала, пептида HCRG21, в пяти различных болевых и воспалительных моделях. Установлено, что пептид, оказывает длительное анальгетическое действие (не менее 13 ч) в дозе 0,1 мг/кг при различных способах введения, что подтверждает возможность его использования как анальгетического средства для купирования болевых синдромов различной этиологии, а также в качестве противовоспалительного и жаропонижающего средства. Показано, что замена S5L в HCRG21 приводит к новой функции – блокированию потенциал-зависимых калиевых каналов (Kv). Обнаружено, что HCRG21 S5L в концентрации 10 мкМ блокирует токи Kv1.1, Kv1.2 и Kv1.3 на 33%, 11% и 14% соответственно. Значение IC50 для Kv1.1 было намного выше значений, полученных для его гомологов, HCRG1 (142,6±28,1 нМ) и HCRG2 (12,6±1,72), и составило 15600±0,24 нМ. Впервые показано, что пептиды Кунитц-типа морских анемонов повышают жизнеспособность клеток нейробластомы Neuro2a в присутствии β -амилоида (модель болезни Альцгеймера) и в модели 6-OHDA-индуцированной нейротоксичности (модель болезни Паркинсона), что является следствием эффективного снижения уровня АФК в клетках. Кроме того, установлено, что пептиды Кунитц-типа морских анемонов обладают собственной антирадикальной активностью, сравнимой с активностью аскорбиновой кислоты.

Работа поддержана грантами РФФИ № 19-74-20088 и РФФИ № 20-54-05006.

КОРОТКИЕ ПЕПТИДЫ СТИМУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА Sirt1 ПРИ СТАЦИОНАРНОМ СТАРЕНИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Н.С. Линькова¹, В.В. Ашапкин², Г.А. Шиловский², В.Х. Хавинсон^{1,3}, Б.Ф. Ванюшин²

¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Белок сиртуин 1 (SIRT1) способствует замедлению старения на уровне клеток, органов и тканей, повышает продолжительность жизни и регулирует функции белков PARP. Белки PARP активируют дифференцировку, повышают жизнеспособность клеток, ингибируют апоптоз. Цель работы – изучить влияние ультракоротких пептидов KED и KE на экспрессию генов SIRT1, PARP1, PARP2 при стационарном старении мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека линии FetMSC. Стационарное старение MSC изучали по методу Швайгерта с модификациями. Клетки выращивали до 7 пассажа, добавляли к ним один из исследуемых пептидов в концентрации 20 нг/мл или физиологический раствор (контроль). Далее клетки выращивали без пересева в течение 7 сут. Количественную полимеразную цепную реакцию проводили с помощью набора qPCRMix-HS SYBR+ROX kit (Евроген, Россия) и детектирующего амплификатора ДТ322 (ДНК-Технология, Россия). Статистическую обработку результатов осуществляли в программе Microsoft Office Excel 2010. Концентрацию внутреннего стандарта, мРНК GAPDH, принимали за единицу. Выявлено, что пептиды KED и KE стимулируют экспрессию гена SIRT1 в 2 и 1,8 раза по сравнению с контролем, соответственно. Пептид KE стимулирует экспрессию гена PARP1 в 1,9 раза. Пептид KED увеличивает экспрессию гена PARP2 в 2,7 раза, а пептид KE снижает её в 1,6 раза. Пептиды KED и KE модулируют экспрессию генов SIRT1, PARP1, PARP2 в MSC при стационарном старении. Ранее обнаружено, что KED обладает вазо- и нейропротекторными свойствами и снижает экспрессию геронтогенов в дентальных MSC человека, а KE является иммунопротектором, увеличивающим продолжительность жизни животных. Геропротекторные эффекты этих пептидов и SIRT1 сходны. Следует полагать, что KED и KE взаимодействуют с определенной последовательностью ДНК в промоторе гена SIRT1, активируя его экспрессию и синтез белка SIRT1. Установлено, что SIRT1 связывается с гистоном H3K9 и может регулировать транскрипцию генов, в том числе семейства PARP. Ультракороткие пептиды KED и KE через регуляцию SIRT1 могут реализовать свое геропротекторное действие.

ВОВЛЕЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА В РЕГУЛЯЦИЮ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ И В ТРАНСЛЯЦИЮ, ВЫЯВЛЕННОЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ, ОСНОВАННЫХ НА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ РНК

А.А. Малыгин, Е.С. Бабайлова, А.В. Гопаненко, А.В. Колобова, К.Н. Булыгин, А.Е. Тупикин, М.Р. Кабилов, Г.Г. Карпова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Нарушения в синтезе рибосомных белков у млекопитающих влияет на протекание клеточных процессов, вызывая аномалии в развитии организма. Отклонения такого рода показаны на мышинных моделях без белка eL29 или с гаплонедостаточностью белка eL38. У человека дефекты в генах рибосомных белков ассоциированы с онкологическими заболеваниями. Мы выполнили высокопроизводительное секвенирование тотальной РНК (RNA-seq), выделенной из клеток НЕК293 с пониженным содержанием eL29 или eL38, чтобы выявить изменения в профиле их транскриптома. Анализ данных RNA-seq показал, что снижение уровня eL29 приводит к изменениям экспрессии более 1300 генов. Этот набор включает как активируемые, так и подавляемые гены, среди которых присутствуют мишени для белков, участвующих в онкогенезе. Снижение уровня белка eL38 также вызывало изменения в экспрессии примерно 1500 генов, набор которых отличается от набора eL29-зависимых генов. Среди генов с пониженной экспрессией обнаружены гены, отвечающие за активность p53, тогда как гены, связанные с процессингом рРНК оказались активированными, а не подавленными, как при дефиците белка eL29. Кроме того, происходила активация *VMP2* и *VMP6*, ответственных за формирование костей в эмбриогенезе, что может быть связано с избыточной оссификацией, наблюдаемой у eL38-дефицитных мышей. Таким образом, недостаточность рибосомных белков eL29 или eL38 вызывает значительную реорганизацию экспрессии генов, что указывает на взаимосвязь между клеточным балансом этих белков и активностями определенных генов.

В рибосомах эукариот С-конец белка uS19 простирается к декодирующему центру, где он контактирует с кодоном мРНК в отсутствие лиганда в А-сайте. Для определения мРНК, взаимодействующих с белком uS19, мы применили метод PAR-CLIP (photoactivatable ribonucleoside-enhanced cross-linking and immunoprecipitation) к клеткам НЕК293, продуцирующим FLAG-меченый uS19 в присутствии s⁴U и обработанным циклогексимидом. Анализ данных секвенирования РНК, спитых с целевым белком, показал, что в клетках с остановленной трансляцией белок uS19 взаимодействует с регионами мРНК с высокой встречаемостью аминокислотных остатков Lys, Glu и Arg, свидетельствуя о паузировании рибосом на этих регионах мРНК при элонгации трансляции. *Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-00072.*

РОЛЬ НОВОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПЕПТИДА FAMOSS В РЕГУЛЯЦИИ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА У РАСТЕНИЙ

А.С. Мамаева¹, А.Н. Князев¹, И.А. Седлов¹, Н.О. Голуб¹, Д.Д. Харлампиева², В.Н. Лазарев^{2,3}, В.Т. Иванов¹, И.А. Фесенко¹

¹Лаборатория функциональной геномики и протеомики растений, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчиникова РАН, Москва; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва; ³Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный

Пептиды, кодируемые короткими открытыми рамками считывания (кОРС) – важная, но малоизученная часть пептидома клетки. Ранее в лаборатории была обнаружена кОРС, кодирующая консервативный 41 а.о. пептид FAMOSS (FAst growing MOSS), расположенная на транскрипте, аннотированном как длинная некодирующая РНК у модельного растения *Physcomitrium patens*. Транскрипция и трансляция данной кОРС была подтверждена экспериментально. Мы показали, что при сверхэкспрессии FAMOSS у растений наблюдается значительное ускорение роста, а при нокауте – замедление. С целью выявить белковые партнёры FAMOSS мы провели аффинную хроматографию с рекомбинантным пептидом, слитым со стрептавидином. Последующий масс-спектрометрический анализ выявил малые ГТФазы Rab-типа как наиболее вероятные кандидаты в белковые партнёры FAMOSS-пептида. Эти белки контролируют везикулярный транспорт, влияют на формирование клеточной стенки и регулируют полярный рост корневых волосков и пыльцевых трубок. Для полярно растущих объектов характерно наличие интенсивного везикулярного транспорта в апикальной части, включающего процессы эндо- и экзоцитоза, обеспечивающих рециркуляцию мембранного материала и доставку полимеров клеточной стенки. Мы обнаружили, что интенсивность везикулярного транспорта в апикальных клетках выше у растений со сверхэкспрессией FAMOSS, тогда как в клетках нокаутных растений везикулярный транспорт ингибируется. Помимо регуляции везикулярного транспорта, для одного из белков Rab-семейства (AtRabE1c) показана способность влиять на интенсивность ответа на абсцизовую кислоту (АБК). АБК – ключевой регулятор стрессовых ответов у растений. Мы выявили, что рост протонемы, сверхэкспрессирующей FAMOSS, не ингибируется АБК в отличие от дикого типа и нокаутных растений, однако растения со сверхэкспрессией FAMOSS менее устойчивы к солевому стрессу. Количественный протеомный анализ мутантных линий выявил, что в протеоме растений со сверхэкспрессией пептида повышаются белки, участвующие в процессах трансляции и фотосинтеза, однако снижаются белки, вовлечённые в стрессовые ответы. Таким образом, мы предполагаем, что FAMOSS регулирует рост протонемы, везикулярный транспорт и ответ на стрессы посредством взаимодействия с малыми ГТФазами Rab-типа.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-14-01189.

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПОРИНЫ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* ВЫЗЫВАЮТ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА У МЫШЕЙ

О.Ю. Портнягина¹, Д.Н. Ивашкевич², И.В. Дюйзен², О.Д. Новикова¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова; ²Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН им. А.В. Жирмунского, Владивосток

Yersinia pseudotuberculosis, возбудитель острой кишечной инфекции, при неблагоприятных условиях может стать причиной нейровоспаления и поражения нервной системы. Известно, что липополисахарид (ЛПС), или эндотоксин грамотрицательных бактерий, индуцирует не только развитие интоксикации организма-хозяина, но и является возможным фактором риска развития нейродегенеративных заболеваний. Возможно, порообразующие белки как иммунодоминантные и высокоиммуногенные компоненты наружной мембраны (НМ) бактерий, наряду с ЛПС, также могут стимулировать развитие нейродегенеративных изменений в тканях головного мозга. Для выяснения этого предположения в ходе настоящей работы мыши линии Balb/c были однократно иммунизированы OmpF и OmpC поринами НМ *Y. pseudotuberculosis*. Через 90, 180 и 280 дней у животных извлекали мозг и проводили гистологический анализ коры в области поясной извилины (молекулярной пластинки – 1 слой и наружной зернистой пластинки – 2 слой). Глубина морфологических изменений в 1-ом и 2-ом слоях коры была различна и зависела от типа порина, однако в обоих случаях плотность распределения нейронов к концу наблюдения падала более чем в 4 раза. Через 90 дней появились признаки дистрофического изменения нейронов (отек, частичная вакуолизация цитоплазмы, растворение и распыление тигроида). Позднее, через 180-280 дней были зарегистрированы необратимые изменения нервных клеток (сморщивание, уплотнение цитоплазмы, развитие гиперхроматоза). В 1-ом слое через 90 дней наблюдалось не более 25% нейронов с признаками морфологического благополучия. Во 2-ом слое, несмотря на сокращение удельной плотности нейронов, даже через 280 дней 50% из них не имели явных признаков дистрофического повреждения. Таким образом, общеморфологические изменения клеток коры головного мозга экспериментальных животных характеризовались значительным сокращением плотности распределения нейронов на фоне динамического нарастания числа глиальных клеток. При введении OmpF описанные изменения в поверхностных (рецептивных) слоях коры имели большую выраженность и наблюдались в более ранние сроки, по сравнению с OmpC. Полученные результаты свидетельствуют о том, что порины НМ *Y. pseudotuberculosis* вызывают нарастающее развитие дистрофических и некробиотических изменений нейронов головного мозга мышей.

ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫЙ БЕЛОК STDH КАК МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОСЧИК КАРОТИНОИДОВ

Ю.Б. Слонимский¹, Е.Г. Максимов^{1,2}, А.В. Замараев^{3,4}, Е.Ю. Паршина², Т.А. Сланикова⁵, А.А. Абдрахманов³, П.А. Бабаев², С.С. Ефимова⁶, О.С. Остроумова⁶, А.В. Степанов⁷, Е.А. Слуцкая⁷, А.В. Рябова⁸, Т. Фридрих⁹, Н.Н. Случанко^{1,2}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биофизики, Москва; ³МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва; ⁴Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва; ⁵Институт биологии гена РАН, Москва; ⁶Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ⁷Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва; ⁸Институт общей физики им А.М. Прохорова, Москва; ⁹Технический университет Берлина, Институт химии, кафедра биоэнергетики, Берлин, Германия

Цианобактерии адаптированы к широкому спектру условий среды и обнаруживаются как в жарких, сухих пустынях, так и в ледниках за полярным кругом. Их гибко настраиваемый фотосинтетический аппарат дополнен уникальной каротиноид-зависимой системой защиты от окислительного стресса. В процессы доставки каротиноидов к белковым комплексам цианобактерий вовлечены особые водорастворимые белки. Ключевым в транспорте каротиноидов, по-видимому, является белок STDH (от англ. C-terminal domain homologue of the Orange Carotenoid Protein). Белок STDH способен связывать каротиноиды из мембран и переносить их к другим каротиноид-связывающим белкам, участвующим в защите клеток от активных форм кислорода (АФК). Механизм функционирования белка STDH и репертуар его лигандов представляют большой фундаментальный и практический интерес. Нам удалось показать, что рекомбинантный белок STDH из *Anabaena variabilis* способен связывать такие типичные для цианобактерий каротиноиды как эхинонен и кантаксантин и передавать их белкам-партнерам. Мы продемонстрировали взаимодействие белка STDH с искусственными липосомными мембранами и смогли оценить термодинамические параметры переноса каротиноидов с участием мембран. Полученные данные свидетельствовали о возможности использования белка STDH как инструмента для доставки каротиноидов к клеткам, что было показано нами на культурах клеток млекопитающих. Доставка эхинонена в клетки линий HeLa и Tet21N, подтвержденная с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния, приводила к снижению уровня АФК, индуцированных добавлением антимицина А. Для изучения репертуара связывания каротиноидов белком STDH нами был разработан протокол *in vitro* доставки каротиноидов к белку. Помимо эхинонена и кантаксантина было показано эффективное связывание с STDH каротиноида с массой 416 г/моль, который пока не удалось идентифицировать, а также каротиноида астаксантина, имеющего высокое практическое значение. Природа связанного каротиноида сильно влияла на спектральные характеристики препарата STDH. Таким образом, STDH представляет собой эффективным способом доставки каротиноидов в мембраны и белковые комплексы, что открывает большие перспективы для выполнения как фундаментальных, так и прикладных задач.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ–DFG 20-54-12018.

МЕХАНИЗМЫ ГИДРОЛИЗА АНТИБИОТИКОВ МЕТАЛЛО- β -ЛАКТАМАЗАМИ И ИХ ИНГИБИРОВАНИЕ

М.Г. Хренова^{1,2}, А.В. Кривицкая², В.Г. Григоренко¹, А.М. Егоров¹

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Металло- β -лактамазы (MBL) содержат в активном центре один или два катиона цинка и гидролизуют антибиотики, содержащие β -лактамный фрагмент, что приводит к инактивации последних. Каталитической частью являются активные центры этих ферментов является гидроксид анион, координированный двумя катионами цинка. Реакция гидролиза начинается с нуклеофильной атаки карбонильного углерода субстрата атомом кислорода ОН- и приводит к образованию тетраэдрического интермедиата. Далее происходит разрыв ковалентной С–N связи и перераспределение протонов в активном центре. Согласно экспериментальным исследованиям, протонирование продукта гидролиза происходит по атому азота в случае цефалоспориновых соединений и по атому углерода, если речь идет о карбапенемах. Однако в случае карбапенемов по спектральным данным возможно образование неустойчивого интермедиата, структуру которого не удастся идентифицировать экспериментальными методами. Также необъясненным остается тот факт, что в случае разных MBL энантимеры С-продуктов образуются в разных соотношениях. В рамках данной работы проведено молекулярное моделирование методами квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ), а также молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами для определения всех элементарных стадий процессов. Оказалось, что в случае карбапенемов доминирующим является канал образования продуктов, протонированных по атому азота, а таутомеризация в С-продукт происходит уже в растворе. Изменяющийся энантимерный состав в случае различных MBL связан с соотношением констант скоростей образования N- и С-продуктов. Также методами молекулярного моделирования получены структуры комплексов фермент-ингибитор металло- β -лактамаз NDM-1 и VIM-2 с новым перспективным хелатом унитиолом. Это соединение уже применяется в медицинской практике для связывания катионов тяжелых металлов в организме, и в недавних экспериментальных работах показало высокую ингибирующую способность к MBL.

ВЛИЯНИЕ ЭНДОСОМОЛИТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ХОЛЕСТЕРИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СЕГМЕНТИРОВАННЫХ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

И.В. Черников, У.А. Карелина, М.И. Мещанинова, А.Г.Веньямина, М.А. Зенкова, В.В. Власов, Е.Л. Черноловская

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Создание препаратов на основе малых интерферирующих РНК (siРНК) является перспективным подходом для лечения заболеваний, связанных с нарушением экспрессии генов. Введение остатков молекул природного происхождения в состав siРНК путём прямого конъюгирования с siРНК на сегодняшний день является наиболее перспективной технологией доставки siРНК. Несмотря на высокую эффективность проникновения siРНК таким методом внутрь клеток siРНК остаётся в эндосомном компартменте, а не в цитоплазме клеток, где способна оказывать биологическое действие. Для решения проблемы выхода siРНК из эндосом в данной работе было предложено конъюгировать холестеринное производное анти-MDR1 siРНК с эндосомолитическими пептидами. Поскольку присоединение молекул к антисмысловой цепи в значительной степени может снижать интерферирующую активность siРНК оба лиганда были присоединены к смысловой цепи siРНК. Для упрощения синтеза и выделения смысловой цепи она была разделена на две части – 5' концевая часть конъюгирована с холестерином, а 3' – с пептидами. Для увеличения термостабильности и нуклеазоустойчивости такой siРНК в её состав были введены 2'F, 2'О-Ме и LNA модификации. Было показано, что при доставке Липофектаминем в клетки KB-3-1-MDR1-GFP такая холестеринная sisiРНК обладала большей биологической активностью, чем каноническая siРНК (IC₅₀ составили 0.65 и 0.25 нМ для Ch-siRNA и Ch-sisiRNA, соответственно), однако при присоединении пептидов IC₅₀ конъюгатов увеличилось в 4 раза. При доставке конъюгатов без носителя холестеринная sisiРНК снизила экспрессию гена-мишени на 17%, а пептидные конъюгаты холестеринной sisiРНК не обладали биологической активностью. Обнаружилось, что в присутствии агента, ингибирующего созревание эндосом (Хлорокин) пептидные конъюгаты холестеринной sisiРНК снижали экспрессию гена-мишени на 50–25%, в то время как Ch-sisiRNA – на 20%. Таким образом, выбранные эндосомолитические пептиды увеличивают эффективность выхода Ch-sisiRNA из эндосом при совместном использовании с фармакологически разрешенным препаратом.

ПРОТЕАСОМЫ И ТОЛЕРАНТНОСТЬ К «ЧУЖОМУ»

Н.П. Шарова¹, Е.И. Легач², Г.А. Божок², Т.М. Астахова¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва; ²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

Протеасомы, мультисубъединичные протеолитические структуры, осуществляют один из важнейших метаболических путей и служат регуляторами клеточных процессов, образуя биологически активные белки и пептиды. Многочисленные функции протеасом млекопитающих обусловлены множественностью их форм, различающихся строением и спецификой гидролиза белков. Конститутивные протеасомы (или протеасомы «домашнего хозяйства»), содержащие протеолитические субъединицы beta1, beta2 и beta5, участвуют, как правило, в рутинном белковом обмене, в то время как иммунные субтипы протеасом с протеолитическими субъединицами beta1i (LMP2), beta2i (LMP10) и/или beta5i (LMP7) обеспечивают, в основном, регуляторные процессы. Наиболее изученная функция иммунных протеасом – образование ими антигенных эпитопов для молекул главного комплекса гистосовместимости класса I и, как следствие, участие в иммунных реакциях. Мы обнаружили связь протеасом, содержащих субъединицу LMP2, с противоположным процессом – развитием толерантности к «чужому». Так, приживление аллотрансплантата ткани яичника у крыс сопровождалось увеличением экспрессии субъединицы LMP2 в клетках синусоидов печени и в клетках самого трансплантата. Отторжение трансплантата, напротив, было связано с увеличением содержания субъединицы LMP7 в клетках макрофагально-лимфоцитарного инфильтрата в ткани, замещающей отторгнутый трансплантат, иными словами, с развитием иммунной реакции, как и ожидалось. Феномен гораздо более значительного увеличения экспрессии субъединицы LMP2 по сравнению с субъединицей LMP7 присущ также солидным раковым опухолям: модельным опухолям мышей (химически индуцированной гепатоклеточной карциноме, спонтанно возникающему

раку молочной железы) и опухолям человека (папиллярной и фолликулярной карциномам щитовидной железы, аденокарциноме прямой кишки, раку молочной железы в отсутствие эстрогеновых рецепторов). Мы предположили, что протеасомы с субъединицей LMP2 в чужеродных клетках (клетках аллотрансплантата или опухоли) образуют пептиды или небольшие белки, которые выносятся на поверхность клетки или в межклеточное пространство без участия молекул главного комплекса гистосовместимости класса I и действуют на цитотоксические Т-лимфоциты, подавляя их активность.

Работа поддержана Минобрнауки России (проект № 075-15-2020-773).

НИКОТИНОВЫЙ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР $\alpha 7$ -ТИПА И НЕЙРОМОДУЛЯТОР Lynx1 – РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГЛИОБЛАСТОМ

М.Л. Бычков¹, О.В. Шлепова¹, М.А. Шулепко¹, Д.С. Кульбацкий¹, И.А. Чулина¹, С.Г. Кошелев¹, В.А. Бабенко², Е.Ю. Плотников², М.С. Павлюков¹, А.В. Попов¹, К.С. Яшин³, И.А. Медяник³, А.В. Семьянов¹, М.П. Кирпичников^{1,4}, Е.Н. Люкманова^{1,4}, З.О. Шенкарев¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород; ⁴Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор $\alpha 7$ -типа ($\alpha 7$ -nAChR) – лиганд-зависимый ионный канал, участвующий в регуляции синаптической и нейрональной пластичности, активность которого в нейронах регулируется GPI-заякоренным модулятором Lynx1. Кроме того, этот рецептор экспрессируется в эпителиальных тканях, где он рассматривается как проонкогенный, регулируя рост и апоптоз клеток карцином и воспалительные процессы. $\alpha 7$ -nAChR также экспрессируется в глиальных клетках, злокачественная трансформация которых приводит к развитию инвазивных опухолей головного мозга, – глиобластом (ГБ). ГБ характеризуются активацией митогенных и антиапоптотических сигнальных путей, а также дерегуляцией воспалительных процессов. Для установления роли $\alpha 7$ -nAChR в патогенезе ГБ мы исследовали экспрессию этого рецептора и белка Lynx1 в нормальных астроцитах, в глиомной линии U251, и в тканях, полученных от пациентов с ГБ. Показано, что Lynx1 не экспрессируется в нормальных зрелых астроцитах, в то время как в молодых астроцитах и клетках глиом он накапливается в эндоплазматическом ретикулуме и комплексе Гольджи и не транспортируется к внешней мембране клетки из-за отсутствия GPI-якоря. В то же время, в образцах тканей мозга пациентов из зоны доступа к опухоли белок Lynx1 содержит GPI-якорь. В глиомных клетках $\alpha 7$ -nAChR преимущественно экспрессируется на клеточной поверхности, что может указывать на нарушенную регуляцию рецептора из-за отсутствия мембранного транспорта Lynx1. Показано, что рекомбинантный водорастворимый препарат ws-Lynx1, добавленный к культуре клеток, связывается с $\alpha 7$ -nAChR на поверхности глиомных клеток и ингибирует их рост, вызывая остановку клеточного цикла в G1 фазе и апоптоз. Кроме того, ws-Lynx1 вызывает снижение секреции факторов воспаления IL-10 и TNF- α . Синтетический пептид, имитирующий структуру центральной петли белка Lynx1, для которого ранее была показана способность проникать через ГЭБ при интраназальном введении, также демонстрирует значительную антипролиферативную активность на глиомных клетках. Наши данные указывают на $\alpha 7$ -nAChR как на новую перспективную мишень для лечения ГБ. Водорастворимые аналоги белка Lynx1 и синтетические пептиды на его основе могут служить прообразами новых противоопухолевых препаратов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 18-29-01050.

SLURP-1 КОНТРОЛИРУЕТ РОСТ И МИГРАЦИЮ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО A549, ВЗАИМОДЕЙСТВУЯ С $\alpha 7$ -NACHR, PDGFR И EGFR

М.А. Шулепко¹, М.Л. Бычков¹, О.В. Шлепова¹, И.А. Чулина¹, Д.С. Кульбацкий¹, С.Г. Кошелев¹, А.С. Парамонов¹, М.П. Кирпичников^{1,2}, З.О. Шенкарев¹, Е.Н. Люкманова^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Трехпетельный секретлируемый белок человека SLURP-1 является отрицательным аллостерическим модулятором никотинового ацетилхолинового рецептора $\alpha 7$ -типа ($\alpha 7$ -nAChR), ответственного за никотин-индуцированную пролиферацию и миграцию клеток рака легкого. Ранее мы показали, что инкубация с рекомбинантным аналогом белка человека SLURP-1 (rSLURP-1) приводит к значительному снижению роста клеток аденокарциномы легкого A549 и отменяет никотин-индуцированное усиление пролиферации. Влияние rSLURP-1 на рецептор IP3 и фосфатазу PTEN указывает на вовлечение сигнального пути АКТ. Используя мультиплексный иммунологический анализ, мы подтвердили вовлечение сигнального пути АКТ в действие rSLURP-1 в клетках A549. Было выявлено снижение фосфорилирования PTEN и киназы mTOR, а также снижение фосфорилирования рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR). За счет влияния на эти сигнальные механизмы, rSLURP-1 вызывает арест клеточного цикла A549 в S и G2/M фазах. Методом аффинной экстракции было показано, что в клетках A549 rSLURP-1 способен взаимодействовать не только с $\alpha 7$ -nAChR, но и с рецепторами EGFR и PDGFR. Возможно, гетеродимер EGFR/PDGFR является дополнительной мишенью действия SLURP-1, предсказанной ранее, а наблюдаемое снижение фосфорилирования PDGFR напрямую связано с взаимодействием с rSLURP-1. С использованием «wound healing assay» показано снижение миграции клеток A549 под действием rSLURP-1, но не миграции первичных эмбриональных фибробластов легкого мыши, что говорит о возможности разработки направленной антираковой терапии на основе rSLURP-1. Для определения участков rSLURP-1, важных для подавления пролиферации раковых клеток, мы исследовали активность химерных белков, содержащих фрагменты петлевых участков SLURP-1. Было показано, что rSLURP-1 взаимодействует с $\alpha 7$ -nAChR посредством петли I. Анализ активности rSLURP-1 и синтетического пептида, имитирующего петлю I, показал, что пептид-миметик ингибирует пролиферацию клеток A549 с активностью, сопоставимой с таковой у rSLURP-1. Таким образом, показан ингибирующий эффект rSLURP-1 на пролиферацию и миграцию клеток аденокарциномы легкого A549, изучены сигнальные каскады, опосредующие активность rSLURP-1, определены мишени действия и активный сайт модулятора. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (№17-74-20161).*

СИНТЕЗ S-ГИДРОКСИЭТИЛТИОЭТИЛ-Cys-Pro-Phe-ТРИПЕПТИДНОГО БИОМАРКЕРА СЕРНИСТОГО ИПРИТА ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ТЕСТОВ ОЗХО

В.В. Абзианидзе, Ю.В. Челуснова, Д.В. Криворотов

НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Санкт-Петербург

Целью данной работы явился синтез НЕТЕ-СРР для использования в качестве стандартного образца при разработке методики его количественного определения в плазме крови в ходе выполнения задач биомедицинских тестов ОЗХО. Идентификация и определение токсичных химикатов и продуктов их превращений является неотъемлемой составляющей комплекса мероприятий по обеспечению обязательств, принятых Россией по Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и об его уничтожении. Для поддержания готовности назначенных химико-аналитических лабораторий к расследованию инцидентов, под эгидой организации по запрещению химического оружия (ОЗХО) с 2009 регулярно проводятся тренировочные (Biomedical Exercises, ВМЕ) и квалификационные тесты (Biomedical Proficiency Tests, BioPT) по анализу биомедицинских проб. Организаторы тестов готовят и рассылают биологические образцы (кровь и/или мочу) с внесенными биомаркерами отравляющих веществ, среди которых уже трижды встречался сернистый иприт (СИ) – вещество кожно-нарывного действия, включенное в Список 1А Конвенции. Наиболее ретроспективными биомаркерами СИ являются ковалентные аддукты с азотистыми основаниями ДНК и с альбумином, основным белком крови. Взаимодействие СИ с альбумином приводит к образованию аддукта по остатку Cys34, который в ходе подготовки образцов к анализу методом ВЭЖХ-МС, после гидролиза протеиназой К образует модифицированный трипептид S-гидроксиэтилтиоэтил-Cys-Pro-Phe (НЕТЕ-СРР). Нами впервые синтезирован НЕТЕ-СРР. Синтезированный НЕТЕ-СРР может быть использован при разработке хроматомасс-спектрометрических методик количественного анализа аддуктов сернистого иприта в плазме крови.

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ В-ЛИМФОЦИТОВ К РАЗЛИЧНЫМ ФРАГМЕНТАМ ДЕСМОГЛЕИНА У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННОЙ ПУЗЫРЧАТКОЙ

**В.А. Абрикосова¹, Л.А. Овчинникова¹, Е.Н. Ларина¹, М.Н. Баранова¹, Я.А. Ломакин¹, Ю.А. Мокрушина^{1,2},
Д.С. Балабашин¹, Т.В. Бобик¹, Е.Н. Калиберда¹, С.С. Терехов^{1,2}, В.Д. Кнорре¹, М.В. Шпилевая³, Т.К. Алиев¹,
Д.Г. Дерябин³, А.Э. Карамова³, А.А. Кубанов³, И.В. Смирнов^{1,2}, М.П. Кирпичников², А.Г. Габитов^{1,2}**

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова;

³ГНЦ дерматовенерологии и косметологии МЗ РФ, Москва

Пузырчатка – тяжёлое аутоиммунное заболевание, охватывающее почти все возрастные группы и характеризующееся летальностью до 50%. Оно проявляется формированием внутриэпидермальных пузырей в результате акантолиза – разрушения межклеточных мостиков. Патогенетической основой пузырчатки является образование аутоантител класса IgG, направленных против десмоглеина 3-го типа – основного структурного белка десмосом. Для ослабления симптомов заболевания в настоящее время применяется главным образом системная глюкокортикостероидная терапия (ГКС), имеющая ряд серьёзных побочных эффектов. В целях снижения доз ГКС разрабатываются методы лечения пузырчатки моноклональными антителами. На сегодняшний день единственным рекомендованным к использованию в клинической практике подобным препаратом является ритуксимаб, содержащий моноклональные антитела к CD20 антигену В-лимфоцитов. Однако его применение приводит к подавлению не только патологических, но и нормальных В-лимфоцитов, и, таким образом, развитию системного иммунодефицита. Решением данной проблемы может стать подбор иммунолигандов, специфичных к популяции аутореактивных В-клеток. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что у пациентов с диагностированной пузырчаткой уровни антител к различным фрагментам десмоглеина неодинаковы. В данной работе были установлены различия в профилях антительного ответа по отношению к доменам десмоглеина и к полноразмерному белку, а также показана положительная корреляция между уровнем антител и количеством аутореактивных В-клеток к фрагментам десмоглеина. Было определено, что доля аутореактивных В-клеток у пациентов с диагностированной пузырчаткой составляет 0.09–0.16%. Кроме того, полученные результаты показали, что подход двойного позитивного окрашивания клеток может быть успешно использован для дифференцирования антигенспецифичности В-клеток при аутоиммунных заболеваниях. Профилирование В-лимфоцитов пациентов с пузырчаткой расширяет возможности для разработки персонализированной терапии иммунолигандами на основе рекомбинантных доменов десмоглеина, слитых с константным доменом иммуноглобулина человека.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА С КЛЕТОЧНЫМИ мРНК, ВЫЯВЛЕННЫЕ МЕТОДОМ PAR-CLIP

**Е.С. Бабайлова, А.В. Гопаненко, А.В. Колобова, К.Н. Булыгин, А.Е. Тупикин, М.Р. Кабилов, А.А. Малыгин,
Г.Г. Карпова**

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Для идентификации контактов рибосомных белков eL29, uS3, uS19 и eS26 с нерибосомными РНК, использован метод PAR-CLIP (от англ. photoactivatable ribonucleoside-enhanced cross-linking and immunoprecipitation), основанный на сшивании РНК и белков в клетках, выращенных на среде, содержащей фотоактивируемый аналог нуклеозидов, и последующей иммунопреципитации продуктов сшивки. Высокопроизводительное секвенирование ДНК-библиотек на основе фрагментов РНК, ковалентно связанных с белком, позволило идентифицировать сшитые РНК и установить участки сшивки в них по положению характеристических T/C-транзиций в сиквенсных рядах. С помощью метода PAR-CLIP, примененного к клеткам

НЕК293Т, продуцирующим целевые FLAG-меченые белки в присутствии 4-тиоуридина, мы выявили контакты рибосомо-связанных uS3 и uS19 с мРНК в процессе элонгации трансляции и внерибосомную функцию eL29, ассоциированную с его участием в регуляции своего собственного синтеза. Используя нетрансфицированные клетки НЕК293Т, с помощью этого же метода мы выяснили, контактирует ли рибосомо-связанный eS26 с мРНК при инициации трансляции. Показано, что белок uS19, контактирующий с мРНК в А-участке при отсутствии в нем лиганда, взаимодействует с регионами мРНК с высокой частотой встречаемости кодонов Lys/Glu и Arg, когда трансляция остановлена циклогексимином, свидетельствуя о паузировании рибосом на этих регионах при элонгации из-за замедления в прохождении соответствующих растущих пептидов по рибосомному туннелю. У белка uS3, расположенного вблизи участка входа в рибосомный канал и контактирующего с мРНК в канале, обнаружены дополнительные контакты с мРНК вне канала, в которые вовлекаются её нуклеотидные остатки положениях +22 – +30, что согласуется с предположительным участием этого белка в контроле качества мРНК. Установлено, что eS26 участвует в инициации трансляции через взаимодействие с фактором eIF3, опосредуемое мРНК. Белок eL29 связывается с участком родственной мРНК, расположенным в 3'-концевом регионе её кодирующей части, структура которого похожа на структуру участка связывания eL29 на 28S рРНК. Это взаимодействие, по-видимому, играет роль в авторегуляции экспрессии гена белка eL29 на стадии трансляции по принципу отрицательной обратной связи.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00400.

ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ *IN VITRO* В ПРИСУТСТВИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ

Ю.В. Болдырева

Тюменский государственный медицинский университет, Тюмень

Пептиды обладают органоспецифичностью и применяются в качестве препаратов, нормализующих функции различных органов и систем организма с целью увеличения продолжительности жизни. Интерес к их изучению резко возрос. Однако данные о механизме их действия противоречивы.

Изучены пептиды, синтезированные в Санкт-Петербургском Институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН. Большинство из них были трипептидами, исключение: вилон (дипептид) и эпیتالон (тетрапептид). В качестве модельных пептидов были использованы карнозин и глутатион, в качестве антиоксидантов (АО) – α -токоферол (ТФ) и β -каротин; в роли синергиста окисления – аскорбиновая кислота, в качестве энзимов АО действия – каталаза и пероксидаза хрена (ПХ).

Изучали кинетику окисления системы, включающей липиды (метилолеат), додецилсульфат натрия. Процесс инициировали: термическим разложением азобисизобутиронитрила (АИБН) и в присутствии Fe^{+2} , растворитель хлорбензол, соотношение водной и липидной фаз 1:1. Эксперименты проводились при $t=60^{\circ}C$ и $40^{\circ}C$. Было получено, что:

1. все изучаемые олигопептиды эффективно тормозят Fe^{+2} -индуцированный процесс;
2. все пептиды, за исключением глутатиона и карнозина ускоряют окисление липидов, инициированное АИБН. Это подтверждает ускоренное расщепление β -К (в 7 раз).
3. пептиды не образуют нитроксильных радикалов, не проявляют антирадикальной активности, не взаимодействуют с пероксильными радикалами.
4. олигопептиды проявляют эффект антагонизма при совместном действии с АО. Аскорбиновая кислота повышает стабильность системы, но не более чем на 20%.
5. АО ферменты увеличивают эффективность ингибирования.
6. совместное действие композиции α -ТФ и АО ферментов полностью подавляет иницирующее влияние олигопептидов.

ИНГИБИРОВАНИЕ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ ГИСТОНОПОДОБНЫХ БЕЛКОВ БАКТЕРИЙ БИСФЕНОЛЬНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ФЛУОРЕНА. ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Е.Д. Бочаров¹, В.И. Тимофеев^{1,2,3}, А.С. Комолов², Д.А. Алтухов², Ю.К. Агапова², Е.В. Смирнова¹, Т.В. Ракина¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²НИЦ «Курчатовский институт»

³Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва

Гистоноподобные HU-белки бактерий относятся к классу нуклеоид-ассоциированных белков. Они поддерживают структурную укладку бактериального генома и регулируют основные ДНК-зависимые процессы. Эти белки необходимы для жизнедеятельности микроорганизмов класса Mollicutes, а также ряда безвредных бактерий, включая *Mycobacterium tuberculosis*, и являются перспективными мишенями для разработки антибактериальных препаратов. В большинстве бактерий HU-белки представляют собой димеры размером 20 кДа, состоящие из α -спирального димеризационного домена и ДНК-связывающего домена, в котором выделяют стабильный β -листовой участок и подвижные β -ленточные руки. Первые ингибиторы ДНК-связывающей способности HU-белка *M. tuberculosis*, обладающие антибактериальной активностью, взаимодействовали со стабильной частью ДНК-связывающего домена. Поиск ингибиторов микоплазменных HU-белков выявил новые ингибиторы, относящиеся к бисфенольным производным флуорена (БПФ). Первоначально предполагалось, что БПФ, как и ранее предложенные ингибиторы, взаимодействуют с ДНК связывающим доменом и конкурируют с молекулами ДНК. Однако, ЯМР спектроскопия и направленный мутагенез указывали на взаимодействие ингибитора с HU-белком *Spiroplasma melliferum* (HUSpm) за пределами ДНК-связывающего домена. Был проведён дополнительный докинг по всей поверхности димера и мономера HUSpm. Внутренняя часть димерного интерфейса рассматривалась как потенциальный сайт связывания в связи с данными ЯМР-спектроскопии о наличии в растворе HUSpm минорной конформации белка, которая могла представлять собой мономер HU. Были найдены дополнительные сайты связывания, находящиеся на границе раздела мономера в гидрофобном ядре и на поверхности белка. Данная работа посвящена молекулярно-динамическому (МД) анализу конформационной динамики HUSpm в свободной и ДНК-связанной форме, а также в комплексах с ингибиторами, взаимодействующими с разными областями белка. МД эксперименты показали, что связывание ингибитора в разных сайтах вызывает про-

типоволожные эффекты: от стабилизации подвижных частей ДНК-связывающего домена, что характерно для комплекса с ДНК, до увеличения подвижности стабильных β -листных областей ДНК-связывающего домена.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-01001).

КЛЕТОЧНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

В.Н. Мещанинов, И.В. Гаврилов, В.С. Мякотных, Д.Л. Щербаков

Институт медицинских клеточных технологий, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург

В реабилитологии используются олигопептиды в качестве корректоров метаболизма клеток организма человека, что приводит к улучшению качества жизни и торможению старения (Хавинсон В.Х. и др., 2017). Объективными методами количественно эти явления в одном исследовании не измерялись, исследования биовозраста, качества жизни, метаболизма и поведение клеточных популяций, как правило, производились отдельно, вне связи друг с другом, что не позволяет проследить клеточно-метаболические процессы в организме как в геронтогенезе, так и при его коррекции. Это не позволяет измерять эффект от лечения и согласовывать процесс реабилитации с другими лечебными мероприятиями. Цель: выявить клеточно-метаболические эффекты действия геропротекторов олигопептидного типа у человека посредством сопоставления результатов исследований *in vitro* и *in vivo*. Исследования проведены с привлечением 59 лиц в возрасте 41 – 75 лет с полиморбидной патологией, принимавших олигопептиды «Везуген» и «Пинеалон» (РФ, С.-Пб, ХБО Вита, ООО). Обследуемые были разделены на *nhb* группы: 17 человек принимали «Везуген» (Lys-glu-asp), 19 человек – «Пинеалон» (Arg-glu-asp), 23 человека – оба олигопептида в чередующимся режиме в средних рекомендуемых дозировках (энтерально по 0,4 г/сут. – 40 мкг чистого вещества/сут.). Проанализированы образцы крови от 47 пациентов в возрасте 30–59 лет для оценки гематолого-биохимических показателей после добавления олигопептидов. Исследовали функционально-психологические показатели биологического возраста [Гаврилов с соавт. 2012], стандартные биохимические и гематологические показатели. Данные обрабатывались с использованием параметрических критериев в программе MS Excel.

Хранение крови доноров, моделирующее *in vitro* процесс их старения *in vivo*, сопровождалось изменением концентрации клеточных элементов, выразившимся в снижении количества эритроцитов и тромбоцитов (вследствие разрушения) и приводящих к снижению функциональных свойств. Добавленные в нее пептиды увеличивали перекисную и осмотическую резистентность эритроцитов, препятствовали уменьшению количества лимфоцитов и лейкоцитов, что связано, возможно, с влиянием на пролиферацию и созревание их прогениторных клеточ-предшественников, влияли на созревание CD34⁺/CD45⁺ клеток, тормозили в них гликолиз. Воздействие на организм олигопептидов приводило к снижению биовозраста до 20% ($p < 0,01$), что сопровождалось нормализацией показателей метаболизма, фазовой динамикой изменения содержания в крови пациентов CD34⁺/CD45⁺ стволовых клеток с амплитудой колебания показателя до 21%. Наибольшую геропротекторную эффективность выявило комплексное использование одновременно двух олигопептидов.

Выявлены как общие, так и индивидуализированные клеточно-метаболические эффекты влияния олигопептидов на старение периферической крови и организма человека в целом.

ПРОТЕОМИКА КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ *Mycoplasma hominis*

М.А. Галямина¹, В.Г. Ладыгина¹, С.И. Ковальчук², А.И. Зубов¹, О.В. Побегуц¹, Г.Ю. Фисунов¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

Mycoplasma hominis относится к классу Mollicutes, является условным патогеном человека и вызывает острые и хронические инфекции урогенитального тракта. Несмотря на редуцированный размер генома и, соответственно, снижение синтетических способностей, она может эффективно приспосабливаться к изменениям внешней среды. Известно, что у *M. hominis* есть два основных пути производства энергии: дезаминирование аргинина и пентозофосфатный путь (PPP). Она не может использовать глюкозу, т.к. у нее отсутствует глюкокиназа, которая превращает β -D-глюкозу в β -D-глюкоза-6-фосфат в начале гликолитического пути и 6-фруктокиназа-1, которая фосфорилирует β -D-фруктозу-6-фосфат. Транспорт простых сахаров у нее также малоэффективен, она имеет неполный набор белков фосфоэнлирует зависимой фосфотрансферной системы (PTS). Набор ферментов PPP у *M. hominis* является неполным и содержит только изомеразы и транскетолазы. Изучив протеомные профили клеток *M. hominis*, выращенных на разных источниках энергии (аргинине или тимидине) методом ВЭЖХ-МС, мы реконструировали карту энергетического метаболизма микоплазмы. Мы показали, что ферменты гликолиза и PPP вместе с фосфокетолазой, нуклеозидфосфорилазами и дезоксирибозофосфатальдозой позволяют использовать в качестве источника углерода рибозофосфаты и дезоксирибозофосфаты, образующиеся в результате катаболизма нуклеозидов. Подсчет энергетической эффективности показал, что использование рибонуклеозидов является наиболее эффективным процессом с точки зрения получения энергии, так как на одну молекулу рибонуклеозидов производится две молекулы АТФ, а при использовании аргинина – одна молекула АТФ. Использование дезоксирибонуклеозидов является еще менее эффективным, на одну молекулу дезоксирибонуклеозидов производится меньше, чем одна молекула АТФ. Использование альтернативных источников углерода позволяет клеткам *M. hominis* занимать разные ниши в организме хозяина и, манипулируя скоростью роста, быть устойчивыми в условиях стресса. *Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-10124.*

ЦЕПЬ-ВЫТЕСНЯЮЩИЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ: НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИ РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Р.Р. Гарафутдинов, А.Р. Сахабудинова

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, Уфа

В последние годы все большее распространение приобретают методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот (НК), для чего используются ДНК полимеразы с цепь-вытесняющей активностью, такие как Bst exo-, Vent exo-, phi29, Bsu exo- и др. Нами обнаружено, что многие из них способны вести неспецифический синтез ДНК, протекающий в отсутствие целевой мишени. Так, была детально изучена открытая ранее способность ДНК-полимеразы Bst exo- давать мультимерные продукты на линейных ДНК-матрицах, по структуре схожих с продуктами амплификации "катящимся кольцом". Были найдены условия, способствующие мультимеризации, и предложены способы ее устранения. Эксперименты с прочими ДНК-полимеразами, обладающими цепь-вытесняющей активностью (phi29, Bsu exo-, Vent exo-, KlenTaq и 9^oNm), показали, что способность к мультимеризации и к синтезу ДНК ab initio присуща в той или иной степени всем термостабильным полимеразам. Очевидно, что при планировании амплификационных экспериментов, проводимых в изотермических условиях, тем более при решении диагностических задач, необходимо учитывать выявленные особенности ДНК-полимераз, поскольку высока вероятность получения ложных результатов. С другой стороны, нами замечено, что четкий подбор молекулярной системы и использование условий, способствующих мультимеризации, позволяет получить надежный (достоверный) результат и при ампликации целевых мишеней. Нами на основе реакции мультимеризации НК в присутствии ДНК-полимеразы Bst exo- разработано несколько методических приемов для обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей, представленных разными типами НК: малыми РНК, одноцепочечными НК, фрагментированной ДНК. Сконструированы праймерные системы, подобраны составы реакционных смесей и протоколы пробоподготовки и амплификации, обеспечивающие высокую специфичность и чувствительность анализа указанных типов мишеней.

ПРОТЕОМНЫЙ ОТВЕТ КОРНЕЙ АРАБИДОПСИСА (*ARABIDOPSIS THALIANA* L.) НА ДЕЙСТВИЕ ГИДРОКСИЛЬНОГО РАДИКАЛА

Д.П. Горбач¹, Н.В. Лазерко², М.А. Маковитская², М.А. Черныш², Е.М. Лукашева¹, Ю.З. Мин³, В.В. Демидчик², А.А. Фролов²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; ²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь; ³Международный центр биологии мембран, Университет Фошана, Фошан, Китай

Абиотический стресс представляет собой универсальную реакцию растений на действие неблагоприятных факторов среды. В большинстве случаев он сопровождается развитием окислительного стресса, т.е. условий, характеризующихся большей интенсивностью образования активных форм кислорода (АФК). Так, с одной стороны, в относительно низких концентрациях, они являются сигнальными молекулами, которые модулируют ответ растений на стресс путем обратимой модификации аминокислотных остатков белков. С другой стороны, в большой концентрации, АФК являются фактором повреждения мембран и биомолекул клеток в ходе их необратимого окисления и/или окислительной дегградации. При этом необходимо отметить, что условия, при которых одна модальность АФК-зависимого ответа переходит в другую, в значительной степени остаются неизвестными. Одним из способов приблизиться к пониманию механизмов, лежащих в основе физиологических эффектов АФК, является редокс-протеомика, занимающаяся изучением изменений протеома в ответ на действие окислительного стресса. Благодаря методам редокс-протеомики становится возможным проанализировать, в частности, белковый состав растений, обработанных АФК (или их смесями стандартизированного состава), таким образом приблизившись к пониманию эффектов отдельных АФК в контексте характеристических изменений метаболизма и паттернов окислительных пост-трансляционных модификаций. Таким образом, целью данного исследования стало изучение ответа протеома корней на действие гидроксильного радикала – одной из наиболее реактивных АФК. Полученный результат однозначно указывал на существенные отличия паттернов дифференциальной экспрессии и посттрансляционных модификаций как между различными концентрациями металла и аскорбиново кислоты, так и по сравнению с обработкой H₂O₂ (референс). Так, обработка гидроксильными радикалами вызывала повышение экспрессии белков стрессового ответа, в первую очередь шаперонов и факторов регуляции экспрессии. Ответ значительно отличался от эффектов H₂O₂, вызывавшей сильное усиление экспрессии ферментов центрального метаболизма – в первую очередь, гликолиза и электрон-транспортной цепи митохондрий, а также усиление биосинтеза широкого спектра редокс белков, наблюдающееся одновременно с подавлением белкового аппарата синтеза аминокислот и белков.

6-КЕТОХОЛЕСТАНОЛ – СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОР ПРОТОНТРАНСЛОЦИРУЮЩЕЙ NADH:УБИХИНОН-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ (КОМПЛЕКСА I) ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЧАСТИЦАХ СЕРДЦА БЫКА

В.Г. Гривенникова¹, Т.В. Жарова¹, Ю.Н. Антоненко²

¹Кафедра биохимии, Биологический факультет и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Образующаяся в результате работы дыхательной цепи разность электрохимических потенциалов ионов водорода (протондвижущая сила, proton motive force, pmf) может рассеиваться в присутствии так называемых разобщителей окислительного фосфорилирования, увеличивающих протонную проницаемость внутренней мембраны митохондрий. Механизм работы этих гидрофобных соединений до конца не выяснен, и далеко не всегда действие разобщителей можно объяснить их способностью обратимо связываться с ионами водорода и трансмембранно переносить их, сбрасывая pmf. В литературе обсуждается альтернативная возможность, рассматривающая непосредственное взаимодействие разобщителей с белками внутренней мембраны митохондрий. Интерес к изучению механизма действия разобщителей возрос после обнаружения соединений, способных «обращать» увеличение протонной проводимости митохондриальной мембраны. К таким соединениям относится

6-кетохолестанол (КХ), введенный в практику, благодаря работам А. Старкова и его коллег в 1994 г. (*FEBS Letters* 355, 305–308). Это соединение широко применяется в качестве ресопрягающего агента, однако его влияние собственно на ферменты дыхательной цепи изучены недостаточно. Мы обнаружили, что КХ в диапазоне концентраций 0–50 мкМ специфически ингибирует NADH-оксидазную и NADH:убихинон-оксидоредуктазную активности, катализируемые комплексом I дыхательной цепи субмитохондриальных частиц сердца быка (СМЧ), и не влияет на активность фермента с искусственными акцепторами электронов. Таким образом, действие ингибитора направлено на убихинон-связывающий центр комплекса I. Обнаружено, что КХ более эффективно блокирует прямую реакцию комплекса I (окисление NADH убихиноном) по сравнению с pmf-зависимой реакцией обратного переноса электронов от убихинола на NAD⁺. Равновесные константы ингибирования КХ прямой и обратной реакций составляют 7 и 20 мкМ, соответственно. В исследованной области концентраций КХ АТРазная активность СМЧ падает примерно на 50%, а сукцинатоксидазная активность практически не изменяется. Полученные данные указывают на то, что ресопрягающее действие КХ может осуществляться с участием комплекса I дыхательной цепи. Ранее считалось, что КХ влияет на физико-химические параметры липидной части внутренней мембраны митохондрий, такие как дипольный потенциал и микровязкость

БИОХИМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ НОВОГО КЛАССА ФИТОПЕПТИДОВ СЕМЕЙСТВА miPEP156, КОДИРУЕМЫХ "ТРАНСЛИРУЕМЫМИ" ПРЕДШЕСТВЕННИКАМИ микро-РНК У РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА BRASSICACEAE

Т.Н. Ерохина¹, Л.В. Самохвалова¹, Д.Ю. Рязанцев¹, Л.В. Самохвалова¹, С.К. Завриев¹, С.Ю. Морозов²

¹Институт биологической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Недавние исследования показали, что в растениях первичные транскрипты некоторых генов микроРНК (pri-miRNA) способны экспрессировать короткие белки (пептиды) размером от 12–15 аминокислотных остатков до 30–40 остатков. Эти пептиды, названные miPEP, могут участвовать в регуляции транскрипции собственных pri-miRNA и сохраняют биологическую активность при экзогенном введении в растения через корневую систему. Используя биоинформатический сравнительный анализ последовательностей РНК-транскриптов и геномов растений, нами ранее была обнаружена новая группа miPEP (miPEP-156a), которая кодируется первичными транскриптами pri-miR156a у нескольких десятков видов из семейства *Brassicaceae*. Экзогенные химически синтезированные пептиды miPEP-156a способны эффективно проникать в проростки растений через корневую систему и распространяться по растению локально и системно в листьях молодых проростков. При этом наблюдается морфологический эффект, заключающийся в ускоренном росте основного корня проростка. Параллельно наблюдается позитивный эффект на уровне экспрессии pri-miR156a. Важно, что с эффектами на морфологическом и молекулярном уровнях коррелирует способность пептида быстро проникать в ядра клеток и связываться *in vitro* как с хроматином, так и с ДНК. В настоящей работе также была экспериментально установлена вторичная структура пептида и показано изменение этой структуры в комплексе с ДНК. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-000174.

КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВЕНТУРИЦИДИНА С Fo-F1-АТРАЗОЙ/СИНТАЗОЙ ПРОЧНОСОПРЯЖЕННЫХ СУББАКТЕРИАЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ *PARACOCCLUS DENITRIFICANS*

Т.В. Жарова¹, В.С. Козловский²

¹Кафедра биохимии, Биологический факультет и ²Кафедра фотосинтеза, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского; МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Широко признано, что Fo-F1-АТРАЗЫ/синтазы действуют как обратимые хемо-электромеханические молекулярные машины, при этом предполагается, что гидролиз АТР, генерирующий протон-движущую силу, pmf, и синтез АТР, потребляющий pmf, протекают по одним и тем же механизмам. Однако многочисленные экспериментальные данные, полученные в нашей лаборатории, позволили сформулировать новую гипотезу, согласно которой механизмы реакций синтеза и гидролиза АТР различаются и катализируются разными формами комплекса Fo-F1 [1]. Ранее мы показали, что вентурицидин, специфический ингибитор окислительного фосфорилирования, блокирует фермент со значительной разницей в аффинности, зависящей от направления катализа [2]. В настоящей работе мы детально исследовали кинетику торможения вентурицидином Fo-F1-АТРАЗЫ/синтазы в составе высокосопряженных мембран *Paracoccus denitrificans* в реакции синтеза и гидролиза АТР. Реакцию гидролиза АТР мы регистрировали по АТР-зависимому восстановлению NAD⁺ (pmf-зависимый обратный перенос электронов). Примененный нами подход позволил измерять прямую и обратную реакции, катализируемые Fo-F1, в условиях энергизованной мембраны. Остаточная активность в реакции синтеза АТР линейно падала при повышении концентрации ингибитора, тогда как при гидролизе АТР эта зависимость была сигмоидальной: в области низких концентраций ингибитора значительное торможение синтеза АТР вентурицидином не сопровождалось падением скорости гидролиза. Кажущееся значение I50 (выраженное в молях фермента) для обеих реакций не зависело от концентрации фермента и различалось в 2,5 раз. Такое поведение объясняется моделью, включающей две разные форм Fo-F1, одна из которых катализирует синтез, а вторая – гидролиз АТР. Обе формы характеризуются разным сродством к вентурицидину и взаимодействуют с ингибитором в гидрофобной фазе.

1. Виноградов А.Д. (2019) *Биохимия*, 84, 1553-1563.

2. Zharova T.V., Vinogradov A.D. (2017) *Biochim. Biophys. Acta*, 1858, 939-944

РАСШИФРОВКА МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ГЛАВНОЙ ПРОТЕАЗЫ SARS COV 2 МРГО ВИРУСА COVID 19 С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА БЫСТРОЙ КИНЕТИКИ

М.Ю. Захарова*^{1,5}, А.А. Кузнецова*², Е.Н. Калиберда¹, И.Н. Курбацкая¹, А.М. Егоров^{3,4}, Д.И. Осолодкин⁴, А.Г. Габибов^{1,3}, Н.А. Кузнецов²

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

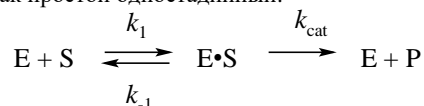
²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;

³МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁴ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва;

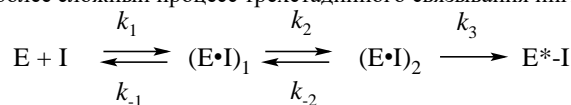
⁵Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва

*Авторы участвовали в получении результатов в равной степени

С начала 2020 года пандемия COVID 19, вызываемая вирусом SARS- COV-2, приобрела значительные масштабы, в связи с чем научные разработки, связанные с поиском и дизайном лекарственных средств против данной вирусной инфекции, стали особенно актуальны. Перспективной мишенью для направленного поиска лекарств является главная протеаза вируса Мрго – фермент, играющий ключевую роль в процессинге вирусных белков. На сегодняшний день описано множество ингибиторов для данного фермента, найденных как среди сертифицированных для других заболеваний лекарственных препаратов, так и среди соединений, разработанных путем молекулярного докинга на базе разрешенной кристаллической структуры Мрго. У многих из этих полученных соединений есть ряд недостатков – низкое ингибирующее действие, либо токсичность в экспериментах на клетках животных и человека. Поэтому, на сегодняшний день, научные изыскания по поиску оптимальных ингибиторов для Мрго продолжаются. Важным моментом для дизайна ингибиторов протеаз является четкое понимание всех стадий механизма работы фермента, количество и продолжительность, а также биологический смысл которых может различаться. В настоящей работе исследована активность фермента Мрго в режиме предстационарной кинетики методом останова потока. Использование данной технологии позволило нам охарактеризовать механизм связывания модельного субстрата с протеазой Мрго как простой одностадийный:



Однако при изучении прямого связывания фермента с ковалентным конкурентным ингибитором PF-00835231 в отсутствие субстрата нами был описан более сложный процесс трехстадийного связывания ингибитора по следующей схеме:



Интересно, что при исследовании взаимодействия неактивного мутанта данного фермента с заменой активного цистеина 145 на аланин было также выявлено эффективное связывание с данным ингибитором по тому же механизму с отсутствием третьей стадии ковалентного присоединения ингибитора к цистенину 145. Отсюда можно сделать заключение, что и нековалентные взаимодействия могут также обеспечивать высоко-аффинное связывание ингибиторов в активном центре фермента. Данные о постадийном механизме работы Мрго вируса SARS- COV-2 могут иметь большое значение для создания новых ингибиторов и получения эффективных лекарств для борьбы с COVID-19. Работа поддержана грантом РФФИ 17-74-30019.

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНОВ ПРОТЕАЛИЗИНПОДОБНОЙ ПРОТЕАЗЫ PRTS И ЕЕ ИНГИБИТОРА НА ИНСЕКТОПАТОГЕННОСТЬ БАКТЕРИИ PHOTORHABDUS LUMINESCENS

М.А. Карасева, И.В. Демидюк

Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Протеализинподобные протеазы (ППП) широко распространены у бактерий, а также встречаются у грибов и архей. У бактерий непосредственно за генами ППП расположены гены их ингибиторов (И), во многих случаях гены ППП и И формируют бицистронный оперон и, таким образом, по-видимому, связаны общей функцией. Биологическая роль ППП и И не установлена, но имеющиеся данные указывают на их участие во взаимодействии бактерий с другими организмами. Так известно, что ППП могут определять бактериальную инвазию, подавлять антибактериальную защиту и обладать токсическим действием. Таким образом, исследования ППП и И могут дать новую информацию о механизмах бактериального патогенеза. В нашей работе для исследования роли ППП и И в бактериальном патогенезе в качестве модели была использована инфекция личинок *Galleria mellonella* инсектопатогенной бактерией *Photorhabdus luminescens*. Нами был получен нокаутный вариант *Ph. luminescens*, в котором гены ППП, PrtS, и И инактивированы путем делеции без нарушения рамки считывания. При культивировании в жидкой среде нокаутный вариант и дикий тип демонстрировали близкие кривые роста и профили биолюминесценции, а также не различались по способности формировать биопленки. Анализ с использованием твердых селективных сред (агара МакКонки, среды NBTA и L-агара с красителем конго красным), применяемых для дифференциального определения фенотипических форм *Ph. luminescens*, также не выявил отличий между вариантами. Оба варианта демонстрировали близкую инфекционную эффективность: инъекция 5 клеток личинкам *G. mellonella* приводила к гибели животных через 48 ч. Таким образом, нами впервые был оценен *in vivo* вклад ППП и И в бактериальный патогенез. Несмотря на то, что ранее было показано, что инъекция индивидуальной PrtS приводит к гибели насекомых и вызывает у них неконтролируемую меланизацию, наши результаты позволяют сделать вывод, что в PrtS не вносит ключевого вклада в бактериальную инфекцию и, вероятно, не работает как «прямой» инсектотоксин. Возможно, действие этой протеазы перекрывается эффектами других, более мощных токсинов *Ph. luminescens*. Нельзя исключить также, что PrtS не участвует во взаимодействии бактерий с инфицированными животными, а согласно недавно сформулированной гипотезе вовлечена в межбактериальную конкуренцию.

ЦИТОКИНЫ КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРИ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

О.А. Князева, Е.А. Киреева

Башкирский государственный университет; Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Уфа

Цитокины способны проявлять себя как факторы опухолевой прогрессии, активирующие ангиогенез и миграцию опухолевых клеток. Злокачественные клетки экспрессируют рецепторы к соответствующим цитокинам, используя их в качестве аутокринных факторов роста, способствующих экспансии опухоли. Одновременно цитокины могут вовлекаться в механизм уклонения их от системы иммунного надзора, участвуя в качестве основных медиаторов противоопухолевого иммунитета. Противовоспалительный цитокин IL-4 считается индикатором агрессивности опухоли, провоспалительный IL-6 играет также центральную роль в развитии многих новообразований [2]. Показано, влияние на их экспрессию иммунокорректирующих соединений 3d-металлов [1]. Цель работы: оценить влияние паллиативной терапии на уровень цитокинов IL-4 и IL-6 в сыворотке крови больных раком молочной и предстательной желез. Уровень цитокинов IL-4 и IL-6 определяли методом ИФА с помощью тест-наборов (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург) в сыворотке крови больных раком молочной железы (РМЖ) (n=27) и раком предстательной железы (РПЖ) (n=19), находившихся на лечении в паллиативном отделении клинической больницы № 5 г. Уфы. После проведения паллиативной терапии продукция цитокинов IL-4 увеличивалась при РМЖ с III стадией примерно в 1,2 раза, с IV стадией – в 2,4 (p<0,5). При РПЖ с III стадией экспрессия IL-4 возрастала в 0,8 раз, а с IV стадией – в 1,6 (p<0,5). При этом синтез IL-6 также увеличивался: при РМЖ с III и IV стадиями в 1,8 и 2,9 раза, а при РПЖ – в 3,1 и 5,2 раза соответственно (p<0,5). Таким образом, проведение паллиативной терапии стимулировало продукцию цитокинов, причем в большой степени у больных в поздней стадии заболевания. Полученные результаты позволяют использовать данные показатели в качестве прогностических факторов для оценки эффективности терапии злокачественных новообразований.

1. Князева О.А., Уразаева С.И. Исследование влияния комплексов ионов 3d-металлов с глюконовой кислотой на синтез цитокинов при экспериментальном иммунодефиците. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2018; 26(4): 459-465.
2. Setrerrahmane S., Xu H. Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development. *Mol. Cancer*. 2017; 16. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0721-9>

ОЦЕНКА РОЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БЕЛОК-МЕМБРАНА В ДИМЕРИЗАЦИИ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

А.С. Кузнецов, Р.Г. Ефремов

НИУ «Высшая школа экономики»; Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Белок-липидные взаимодействия характерны для большинства мембранных белков. Известно, что в случае ионных каналов связывание определённых молекул липидов может модулировать их активность. Рецепторные тирозинкиназы — важнейший класс клеточных рецепторов — устроены проще, поскольку трансмембранный домен этих белков представляет собой одну альфа-спираль. Тем не менее, ранее показана возможность формирования на контактной поверхности белок-мембрана неспецифических участков локализации липидных молекул, в особенности, вблизи «малых» аминокислотных остатков, погружённых в гидрофобную область липидного бислоя. Липидное окружение, в свою очередь, играет важную роль в формировании активных и неактивных конформаций димеров трансмембранных доменов рецепторных тирозинкиназ, но молекулярные основы данного процесса не всегда понятны. Предполагается, что белок-липидные взаимодействия вносят значительный вклад в свободную энергию димеризации таких рецепторов. В настоящей работе мы применили методы атомистического компьютерного моделирования для выявления сайтов белок-липидных контактов в мономерах и димерах рецепторов семейства ErbB. Результаты анализа распределений средней плотности молекул липидов в траекториях молекулярной динамики позволили показать, что гликофорин-подобные мотивы димеризации у всех рецепторов ErbB являются одновременно сайтами белок-липидных взаимодействий в случае мономеров. При формировании димеров наблюдали перераспределение связанных липидов и значительное упорядочивание ацильных цепей липидных молекул, находящихся вблизи интерфейса взаимодействия мономеров.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ.

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ-АРГОНАВТОВ РАЗНЫХ КЛАССОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ *ESCHERICHIA COLI*

А.А. Куликова, А.В. Кузьменко, А.В. Кульбачинский, Д.М. Есюнина

Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Прокариотические белки-Аргонавты (pAgo) составляют разнообразную по доменной организации группу эндонуклеаз, которые используют небольшие interfering гидовые молекулы нуклеиновых кислот для узнавания и расщепления комплементарных генетических мишеней. Белки-Аргонавты прокариот имеют ряд структурных и функциональных особенностей, отличающих их от эукариотических. В отличие от аргонавтов эукариот в роли гида и мишени для белков pAgo в основном выступает ДНК. Некоторые классы белков pAgo используют РНК в качестве гида или мишени, но при этом комплементарной нуклеиновой кислотой в дуплексе является ДНК. Больше половины белков pAgo согласно биоинформатическому анализу не способны расщеплять мишень. Часто такие каталитически неактивные pAgo закодированы в одном опероне с генами предполагаемого нуклеаз из разных семейств. Прокариотические Аргонавты намного проще изучать *in vitro* по сравнению с эукариотическими гомологами из-за простоты их экспрессии и выделения в гетерологичной системе *E. coli*. Однако до сих пор остается открытым вопрос о клеточных функциях этих белков. В данной работе мы создали систему для оценки влияния различных белков pAgo на жизнеспособность *E. coli*. Штаммы *E. coli* с хромосомными вставками генов

pAgo и флуоресцентных белков RFP/Cerulean под индуцибельным тетрациклиновым промотором были получены на основе штамма MG1655 Z1 с использованием системы Red-зависимой гомологичной рекомбинации фага λ . В результате сконструированы штаммы *E. coli*, кодирующие белки pAgo, в том числе с ассоциированными нуклеазами, а также белки RFP или Cerulean. В контрольном штамме экспрессируется только флуоресцентный белок. Проведены эксперименты по выращиванию смесей штаммов (контрольного и с геном белка-Аргонавта) в стандартных условиях при разном уровне экспрессии Аргонавтов с целью выявления потенциального влияния этих белков на жизнеспособность клеток. Кроме того, аналогичные эксперименты проведены в присутствии генотоксических агентов, антибиотиков и бактериофагов. Данная система позволяет понять, как влияет экспрессия белка-Аргонавта на клетки *E. coli*. Также эту систему можно использовать для скрининга потенциальных активностей и функций Аргонавтов в клетках бактерий.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 19-14-00359).

ОСОБЕННОСТИ ПРЕЗЕНТАЦИИ ЭНЦЕФАЛИТОГЕННОГО ПЕПТИДА МВР КОМПЛЕКСАМИ HLA-DR, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИМИ ПРОТЕКТИВНОСТЬ И ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К РАССЕЯННОМУ СКЛЕРОЗУ

А.Э. Мамедов¹, И.Н. Курбацкая¹, И.В. Смирнов^{1,2}, А.А. Белогуров^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ³МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Предрасположенность к рассеянному склерозу (РС), хроническому аутоиммунному заболеванию центральной нервной системы, обусловлена различными факторами. Генетическая составляющая считается одним из важнейших факторов. Гены HLA класса II вносят наибольший вклад в развитие рассеянного склероза. Группа аллелей HLA-DRB1*15 считается одним из основных генетических факторов риска, предрасполагающих к РС. Показано, что группа аллелей HLA-DRB1*01 обладает протективным действием по отношению к этому заболеванию в русской популяции. В этой работе мы сравнили связывание энцефалитогенного фрагмента основного белка миелина (МВР) с двумя комплексами HLA-DR, которые обеспечивают защиту и предрасположенность к РС: HLA-DR1 (HLA-DRB1*0101) и HLA-DR15 (HLA-DRB1*1501) соответственно. Мы обнаружили, что миелиновый пептид MBP88-100 связывается с HLA-DR1 со скоростью почти на порядок ниже, чем вирусный пептид гемагглютинина (НА), а также по сравнению с MBP85-97 и вирусным рр65 в контексте HLA-DR15. Структура С-концевой части пептида играет ключевую роль в связывании с HLA-DR1 при том, что N-концевые части пептидов обладают одинаковым родством. IC50 миелинового пептида MBP88-100, конкурирующего с вирусным НА за связывание с HLA-DR1, почти на порядок выше, чем в случае НА, а также по сравнению с MBP85-97 и вирусным рр65 в контексте HLA-DR15. Таким образом, аутоантигенный МВР не способен конкурировать с вирусным пептидом за связывание с протективным HLA-DR1. Однако данный миелиновый фрагмент более конкурентоспособен, чем вирусный пептид в отношении HLA-DR15.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) №17-74-30019.

АМИЛОИДНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКА NOS1AP ЧЕЛОВЕКА

А.Б. Мативин¹, О.С. Сергеева¹, С.Е. Москаленко², Г.А. Журавлева^{1,3}, С.А. Бондарев^{1,3} ¹Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет; ²Институт общей генетики, Санкт-Петербургский филиал; ³Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Ген NOS1AP кодирует цитозольный белок, который связывается с нейрональной синтазой оксида азота nNOS. Ген NOS1AP также связан с различными расстройствами: от шизофрении и аутизма до сердечно-сосудистых заболеваний и рака груди. Белок NOS1AP обеспечивает передачу сигналов к nNOS и участвует в регуляции этого фермента. В результате биоинформатического анализа мы предположили, что белок NOS1AP может формировать амилоидные агрегаты и является одним из компонентов амилоидной сети, включающей бета-амилоид. Эта гипотеза была протестирована в различных модельных системах. Белок NOS1AP формирует экстраклеточные амилоидные агрегаты в системе C-DAG (curl1-зависимый генератор амилоида). Это можно проследить по характерному красному цвету колоний на среде с амилоид-специфичным красителем Конго красным, и «яблочно-зеленому» двулучепреломлению в поляризованном свете. EGFP-NOS1AP также может агрегировать в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и человека (линия HEK293FT). Флуоресцентная микроскопия выявила локальные скопления этого белка. С помощью метода SDD-AGE нам удалось показать, что эти агрегаты устойчивы к обработке детергентом (SDS) в дрожжах. В результате делеционного анализа мы картировали амилоидогенный фрагмент белка, который локализован в позиции 1-291 а.к. Таким образом, белок NOS1AP проявляет амилоидные свойства *in vitro* и *in vivo*. Поскольку NOS1AP взаимодействует с бета-амилоидом, можно предположить, что он является частью амилоидного каскада, ассоциированного с развитием болезни Альцгеймера.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (20-34-90117), а также гостемы номер 0112-2016-0015/

ПОЛУЧЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ НЕОАНТИГЕННЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ МОДЕЛИ ПРОТИВОМЕЛАНОМНОЙ ВАКЦИНЫ И ОЦЕНКА ИХ ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ

М.В. Миронова, А.А. Рудакова, М.А. Барышникова, Д.В. Гусев, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков
НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва

В настоящее время большой интерес вызывают исследования, в которых синтетические пептиды, направленные на усиление распознавания иммунной системой опухолевых неоантигенов, используются в составе персонализированных противоопухолевых вакцин [Bobisse S. et al. Neoantigen-based cancer immunotherapy // *Annals of Translational Medicine*. – 2016. – Т. 4. – №. 14]. Неоантигены образуются в опухолевых клетках в результате многочисленных соматических мутаций и отсутствуют в нормальных тканях, они индивидуальны для каждой опухоли и являются оптимальной мишенью для иммунотерапии. С

помощью полноэкзомного секвенирования опухоли и нормальной ткани и биоинформатического анализа результатов секвенирования можно спрогнозировать, какие мутированные опухолевые пептиды могут высокоаффинно связываться с аутологичными молекулами человеческих лейкоцитарных антигенов с последующей активацией иммунного ответа. Нами был разработан биоинформатический подход для анализа данных высокопроизводительного секвенирования образцов меланомы и нормальной ткани, и предсказания пептидов, способных вызывать иммунный ответ. В результате анализа данных секвенирования меланомы B16-F10 и здоровых тканей мышей C57Bl/6J мы отобрали для синтеза пептиды длиной от 16 до 24 аминокислот. Для их получения нами был выбран твердофазный метод синтеза. Молекулярную массу и чистоту полученных пептидов подтверждали методом ВЭЖХ-МС. Для очистки использовали метод препаративной жидкостной хроматографии. Чистота каждого пептида после очистки составила не менее 80%. Для оценки иммуногенности и противоопухолевой активности полученных пептидов мышей иммунизировали пептидами в сочетании с адьювантом Poly(I:C) четырехкратно с интервалом в неделю, контрольную группу не иммунизировали. Иммуногенность пептидов оценивали по продукции интерферона- γ спленocyтитами методом ELISpot через 5 дней после последней иммунизации. Пептиды вызывали увеличение количества интерферон- γ -продуцирующих клеток селезенки ранее иммунизированных мышей. Для оценки противоопухолевого эффекта мышам подкожно перевивали меланому F16-F10. В группе мышей, иммунизированных пептидами, наблюдали противоопухолевый эффект, выразившийся в торможении роста опухоли и увеличении продолжительности жизни.

АНАЛИЗ РЕПЕРТУАРА В-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Л.А. Овчинникова¹, М.Н. Захарова², М.В. Иванова², М.Р. Кабилов³, Н.А. Быкова⁴, А.В. Фаворов⁴, А.А. Белогуров^{1,5}, А.Г. Габибов^{1,5}, Я.А. Ломакин¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Научный центр неврологии, отделение нейрореабилитации, Москва; ³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва; ⁵МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Регуляторные функции В-клеток играют важную роль в развитии и подавлении иммунного ответа. Ранее было показано, что дефицит В-регуляторных клеток (Breg) или снижение их противовоспалительной активности может приводить к ряду иммунологических нарушений, в частности к аутоиммунным заболеваниям. Точный механизм функционирования и развития Bregs выяснен лишь частично, почти ничего не известно о специфичности его В-клеточных рецепторов. В представленной работе методом широкомасштабного секвенирования были проанализированы В-клеточные рецепторы транзитных Breg (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) у здоровых доноров и у пациентов с РС. Мы показали, что распределение генов зародышевой линии иммуноглобулинов у пациентов с РС существенно отличается от распределения у здоровых доноров. При этом, разница между здоровыми донорами и пациентами с высокоактивным РС (ВАРС) более существенна, чем между здоровыми донорами и пациентами с доброкачественным течением РС (ДРС). В-клетки пациентов с ВАРС характеризуются наличием менее зрелых тяжелых цепей иммуноглобулинов по сравнению со здоровыми донорами. Было показано, что у пациентов с РС количество транзитных Breg увеличивается. Таким образом, мы показали, что нарушение созревания транзитных Breg связано с прогрессированием РС.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-74-30019 “Структурные и кинетические особенности презентации антигенов как ключ к пониманию механизмов индукции аутоиммунных патологий и лимфомогенеза.”

ИССЛЕДОВАНИЕ УНИКАЛЬНЫХ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

А.А. Пометун^{1,2}, Т.С. Юрченко², С.Б. Болотова², А.А. Логинова², Е.В. Пометун³, С.С. Савин², В.И. Тишков^{1,2}

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Институт фармации, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

Формиатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2.) катализирует превращение формиат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD(P)⁺ до NAD(P)H. ФДГ обладает уникальной физиологической ролью в различных организмах – ее синтез резко возрастает при различных стрессовых воздействиях. В патогенных микроорганизмах ФДГ является чрезвычайно важным ферментом для их жизнедеятельности. ФДГ активно применяется на практике для регенерации кофактора, а также для определения формиата и NAD⁺ в различных биоаналитических системах. В нашей лаборатории было проведено клонирование гена, кодирующего ФДГ из *Staphylococcus aureus* (SauFDH). Последовательность SauFDH обладает уникальными особенностями – она гомологична другим бактериальным ФДГ лишь на 30%, в то время как степень гомологии между другими бактериальными ФДГ достигает 85%. Проведена экспрессия, очистка и изучены основные свойства SauFDH. SauFDH обладает высокой температурной стабильностью, а также имеет самое высокое значение каталитической константы и констант Михаэлиса как по NAD⁺ так и по формиату среди всех изученных ФДГ. Получены кристаллы и определена пространственная структура SauFDH, которая позволила выявить основные структурные особенности и провести детальный анализ взаимосвязи структура-функция для этого фермента. Анализ последовательности «finger print», а также коферментсвязывающего домена в SauFDH позволил выявить ряд аминокислотных остатков, обуславливающих высокие значения K_MNAD⁺ и K_MНСОО⁻. Самыми важными аминокислотными остатками для определения сродства фермента к NAD⁺ и формиату являются V119 и F194. Замены V119A, V119G, F194V привели к снижению K_MNAD⁺ в 2,5, 25 и 4 раза соответственно. Изучение структуры SauFDH позволило выявить несколько положений, в которых у других ФДГ находятся остатки гистидина. Были проведены соответствующие замены (I220H, T250H, K368H и их комбинации), а также предпринята попытка сближения остатков гистидина за счет введения дополнительных аминокислотных остатков (TGA, AGA), присутствующих у других бактериальных ФДГ. Оказалось, что данные аминокислотные замены негативно влияют на кинетические параметры, а также на стабильность SauFDH при повышенных температурах. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (Грант 20-04-00915).*

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ У ЛЮДЕЙ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19, И ВАКЦИНИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

М.А. Симонова, Т.В. Бобик, Н.Н. Костин, Г.А. Скрябин, П.Н. Цабай, А.Г. Габибов

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

Разработан тест для детекции нейтрализующих антител, способных ингибировать взаимодействие рецептор-связывающего домена S-белка SARS-Cov2 (RBD) и его рецептора ACE2. С применением данного теста проведена оценка гуморального ответа у людей, перенесших COVID-19 в легкой и тяжелой форме, а также у людей, вакцинированных различными препаратами: векторными вакцинами «Спутник V» (Россия) и «Convidicea» (Китай) и субъединичной вакциной «ЭпиВакКорона» (Россия). Показано, что в сыворотках крови переболевших людей и людей, вакцинированных препаратами векторных вакцин, уровень нейтрализующих антител различался слабо ($p=0,003$ в дисперсионном анализе и $p>0,05$ в парных тестах Манна-Уитни). В сыворотках крови людей, вакцинированных препаратом «ЭпиВакКорона», нейтрализующих антител не обнаружено. Уровни IgG к RBD в сыворотках крови переболевших и вакцинированных векторными вакцинами людей существенно не различались ($p=0,329$ в дисперсионном анализе и $p>0,05$ в парных тестах Манна-Уитни). В сыворотках крови людей, вакцинированных препаратом «ЭпиВакКорона», IgG к RBD не обнаружено. Показана обратная корреляция между IC50 (показатель нейтрализующей активности сыворотки) и уровнем IgG к RBD: $p<0,001$ в тесте Пирсона (коэффициент корреляции составил $-0,48$, 95% доверительный интервал: $-0,59 - -0,35$). В целом, можно заключить, что уровни IgG и нейтрализующих антител к RBD у людей, вакцинированных векторными препаратами, и у переболевших COVID-19 людей существенно не отличаются.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ, проект № 17-74-30019.

ГИАЛУРОНИДАЗЫ: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ, ВОПРОСЫ К КЛАССИФИКАЦИИ

Т.И. Пономарёва, Д.А. Слядовский, М.А. Тимченко, Н.В. Поздняков, С. Лапаев, М.В. Филиппов, А.М. Лукин, С.В. Шилов, Е.А. Согорин

ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино

Гиалуронидазы — группа ферментов, способных расщеплять гиалуроновую кислоту. Большинство из них способны также расщеплять хондроитин и его производные. Гиалуронидазы делят на три класса в зависимости от особенностей их ферментативной активности. Гиалуронат-4-гликаногидролазы расщепляют β -(1→4)-гликозидные связи цепи гиалуроновой кислоты с образованием N-ацетил-D-глюкозамина на восстановленном конце олигосахаридов. Сюда относятся гиалуронидазы млекопитающих и некоторые других эукариот. Гиалуронат-3-гликаногидролазы — гиалуронидазы пиявок, гидролизуют β -(1→3)-гликозидные связи, полученные продукты реакции содержат N-ацетил-D-глюкозамин на невосстановленном, и D-глюкуроновую кислоту на восстановленном конце олигосахаридов. Третья группа — бактериальные гиалуронат лиазы расщепляют β -(1→4)-гликозидные связи по механизму β -элиминирования с образованием двойной связи в остатке D-глюкуроновой кислоты. β -элиминирование гиалуроновой кислоты принято отождествлять только с бактериальными гиалуронидазами. Однако этот же "бактериальный" тип гидролиза был недавно показан для дрожжей *Cryptococcus laurentii* и для трутового гриба *Fistulina hepatica*. Гиалуронидазы человека, некоторых животных, и бактерий хорошо описаны как с точки зрения биохимических свойств, так и со стороны структурных особенностей. Однако гиалуронидазы ракообразных описаны слабо. Так известна гиалуронат-3-гликаногидролаза антарктического криля *Euphausia superba* с оптимумом pH 5,3 и 37°C температуры реакционной смеси, судя по результатам гель-хроматографии с молекулярной массой 80 кДа. В недавней нашей работе мы идентифицировали аминокислотную последовательность гиалуронидазы камчатского краба, и показали, что расщепление гиалуроновой кислоты идёт по механизму β -элиминирования. Таким образом, классификация гиалуронидаз, по которой гиалуронат лиазы, осуществляющие β -элиминирование отождествляют только с "бактериальным" типом гиалуронидаз, приближается к моменту переосмысления. Вероятно, что данный механизм расщепления гиалуроновой кислоты распространён в природе шире, чем декларируется сейчас.

ДИЗАЙН, СИНТЕЗ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ *IN VITRO* ДИМЕРНЫХ ДИПЕПТИДНЫХ МИМЕТИКОВ ОТДЕЛЬНЫХ ПЕТЕЛЬ МОЗГОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА

А.В. Тарасюк, Н.М. Сазонова, И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева

НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва

Дизайн миметиков основывался на кристаллической структуре BDNF (pdb ID: 1b8m). Нами было обнаружено, что наиболее экспонированными в растворитель являются бета-изгибы 1-й, 2-й и 4-й петель нейротрофина, а геометрически наиболее выгодное для взаимодействия с рецептором положение занимают центральные дипептидные фрагменты этих бета-изгибов: -Met31-Ser32-, -Ser45-Lys46-, -Ser94-Lys95-. При конструировании миметиков эти фрагменты сохраняли, предшествующий а.о. заменяли его биоизостером (остатки Asp30 и Asp93 – остатком янтарной кислоты, Val44 – остатком гексановой кислоты). Димерную структуру воспроизводили с помощью олигометилениамина спейсера. Так были сконструированы димерные дипептидные миметики 1-й петли – гептаметилениамина бис-(N-моносукцинил-L-метионил-L-серина) (ГСБ-214), 2-й петли – гексаметилендиамид бис-(N-гексаноил-L-серил-L-лизина) (ГТС-201) и 4-й петли – гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) (ГСБ-106). Синтез миметиков проводили классическими методами пептидного синтеза в растворе, преимущественно методом активированных эфиров, с использованием *Woc/Z-* и *Z/Woc-* стратегий защиты функциональных групп. Установлено, что пептиды ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 активируют специфический для BDNF рецептор TrkB. Однако картина активации пострецепторных путей этого рецептора была различна. Фосфолипазу C (PLC γ) активировали все миметики. ГСБ-106 активировал, кроме того, PI3K/Akt и MAPK/Erk. ГСБ-214 и ГТС-201, кроме PLC γ , активировали PI3K/Akt- и MAPK/Erk- сигнальные пути соответственно. Изучение нейропротекторной активности *in vitro* на культуре клеток гиппокампа мыши линии HT22 в условиях окислительного стресса (Jackson G.R. et al. 1992), показало, что

все миметики в интервале концентраций 10^{-5} – 10^{-8} М увеличивали жизнеспособность нейронов. Миметик наиболее экспонированной 4-й петли ГСБ-106 был активен до 10^{-9} М. Кроме того, эффект ГСБ-106 был стереоспецифичен: его L,D и D,L диастереомеры были неактивны. Таким образом, димерные дипептидные миметики отдельных петель BDNF обладают нейтропротекторной активностью. Максимальный нейтропротекторный эффект продемонстрировал миметик 4-й петли ГСБ-106, активирующий все три основных сигнальных пути TrkB. Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №18-15-00381).

УКЛАДКА ДНК В ГИСТОНОПОДОБНЫХ КОМПЛЕКСАХ И 2D-КРИСТАЛЛАХ БЕЛКА DPS

К.Б. Терешкина, Э.В. Терешкин, Ю.Ф. Крупянский

ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва

Бактерии в условиях стресса используют специальный энергонезависимый механизм для поддержания порядка и защиты нуклеоида. Внутри клеток образуются устойчивые кристаллы ДНК с ДНК-стабилизирующим белком DPS. Однако точная локализация и форма укладки ДНК в нано-кристаллах DPS-ДНК не известна. В нашей работе было проведено молекулярно-динамическое моделирование процессов адсорбции длинноцепочечных молекул ДНК на 2D-нанокристаллах и додекамерах белка DPS (6gcm.pdb) бактерии *Escherichia coli*. Расчёты были проведены с использованием крупнозернистого представления молекул в программном комплексе Gromacs 2018 (силовое поле MARTINI 2.1_DNA). Выбран участок ДНК гена *uhis* генома *E. coli* с высокой адсорбционной способностью к белку DPS, содержащий 165 п.н. Анализ динамики проводился методом главных компонент. Проекция траекторий на собственные векторы позволили выявить три типа динамического поведения ДНК на поверхности кристалла DPS. Показано, что механизм адсорбции ДНК на поверхности кристалла зависит от локальных свойств кристалла (область N-концов, область остова) и расположения ДНК относительно главных направлений кристалла. При внесении разрывов в однослойный кристалл DPS: без ДНК происходит увеличение размеров разрывов, в то время как нити ДНК сдерживают расхождение участков кристалла и образуют прочные шивки. Для определения возможности обвивания нитью ДНК одиночных додекамеров DPS, было проведено сравнительное исследование динамики ДНК в нуклеосоме (1a0i.pdb) и нуклеосомоподобной структуре ДНК-DPS. Изучено несколько типов обвивания (правозакрученная, левозакрученная, с различным числом витков). Для ДНК на додекамере DPS обнаружен переход от параллельной намотки ДНК (как нитка на катушке) к ступенчатой намотке (как нитка на клубке) с углом поворота нити 70 градусов, радиусом кривизны 5-5.5 нм, что превышает радиус кривизны ДНК в гистоне (4.5 нм). ДНК стабилизируется на додекамере DPS с помощью N-концевых участков. *Расчёты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МЦЦ РАН). Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (Тема 0082-2019-0015, № АААА-А20-120031490003-7).*

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДАЛАРГИНА С ЛИЗОЦИМОМ

А.В. Шнитко¹, М.Г. Чернышева¹, А.С. Скребков¹, А.В. Касперович¹, А.М. Арутюнян², Г.А. Бадун¹

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

Взаимодействие белков с пептидами играет ключевую роль в протекании многих биологических процессов. Особый интерес вызывает их взаимодействие на поверхности клеточных мембран. Целью работы было изучение взаимодействия даларгина с лизоцимом в водных растворах и на межфазных границах, моделирующих клеточные мембраны, с помощью радиохимических и спектральных методов. Даларгин применяется для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта и рассматривается как потенциальный ингибитор протеазы COVID-19 [1, 2]. В качестве модели поверхности мембраны использовали границу раздела водный раствор/п-ксилол. С помощью меченных тритием соединений (лизоцима и даларгина) и метода жидкостной сцинтилляционной спектроскопии в варианте сцинтиллирующей фазы [3] получена количественная информация по адсорбции на межфазной границе и распределению между фазами. Полученные данные сопоставили с данными тензиометрии. Для исследования взаимодействия в растворе использовали методы флуоресцентной спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и изменения ферментативной активности лизоцима.

При проведении экспериментов концентрация даларгина была постоянной и составляла 0,01 г/л, а концентрацию лизоцима варьировали от 0,001 до 0,5 г/л. В качестве водной фазы использовали фосфатно-солевой буфер (PBS), pH 7,3±0,1.

С помощью тензиометрии показано, что даларгин проявляет поверхностно-активные свойства на границах вода/воздух и вода/п-ксилол. Показано, что даларгин и комплекс даларгин-лизоцим отталкиваются в поверхностном слое, что объясняет вытеснение белка из поверхностного слоя с воздухом. На границе с п-ксилолом белок занимает поверхность в денатурированной или частично денатурированной форме и не может быть вытесненным даларгинном. В присутствии даларгина меняется вторичная структура белка, изменения зависят от концентрации пептида. С помощью флуоресцентной спектроскопии показано образование комплекса лизоцим-даларгин 1:1 с константой комплексообразования $(1,4 \pm 0,6) \times 10^5$ л/моль. Об образовании комплекса свидетельствует увеличение бактериолитической активности лизоцима в присутствии пептида по отношению к *Micrococcus luteus*. Молекулярный докинг показал участие в связывании аминокислот активного центра фермента, что объясняет изменение ферментативной активности.

1. S. Patel, A.B. Volpe, S. Awwad, A.G. Schätzlein, S. Haider, B. Liu, I.F. Uchegbu // *Sci. Rep.* 10 (2020) 29–39.
2. V.S. Skvortsov, D.S. Druzhilovskiy, A.V. Veselovsky // *Biomed. Chem. Res. Methods.* 3 (2020) e00124.
3. M.G. Chernysheva, G.A. Badun // *Langmuir* 27 (2011) 2188-2194.

ПРОТЕОЛИЗ РЕНАЛАЗЫ В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА: ВОЗМОЖНАЯ РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ ЕЕ ПЕПТИДОВ?

В.И. Федченко, А.Т. Копылов, А.В. Веселовский, О.А. Бунеева, А.Е. Медведев

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Реналаза (RNLS) – недавно открытый белок, которому свойственны различные функции внутри и снаружи клеток. Внутриклеточная RNLS проявляет активность FAD-зависимой оксидоредуктазы (КФ 1.6.3.5), внеклеточная RNLS оказывает защитные эффекты на клетку, действуя, по многим данным, на свои рецепторные белки. Концентрация реналазы в крови, определяемая наборами ИФА, сильно варьирует по данным разных исследователей. Однако, при использовании для количественного масс-спектрометрического (МС) определения меченого стабильными изотопами углерода и азота протеотипического пептида, соответствующего аминокислотным остаткам (а.о.) 100-116 [1], мы не обнаружили RNLS в крови. При этом уровень RNLS, определенный с помощью набора для ИФА, соответствовал верхним границам “нормы” [2]. Протеотипические пептиды RNLS не были обнаружены и после иммуоаффинного обогащения белков плазмы человека крови на протеин А-сефарозе с пришитыми поликлональными антителами (ПА) против RNLS. По данным Вестерн блот анализа с ПА к RNLS, уровень рекомбинантной RNLS, добавленной к плазме крови, резко снижается в зависимости от времени инкубации и соотношения плазма крови:RNLS. Это свидетельствует о том, что RNLS, попавшая в кровь, подвергается расщеплению ее протеолитическими ферментами. Биоинформатический анализ потенциальных пептидных фрагментов RNLS, образующихся под действием различных протеаз, суммарно определил 42 потенциальных участков расщепления этого белка. По данным МС анализа, при триптическом расщеплении полноразмерной RNLS выявляются девять фрагментов этого белка. Однако при инкубации экзогенной RNLS с плазмой крови выявлялись всего два пептида, характерные для триптического расщепления (77-99 и 194-205 а.о.). по-видимому, из-за расщепления RNLS протеазами крови. Возможно, именно протеолитические фрагменты этого белка и проявляют регуляторные эффекты, описанные для внеклеточной RNLS [3].

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) и поддержана грантом РФФИ № 20-015-00104.

1. А.Т.Копылов et al. (2018), *RapidCommun.MassSpectrom.*32: 1263-1270.
2. Medvedev et al. (2020) *Int. J. Cardiol.* 307:179.
3. Y. Wang et al. (2017) *J. Cell Mol. Med.* 21:1260-1265.

Конкурс молодых ученых

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЭФФЛЮКСНОГО БЕЛКА-ТРАНСПОРТЕРА Р-ГЛИКОПРОТЕИНА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Ю.В. Абаленихина, П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет МЗ РФ, Рязань

Р-гликопротеин (Pgp) – это АТФ-зависимый эффлюксный белок-транспортер, который относится к суперсемейству АВС-транспортеров. Его активность может изменяться под воздействием ряда факторов внешней и внутренней среды. Функционирование Pgp в условиях окислительного стресса (ОС) является недостаточно изученным аспектом. Цель исследования – оценить функциональную активность и количество Pgp в условиях ОС *in vitro*. Материалы и методы. Исследование выполнено на клетках линии Сасо-2, гиперэкспрессирующих Pgp. Активность белка-транспортера оценивали по транспорту субстрата Pgp – фексофенадина (150 мкМ) в трансвелл-системе. Трансвелл-система состоит из двух камер апикальной и базальной, разделенных полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки. Транспорт фексофенадина из базальной камеры в апикальную (аb-транспорт) осуществляется за счет работы Pgp, а из апикальной в базальную (ав-транспорт) пассивной диффузией против работы Pgp. Концентрацию фексофенадина определяли методом ВЭЖХ-УФ. Количество Pgp оценивали методом ИФА. При моделировании ОС клетки инкубировали с H₂O₂ в концентрациях 0.1; 0.5; 1; 5; 10; 50 и 100 мкМ (n=3) в течение 24 ч. Полученные результаты обрабатывали дисперсионным анализом. Результаты. H₂O₂ в концентрациях 0.1; 1 и 5 мкМ не влиял на функциональную активность Pgp, но способствовал увеличению количества белка-транспортера на 78.9% (p=0.01), 67.1% (p=0.02) и 44.6% (p=0.04) соответственно. В концентрации 10 мкМ H₂O₂ повышал коэффициент кажущейся проницаемости Papp а-b фексофенадина на 145.6% (p=0.04) по сравнению с контролем и не влиял на коэффициент кажущейся проницаемости Papp b-a, что свидетельствует о снижении активности Pgp и повышении проницаемости клеточного монослоя. Увеличение концентрации H₂O₂ до 50 и 100 мкМ вызывало повышение коэффициента кажущейся проницаемости Papp b-a на 68.6% (p=0.006) и 155.2% (p=0.0003), и повышение коэффициента кажущейся проницаемости Papp а-b на 435.9% (p=0.0003) и 768.9% (p=0.0005) соответственно, что является следствием повреждением клеточного монослоя. Вывод. В условиях ОС происходит повреждение клеточного монослоя и молекулы белка-транспортера, что снижает его функциональную активность, однако при умеренном ОС (концентрация H₂O₂ 0.1–5 мкМ) данные изменения нивелируются увеличением количества Pgp.

ГЛИКОПРОТЕИН KPI1P NICOTIANA BENTHAMIANA ВОЗВРАЩАЕТСЯ В КЛЕТКУ ПОСЛЕ СЕКРЕЦИИ В АПОПЛАСТ

П.А. Апель^{1,2}, Н.М. Ершова², К.А. Камарова^{1,2}, Е.В. Шешукова², Т.В. Комарова^{1,2}

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, ²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Биологические механизмы, лежащие в основе скоординированного ответа растений на неблагоприятные факторы окружающей среды, задействуют множество систем, одной из которых является система секреции. При этом немаловажную роль

играет внутриклеточный транспорт секретируемых белков с участием эндоплазматического ретикулума (ЭР) и аппарата Гольджи (АГ). Обычно секреторные белки с N-концевым сигнальным пептидом направляются через ЭР/АГ в апопласт. Проходя через АГ, белки могут гликозилироваться. Мы идентифицировали стресс-индуцируемый белок KPILP (Kunitz protease inhibitor like protein) в растениях *Nicotiana benthamiana* [1], и установили, что он содержит сигнальный пептид, который направляет его в ЭР и АГ. Однако, вопреки ожиданиям, KPILP, слитый с GFP, локализуется не в апопласте, а внутри клетки, образуя точечные структуры по периферии. Целью данной работы было исследовать путь внутриклеточного транспорта KPILP и определить его конечную локализацию. Мы предположили, что KPILP может выходить в апопласт, но затем возвращаться обратно в клетку при участии эндоцитоза. Для проверки этого предположения мы использовали технику ингибирования эндоцитоза с помощью C-концевого фрагмента тяжелой цепи клатрина (Hub1) [2]. При одновременном синтезе KPILP:GFP и RFP:Hub1 в клетках мы наблюдали ожидаемую для секретируемого белка апопластную локализацию KPILP:GFP.

Ранее мы показали, что KPILP содержит 3 сайта N-гликозилирования. Введение мутаций в эти сайты практически не влияет на паттерн распределения белка в клетке. Тем не менее, при блокировании эндоцитоза KPILP(N^{60,86}_{мут}) с заменами Asn60 и Asn86 на Ala локализуется внутри клетки, то есть выхода в апопласт KPILP(N^{60,86}_{мут}) не происходит. При этом мутация Asn136 не влияет на секрецию KPILP(N¹³⁶_{мут}), поскольку такая форма KPILP локализуется в апопласте при добавлении Hub1, как и нативная форма. Таким образом, для корректного внутриклеточного транспорта KPILP и его созревания необходимо наличие сигнального пептида, направляющего белок в ЭР/АГ, гликозилирование по остаткам Asn60 и Asn86, секреция в апопласт и эндоцитоз по клатрин-зависимому пути. *Работа выполнена при поддержке РФФ (грант №19-74-20031).*

1. Sheshukova et al., 2017. Front. Plant Sci., 8.
2. Trusova et al., 2019. J. Exp. Bot., 70, 2003–2007.

НОВЫЙ БЕЛКОВЫЙ ИНГИБИТОР ПРОТЕАЗ ЭМФОРИН: МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

И.М. Бердышев, К.Н. Чухонцева, М.А. Карасева, И.В. Демидюк

Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Эмфорин (M4in) – недавно обнаруженный у бактерии *Serratia proteamaculans* новый белковый ингибитор металлопротеазы протеализина (PLN). Ранее нами было показано, что эмфорин является сильным конкурентным медленно связывающимся ингибитором – прототипом нового семейства белковых ингибиторов протеаз. Механизм действия эмфориноподобных ингибиторов (ЭПИ) не установлен. Нами были проанализированы полученные ранее данные о пространственных структурах M4in и предшественника PLN, а также данные малоуглового рентгеновского рассеяния для комплекса ингибитора с ферментом, осуществлен биоинформатический анализ последовательностей ЭПИ и построена модель комплекса PLN-M4in с использованием метода молекулярного докинга. На основе проведенного анализа была сформулирована гипотеза о том, что ЭПИ работают по неканоническому механизму, при этом ключевым элементом активного центра является остаток Asp70, который хелатирует каталитический цинк фермента, а остатки Phe21 и Ala22 взаимодействуют с субстрат-связывающей областью. Для проверки этой гипотезы в клетках *E. coli* были получены M4in и его модифицированные варианты с заменой Asp70 на Ala (D70A), Ser (D70S), Asn (D70N) и Glu (D70E), а также с заменой Phe21 на Ser (F21S) и Ala22 на Ser (A22S). Рекомбинантные белки были очищены, и их ингибирующая способность по отношению к PLN была охарактеризована с помощью пептидного субстрата с внутренним тушением флуоресценции 2-аминобензоил-Arg-Ser-Val-Ile-Lys(2,4-динитрофенила). Было показано, что модификация Asp70 существенно влияет на активность M4in: константы ингибирования (Ki) для D70A и D70S оказались примерно на два порядка выше (~30 нМ), а для D70E и D70N на порядок выше (~5 нМ), чем для M4in (~0,2 нМ). При этом все варианты с модификацией Asp70 меняли характер ингибирования с медленного связывания на классическое. В случае F21S и A22S значительных изменений Ki не было, а характер ингибирования оставался прежним. Таким образом, полученные данные подтверждают значимость остатка Asp для функционирования ЭПИ и позволяют сделать вывод о том, что для этих белков, по-видимому, характерен ранее не описанный для ингибиторов металлопротеаз молекулярный механизм действия.

ОСТАТОК β V410 FoF1 АТФ-СИНТАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* УЧАСТВУЕТ В LDAO-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТА

С.М. Бруман^{1,2}, Т.Е. Шугаева^{1,2}, А.С. Лапашина^{1,2}, Б.А. Фенюк^{1,2}

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и ²Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

FoF1 АТФ-синтаза – фермент, катализирующий синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата с использованием энергии трансмембранной разности электрохимического потенциала протонов ($\Delta\mu\text{H}^+$). Фермент может работать в обратном направлении и выступать генератором $\Delta\mu\text{H}^+$, используя энергию гидролиза АТФ. Увеличение АТФазной активности может привести к растрате АТФ и гибели клеток. Чтобы этого не происходило, существуют механизмы регуляции АТФазной активности: у бактерий это неконкурентное АДФ-ингибирование, которое происходит при связывании MgАДФ в каталитическом сайте без фосфата, и ингибирование C-концевым доменом субъединицы ϵ , который может взаимодействовать с каталитическим ядром фермента и блокировать гидролиз АТФ. Часто для исследования этих механизмов используют вещества-активаторы, которые ослабляют указанные ингибиторные воздействия и стимулируют гидролиз АТФ. Одним из таких веществ является детергент LDAO. Известно, что он препятствует как АДФ-ингибированию, так и ϵ -ингибированию, однако точный механизм его действия на фермент до сих пор не ясен. Мы провели докинг LDAO в структуры АТФ-синтазы из четырех различных организмов и показали его возможные сайты связывания. Мы также смоделировали поведение LDAO в области каталитического сайта методами молекулярной динамики и выяснили, что LDAO может оказывать небольшой эф-

фект на конформации фрагментов α и β субъединиц (остатки α 370-373, β 327-330) и влиять на конформацию “закрывающей” нуклеотид петли β 405-416. Для проверки предсказаний мы исследовали АТФ-синтазу *Escherichia coli* с заменой β V410Q в упомянутой петле. Замена не оказала значимого эффекта на АТФазную активность фермента в большинстве исследованных условий. Однако в случае мутантного субкомплекса F1 стимулирующий эффект малых концентраций сульфита и LDAO на АТФазную активность был снижен по сравнению с диким типом. Мы предполагаем, что этот результат связан с изменением действия сульфита и LDAO на ϵ -ингибирование. Было также исследовано влияние обратной мутации β Q419V в аналогичной позиции АТФ-синтазы *Bacillus subtilis* на регуляцию активности фермента. Можно заключить, что исследованный остаток участвует во взаимодействии LDAO с ферментом, однако ключевой роли в нем не играет. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 20-14-00268).*

РОЛЬ Min-СИСТЕМЫ В ВОССТАНОВЛЕНИИ СЕГРЕГАЦИИ ДНК И КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ ПО ОКОНЧАНИИ SOS-ОТВЕТА *ESCHERICHIA COLI*

Д.М. Голофеева¹, Н.А. Румянцева¹, М.А. Ходорковский¹, И.Е. Вишняков^{1,2}, А.Д. Ведякин¹

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

Деление – один из ключевых процессов в жизни любой клетки, в том числе бактериальной. В основе деления хорошо изученных бактерий лежит формирование Z-кольца, состоящего из ключевого белка деления FtsZ и нескольких других белков. До сих пор, несмотря на активное изучение, остается значительное количество вопросов, касающихся деления даже такой хорошо изученной бактерии, как *Escherichia coli*. Например, имеются значительные пробелы в понимании того, как осуществляется регуляция работы Z-кольца в таком стрессовом состоянии бактериальной клетки, как SOS-ответ. SOS-ответ считается одним из механизмов приобретения бактериями устойчивости к антибиотикам. Во время SOS-ответа происходит блокирование деления посредством разборки Z-кольца, что позволяет клетке устранить повреждения ДНК без опасности ее повреждения в процессе деления, при этом образуются вытянутые клетки-филаменты, в которых отдельные хромосомы пространственно не разделены. По окончании SOS-ответа бактериальная клетка должна произвести разделение хромосом (или сегрегацию), а также осуществить клеточное деление, чтобы клетка-филамент расщепилась на клетки с нормальной морфологией. Однако точные механизмы, обеспечивающие восстановление сегрегации хромосом и клеточного деления, на настоящий момент неясны. Результаты выполнения данной работы позволяют говорить о том, что именно Min-система играет ключевую роль в восстановлении деления после SOS-ответа, что является не до конца непонятным. Проявление деталей того, как именно Min-система способствует восстановлению деления после SOS-ответа, представляется актуальной задачей, которую планируется решить в ходе дальнейшей работы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00760.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ RALF У МХА *PHYSCOMITRELLA PATENS*

Н.О. Голуб¹, А.С. Мамаева¹, А.Н. Князев¹, В.Н. Лазарев^{2,3}, Д.Д. Харлампиева², И.А. Фесенко¹

¹Лаборатория функциональной геномики и протеомики растений, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва;

³Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный

В последнее время все большее значение приобретают биологически активные пептиды, которые функционируют как сигнальные молекулы в растениях. Примером таких молекул являются группа консервативных 5 кДа пептидов семейства RALF (Rapid Alkalinization Factor), широко представленных у наземных растений и выщепляющихся из неактивного белка-предшественника. Пептиды данной группы влияют на рост корней, корневых волосков и пыльцевых трубок, а также участвуют в ответе растений на биотический стресс. Кроме того, большое количество RALF-генов в геномах большинства цветковых растений усложняет использование нокаутных растений для исследования функций этих пептидов. В частности известно, что у *Arabidopsis thaliana* обнаружено 37 RALF-пептида, у *Arabidopsis halleri* – 25, у *Zea mays* – 20, а у мха *Physcomitrella patens* – всего 3 (Campbell and Turner, 2017). Мы предположили, что RALF-пептиды выполняют сходные функции у высших растений и, кроме всего прочего, связаны с выходом растений на сушу и усложнением их организации. Для проверки этой гипотезы мы получили нокаутные линии по трём RALF-пептидам у мха *Physcomitrella patens* – растения, наиболее близкого к первым наземным растениям, но при этом обладающего хорошо аннотированным геномом. Полученные нокаутные растения характеризовались изменениями в скорости роста протонемы и количестве образующихся гаметофоров. Мы выявили, что одним из наиболее значимых эффектов RALF-пептидов у *Physcomitrella patens* является регуляция размера и формы клеток. Мы показали, что у нокаутов по генам RALF быстрее регенерирует клеточная стенка после её удаления. Вместе с тем, мы провели количественный протеомный анализ полученных нокаутных линий с использованием изотопных меток для относительной и абсолютной квантификации (iTRAQ). Было обнаружено, что у нокаутных линий менялись ферменты углеводного обмена и белки, участвующие в ответе на стрессовые факторы. Кроме того, среди меняющихся белков были обнаружены белки, ассоциированные с клеточной стенкой. Таким образом, ремоделирование строения клеточной стенки является основным механизмом действия RALF-пептидов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-14-01189.

ГИСТОН-ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ ПРИРОДНЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

Е.А. Ермаков^{1,2}, Г.А. Невинский^{1,2}, В.Н. Бунева^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия; ²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждением клетки (damage-associated molecular patterns, DAMPs), такие как ДНК, РНК и гистоны высвобождаются из клеток во время апоптоза и других вариантах клеточной гибели. При избыточном высвобождении DAMPs во внеклеточную среду происходит чрезмерная иммунная активация. При шизофрении обнаружено нарушение апоптотической гибели клеток, что приводит к высвобождению внеклеточной ДНК, а также нуклеопротеинов, включая гистоны, в кровоток. Эти процессы могут приводить не только к воспалительным ответам, но и к образованию аутоантител, в том числе с каталитической активностью. В данной работе изучена способность природных IgG из сыворотки больных шизофренией гидролизовать гистоны (H1, H2a, H2b, H3 и H4). В исследование включены 50 больных шизофренией и 25 здоровых доноров. Выделение IgG из сыворотки крови проводили с помощью аффинной хроматографии на Protein-G-Sepharose. В результате показано, что IgG больных шизофренией эффективно гидролизуют все проанализированные гистоны. Уровень гистон-гидролизующей активности IgG в зависимости от типа гистона оказался статистически значимо в 6–20,1 раз выше, чем у здоровых доноров. Среди всех препаратов IgG от разных пациентов 68% гидролизуют все пять гистонов, 28% гидролизуют от 1-го до 4-х гистонов и 4% не гидролизуют ни одного гистона. Среди препаратов IgG здоровых лиц 25% не гидролизуют ни одного гистона, 56% гидролизуют от 1-го до 4-х гистонов и 19% гидролизуют все пять гистонов. Но важно отметить, что уровень гидролиза гистонов антителами здоровых доноров оказался значительно ниже, чем у пациентов. При этом IgG не гидролизуют другие протестированные белки. Исследованные биохимические свойства (зависимость от pH и ионов металлов, кинетические характеристики) этих природных каталитических IgG заметно отличались от свойств канонических протеаз. Можно полагать, что гистон-гидролизующие IgG могут играть протективную роль, поскольку удаление внеклеточных гистонов снижает воспалительные реакции, а уровень активности может отражать степень иммунных нарушений при шизофрении и использоваться как биомаркер заболевания.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-015-00156, проектом ПФНИ РФ (2021-2030) 0245-2021-0009 № 121031300041-4 и стипендией Президента РФ (СП-2258.2019.4).

НОКАУТ ГЕНА IFITM3 ПРИВОДИТ К ПОВЫШЕНИЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК WI-38 VA13 К ЗАРАЖЕНИЮ ВИРУСОМ ГРИППА А

Н.В. Ещенко¹, М.В. Сергеева², К.С. Корябина², Е.С. Журавлев¹, А.Б. Комиссаров², Г.А. Степанов¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург

Для регуляции чувствительности и продуктивности клеток человеческого происхождения по отношению к инфекции вирусом гриппа одним из подходов может быть направленное изменение уровня экспрессии генов врожденного иммунного ответа. Перспективной мишенью является ген IFITM3, продукт которого препятствует проникновению вируса в клетки человека. В нашей работе на основе клеток WI-38 VA13 с применением системы CRISPR/Cas9 были получены жизнеспособные моноклональные клеточные линии с нокаутом гена IFITM3. Анализ транскриптома полученных клеточных линий, показал, что протяженные инсерции и делеции, приводящие к нокауту гена IFITM3, могут приводить к сопряженному снижению экспрессии других генов семейства IFITM, а именно генов IFITM2 и IFITM1. Параллельно со снижением активности генов IFITM были выявлены нарушения в активации каскада Jak-STAT, что приводило к изменениям регуляции процессов врожденного иммунного ответа и формирования внеклеточного матрикса. Анализ количества зараженных клеток методом проточной цитофлуориметрии с окрашиванием антителами против вирусного белка NP показал увеличение чувствительности клеток с нокаутом гена IFITM3 к инфекции вирусами гриппа A/California/07/2009 (H1N1pdm09) и A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2). Наибольшей чувствительностью обладали клетки с сопряженным нарушением экспрессии трех генов IFITM1, IFITM2, IFITM3, что подтверждает их критически важную роль в регуляции устойчивости клеток к вирусу гриппа.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №18-75-10069.

РАЗРАБОТКА ДНК-КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ДНК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПОСРЕДСТВОМ ОПТИЧЕСКОГО ПИНЦЕТА

Е.А. Знобищева, Н.Е. Морозова, А.А. Алексеев, Г.Е. Побегалов, М.А. Ходорковский

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Для лучшего понимания механизмов функционирования белков важно изучать ДНК-белковые взаимодействия. Для таких задач отлично подходят методы, позволяющие визуализировать и изучать одиночные молекулы ДНК и ДНК-белковые комплексы. Одним из таких методов, который и используется в данной работе, является оптический пинцет. В данной работе разработан протокол подготовки ДНК для проведения экспериментов по изучению ДНК-белковых взаимодействий методом оптического захвата. Как правило, в экспериментах на оптическом пинцете производится захват микросфер, покрытых стрептавидином и последующее прикрепление к ним молекулы ДНК, имеющей на концах биотин. За счет биотин-стрептавидиновых связей образуется комплекс, который в дальнейшем используется в работе. Для визуализации ДНК-белковых взаимодействий чаще всего используются белки слияния (белки интереса слиты с флуоресцентными белками). Такие белки часто неспецифически связываются с микросферами, что приводит к нежелательному засвечиванию. Во избежание этой проблемы используется более длинная ДНК, полученная путем модификации ДНК бактериофага λ. Помимо этого, некоторые исследуемые белки связываются с одноцепочечным субстратом ДНК. Для получения одонитевой ДНК применяется метод силового плавления ДНК, заключающийся в механическом перерастяжении двуниевой молекулы ДНК с силой более 80 пН. Для реализации данного метода получения одонитевой ДНК, необходимо модифицировать биотином

5'- и 3'-концы одной и той же цепи ДНК. На высоких значениях силы, между нитями ДНК происходит разрыв комплементарных водородных связей. Ввиду модификации биотином 5'- и 3'- концев одной и той же цепи ДНК, вторая нить удаляется в ходе плавления посредством диффузии. Полученная в данной работе конструкция применена для экспериментов по характеристике взаимодействия белков бактериального SOS-ответа с ДНК.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ АТФАЗНОЙ АКТИВНОСТИ FOF1-АТФ-СИНТАЗЫ *BACILLUS SUBTILIS*

В.М. Зубарева^{1,2}, Д.О. Третьяков¹, А.С. Лапашина^{1,2}, Б.А. Фенюк^{1,2}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

FOF1-АТФ-синтаза — важнейший фермент, катализирующий синтез АТФ за счет энергии трансмембранной разности электрохимического потенциала протонов. Также он может гидролизовать АТФ, генерируя разность потенциалов на мембране. АТФазная активность фермента подвержена неконкурентному ингибированию комплексом MgАДФ, а также может ингибироваться С-концом субъединицы ϵ . Взаимодействие двух типов ингибирования точно не установлено: часть авторов считает, что С-концевой домен ϵ -субъединицы противодействует АДФ-ингибированию и повышает АТФазную активность фермента, другие, напротив, предполагают, что оба типа ингибирования поддерживают друг друга. Целью работы было изучение взаимодействия ϵ -ингибирования и АДФ-ингибирования в АТФ-синтазе *Bacillus subtilis*. Для этого было проведено сравнение ферментов 4 штаммов: дикого типа, с делецией С-концевого домена субъединицы ϵ ($\epsilon\Delta C$), с точечной заменой $\beta Q259L$, которая, как известно, ослабляет АДФ-ингибирование, и двойного мутанта $\beta Q259L+\epsilon\Delta C$. Сравнение проводилось на инвертированных суббактериальных частицах (СБЧ). Как и ожидалось, добавление АДФ подавляло АТФазную активность СБЧ штамма $\beta Q259L$ слабее, чем в диком типе. Мутация $\epsilon\Delta C$ сама по себе не привела к снижению ингибиторного эффекта АДФ. Замена $\beta Q259L$, как и ожидалось, привела к меньшей чувствительности фермента к АДФ. На фоне данной мутации наблюдался эффект С-концевого домена субъединицы ϵ : СБЧ двойного мутанта оказались наименее чувствительны к добавлению АДФ. Сульфит, препятствующий MgАДФ-ингибированию, стимулировал АТФазную активность СБЧ дикого типа и $\epsilon\Delta C$ в равной степени (до 6-7 раз). В то же время, активность СБЧ штамма $\beta Q259L$ в тех же условиях стимулировалась сульфитом менее чем вдвое, как и предполагалось в случае ослабленного АДФ-ингибирования. Наконец, АТФазная активность СБЧ двойного мутанта $\beta Q259L+\epsilon\Delta C$ практически не менялась при добавлении сульфита. Эти данные согласуются с гипотезой, что С-концевой домен субъединицы ϵ поддерживает АДФ-ингибирование.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 20-14-00268).

ПОИСК ПАРТНЁРОВ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ, ОТВЕЧАЮЩЕЙ ЗА МЕТИЛИРОВАНИЕ G72 В мЯРНК U6

А.Р. Иззи¹, С.С. Марьясина², О.А. Донцова^{3,4}, В.Г. Згода⁵, П.В. Сергиев^{2,3,4}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, ²Институт функциональной геномики, ³Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁴Сколковский институт науки и технологий; ⁵НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

В живых системах множество биомолекул подвергается различным модификациям. Одной из самых распространённых модификаций является метилирование, которое осуществляется метилтрансферазами (МТазы). Данной модификации подвергаются ДНК, белки, малые молекулы, и в особенности РНК. Большое количество пост-транскрипционных модификаций имеется в мЯРНК – молекулах РНК, входящих в состав сплайсосомы и отвечающих за протекание сплайсинга. Сплайсинг – процесс, представляющий собой один из этапов процессинга мРНК, в ходе которого происходит вырезание некодирующих частей (интронов) и последующее сшивание кодирующих последовательностей (экзонов).

В состав сплайсосомы входит шесть молекул мЯРНК. Настоящая работа посвящена изучению МТазы, отвечающей за метилирование нуклеотида G72 в мЯРНК U6. В ходе поиска белковых партнёров с помощью ко-иммунопреципитации с масс-спектрометрической детекцией методом MALDI удалось выяснить, что изучаемая МТаза совыделяется с небольшим белком TRMT112. Белок TRMT112 является ко-фактором многих эукариотических МТаз. Из литературы известно, что во многих случаях TRMT112 необходим для стабильности МТаз или правильного узнавания ими субстратов. Ряд заболеваний человека, среди которых, например, кардиомиопатия и синдром Роджерса, ассоциированы с мутациями гена TRMT112.

Совыделение изучаемой нами МТазы с TRMT112 подтвердили методом вестерн-блоттинга. Также этот белок воспроизводимо обнаруживался при анализе результатов ко-иммунопреципитации методами панорамной протеомики.

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ТРИПЕПТИДОВ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У МЫШЕЙ

А.Р. Ильина¹, Н.А. Красковская², Н.С. Линькова¹, Р.С. Умнов¹, В.Х. Хавинсон^{1,3}

¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; ³Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Нарушение синаптической пластичности и элиминация дендритных шипиков нейронов гиппокампа лежат в основе молекулярно-клеточных механизмов когнитивной дисфункции при болезни Альцгеймера (БА). Ультракороткие пептиды KED (Lys-Glu-Asp) и EDR (Glu-Asp-Arg) препятствовали элиминации дендритных шипиков в модели амилоидной синапсотоксичности *in vitro*. Цель исследования – оценка нейропротекторных эффектов трипептидов в модели БА *in vivo*. Нейропротекторные эффекты трипептидов оценивали по их влиянию на синаптическую пластичность и количество дендритных шипиков нейронов гиппокампа мышей линий 5xFAD и 5xFAD-M, соответственно. В нейронах головного мозга мышей новой созданной нами линии 5xFAD-M в отличие от мышей линии 5xFAD экспрессируется зеленый флуоресцентный белок, что упрощает анализ морфологии нейронов. Синаптическую пластичность в гиппокампе мышей линии 5xFAD изучали электрофизиологическим методом регистрации возбуждающих постсинаптических потенциалов с дальнейшей оценкой долговременной

потенциации как физиологической основы нейропластичности. Морфологию дендритных шипиков нейронов гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M оценивали на фиксированных срезах мозга с использованием конфокальной микроскопии. При ежедневном внутрибрюшинном введении пептида KED в дозировке 400 мкг/кг в возрасте с 2 до 4 месяцев у мышей линии 5xFAD наблюдали тенденцию к восстановлению нейропластичности до уровня мышей дикого типа. Пептиды EDR и KED предотвращали потерю дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа у мышей линии 5xFAD-M в возрасте 5 месяцев. При введении пептида KED самцам линии 5xFAD-M наблюдали более выраженное увеличение количества дендритных шипиков по сравнению с самками, что обусловлено исходно более выраженной синаптической патологией у мышей-самцов. Полученные данные позволяют рассматривать ультракороткий пептид KED в качестве потенциального нейропротекторного средства для применения на ранней стадии БА.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМИЛОИДОГЕННЫХ БЕЛКОВ С ШАПЕРОНАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ РАЗНЫХ ГРУПП ОРГАНИЗМОВ

С.С. Кудрявцева¹, Л.П. Курочкина², Ю.Ю. Стройлова², В.И. Муронец^{1,2}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Как известно, самопроизвольная укладка полипептидной цепи в присущую ей вторичную и третичную структуру является медленным и малоэффективным процессом. Поэтому в клетке существует особый класс белков – молекулярные шапероны, которые увеличивают скорость и эффективность сворачивания биомолекул и предотвращают их агрегацию. Надлежащая работа системы шаперонов является ключом к правильному функционированию многих клеточных систем, которые подвергаются воздействию различных стрессовых факторов. В природе существует ряд тяжёлых заболеваний, причиной которых является накопление белковых агрегатов в нервной ткани, например, болезни Паркинсона, Хантингтона, прионные заболевания и другие. Такие агрегаты образуются из белков, утративших свою нативную конформацию (неправильно свёрнутых белков), и, следовательно, функцию. Структурные изменения могут быть опосредованы закислением среды, окислительным стрессом или внесением посттрансляционных модификаций. При этом клеточная система шаперонов получает сигнал тревоги и начинает взаимодействовать с неправильно свёрнутыми белками и их агрегатами [1]. Однако результат взаимодействия шаперонов с амилоидогенными белками, склонными к агрегации, в настоящее время до конца не изучен и может носить двойственный характер [2]. Таким образом, целью нашей работы было изучить влияние амилоидогенных белков, таких как прионный белок и альфа-синуклеин на работу шаперонов, выделенных из разных групп организмов: бактерий, эукариотов и вирусов. В своей работе мы планируем использовать такие методы как шаперон-зависимая реактивация фермента (ГАФД или эндолизина) в присутствии разных форм амилоидогенных белков (мономеров, олигомеров, фибрилл), динамическое лазерное светорассеяние, флуоресценция тиаофлавина Т, электронная и криоэлектронная микроскопия. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90051).

1. Saibil H. (2000) Molecular chaperones: Containers and surfaces for folding, stabilising or unfolding proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10, 251–258
2. Stroylova Y.Y., Kiselev G.G., Schmalhausen E.V., Muronetz V.I. (2014) Prions and chaperones: Friends or foes? *Biochemistry (Moscow)*, 79 (8), 761-775.

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ ДИФФУЗИЯ И БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФИБРИНОГЕНА: ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ И pH

А.М. Кусова, А.Э. Ситницкий, Ю.Ф. Зуев

Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН, Казань

Оценка белок-белковых взаимодействий в разбавленных и концентрированных растворах важна для понимания биологических процессов *in vivo* и *in vitro*. В настоящей работе мы сосредоточили наибольшее внимание на белок-белковых взаимодействиях в растворах фибриногена (Fg), которые играют фундаментальную роль в процессах свертывания крови, тромбоцитоза и заживления ран. Несмотря на то, что взаимодействия Fg с другими белками и рецепторами плазмы играют важную роль при гемостазе, тромбозе и других процессах, мы делаем акцент на взаимодействиях Fg-Fg из-за их участия в процессе фибрилляции и высокой естественной концентрации Fg в плазме (2-4 г/л). Недавно нами был предложен комплексный подход для изучения диффузионной подвижности и слабых межмолекулярных взаимодействий белковых молекул в широком диапазоне концентраций. В данной работе само- и коллективная (взаимная) диффузия Fg изучались с помощью методов ядерного магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП) и динамического рассеяния света (ДРС). Теоретическое описание экспериментальных данных основывалось на формализме трения неравновесной термодинамики и теории потенциала средней силы. Многоступенчатый подход получил дальнейшее развитие для определения длинно- и короткодействующих неспецифических взаимодействий палочковидного Fg с учетом влияния ионной силы и pH окружающего раствора. Наше исследование показывает, что варьирование параметров растворителя обеспечивает простой и надежный способ модулировать межмолекулярные взаимодействия Fg, влияя на процесс фибрилляции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-00157.

ЗАМЕНА β Q263L ОСЛАБЛЯЕТ АДФ-ИНГИБИРОВАНИЕ АТФАЗНОЙ АКТИВНОСТИ АТФ-СИНТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ И ПОВЫШАЕТ СКОРОСТЬ РОСТА КЛЕТОК БЕЗ МТДНК

А.С. Лапашина^{1,2}, Н.Д. Кашко^{1,2}, В.М. Зубарева^{1,2}, К.В. Галкина^{1,2}, О.В. Маркова¹, Д.А. Кнорре^{1,2}, Б.А. Фенюк^{1,2}

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и ²Факультет биоинженерии и биоинформатики,

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Митохондриальная АТФ-синтаза (FOF1) катализирует синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет протондвижущей силы (pmf) на внутренней мембране митохондрий. При снижении pmf фермент может генерировать ее самостоятельно, работая в обратном направлении и гидролизую АТФ. АТФазная активность АТФ-синтазы тонко регулируется: она может, с одной стороны, истощить запасы АТФ в клетке, с другой – требоваться для поддержания pmf на мембране митохондрий при инактивации дыхательной цепи (например, при гипоксии). Для всех FOF1 описано неконкурентное ингибирование АТФазной активности комплексом MgАДФ (АДФ-ингибирование). Ранее мы показали, что у бактерий выраженность и свойства АДФ-ингибирования в заметной степени определяются единичным аминокислотным остатком субъединицы β . Замена лейцина на глутамин в позиции β 249 в АТФ-синтазе *E. coli* значительно усилила АДФ-ингибирование, а обратная замена в той же позиции (β Q259L) у *Bacillus subtilis*, напротив, приводила к его ослаблению. У митохондриальных ферментов (в т.ч. у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*), как и у *B. subtilis*, в этой позиции (β 263) находится остаток глутамина. В настоящей работе был получен штамм *S. cerevisiae* с заменой β Q263L. Сравнение АТФазных активностей пермебилизированных аламетицином митохондрий и субмитохондриальных частиц, полученных из родительского и мутантного штаммов дрожжей, показало, что замена β Q263L снизила чувствительность АТФ-синтазы к АДФ, азиду (ингибитору, блокирующему фермент в состоянии АДФ-ингибирования) и LDAO – веществу, которое, напротив, препятствует АДФ-ингибированию и стимулирует гидролиз АТФ. Это позволяет заключить, что замена β Q263L ослабила АДФ-ингибирование. Скорость роста клеток дрожжей с заменой β Q263L в сравнении с родительским штаммом оказалась снижена. Однако удаление мтДНК (мутация rho0) из обоих штаммов изменило картину: скорость роста штамма β Q263L rho0 была выше, чем скорость роста контрольного rho0 штамма. Мы предполагаем, что замена β Q263L, ослабляющая АДФ-ингибирование АТФазной активности АТФ-синтазы, оказывается выгодной для клеток без мтДНК, которым, вероятно, высокая скорость гидролиза АТФ в матриксе митохондрий нужна для поддержания pmf на мембране за счет АТФ/АДФ-антипортера.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 20-14-00268).

ИЗУЧЕНИЕ НУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКА-АРГОНАВТА ИЗ МЕЗОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *DOREA LONGICATENA*

Л.А. Лисицкая, Е.В. Кропачева, Д.М. Есюнина, А.В. Кульбачинский

Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Белки-Аргонавты играют ведущую роль в процессах РНК-интерференции у эукариот. Они способны связывать малые РНК и, взаимодействуя с комплементарной РНК-мишенью, координировать последующие события сайленсинга генов совместно с другими белковыми факторами. У прокариот доменная организация белков-Аргонавтов и спектр их специфичности разнообразней. При этом механизмы их работы и функции в клетках бактерий и архей ещё мало изучены. Данная работа посвящена изучению нуклеазной активности белка-Аргонавта из мезофильной бактерии *Dorea longicatena* (DloAgo) на однонитевых и двунитевых ДНК- или РНК-субстратах *in vitro*. Определено, что DloAgo связывает короткие ДНК-гиды, содержащие фосфат на 5'-конце, и расщепляет комплементарные ДНК-мишени. DloAgo проявляет нуклеазную активность в присутствии ионов Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} в широком диапазоне температур от 18 до 60 °С. Длина предпочитаемых гидовых молекул варьирует от 16 до 22 нуклеотидов. Изучено влияние мисматчей между гидовой ДНК и мишенью на эффективность разрезания мишени и выявлены участки гидовых молекул (центральный и дополнительный), в наибольшей степени влияющие на специфичность узнавания мишеней. Для связывания ДНК-мишени без её расщепления получен мутантный вариант DloAgo с заменами двух аминокислотных остатков в активном центре, не обладающий каталитической активностью. Показано, что в присутствии двух пар гидов из плазмидной ДНК DloAgo может вырезать соответствующий фрагмент, выявлены оптимальные условия для программируемого вырезания данного фрагмента. Направленная нагрузка белков-Аргонавтов гидовыми молекулами ДНК для распознавания и расщепления комплементарных мишеней потенциально может быть использована в различных областях генетической инженерии. Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 18-29-07086).

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЦИНКА Zn^{2+} НА СТРУКТУРУ И АКТИВНОСТЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА ТОЛЛ-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 1

В. Лушпа^{1,2}, М. Гончарук², Ц. Лин³, И. Талызина^{2,4}, А. Лугинина¹, Д. Вахрамеев¹, М. Шевцов¹, С. Гончарук^{1,2},

А. Арсеньев², В. Борщевский^{1,5,6}, Х. Ванг^{3,7}, К. Минеев^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный;

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ³Чанчуньский институт при-

кладной химии, Чанчунь, Китай; ⁴Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва; ⁵Институт

обработки биологической информации, Юлих, Германия; ⁶Центр структурной биологии Юлиха, Юлих, Германия;

⁷Кафедра прикладной химии и инженерии, Научно-технический университет Китая, Хэфэй, Китай

Семейство Толл-подобных рецепторов (ТЛР) относится к первому типу мембранных белков. ТЛР играют решающую роль в врожденном иммунитете в качестве первой линии защиты хозяина. Медицинское и биологическое значение передачи сигналов ТЛР очевидно, поскольку нарушение регуляции системы ТЛР вызывает различные аутоиммунные заболевания и септический шок. Также появились терапевтические стратегии, направленные на регуляцию работы ТЛР. Несмотря на то, что общая схема работы рецепторов ТЛР известна и даже есть данные о структурах отдельных фрагментов для некоторых белков этого семейства, детальный механизм функционирования рецептора остается неясным. В работе представлены результаты исследований структуры и динамики цитоплазматического домена (ЦПД) ТЛР1 в кристалле и в растворе. Работа

демонстрирует данные о специфическом связывании ЦПД TLR1 с ионами цинка с наномолярным сродством. Показано, что взаимодействие с Zn^{2+} опосредовано остатками цистеина 667 и 686, а для связывания Zn требуется С667. Используя функциональные тесты для гетеродимерной связки ЦПД TLR1/2, было показано влияние добавления и источника Zn на ЦПД TLR1. Была показана активность TLR1, а также была показана ключевая роль цистеина 667: мутация С667А нарушает активность рецептора. Анализ данных, представленных в работе, предполагает, что способность ЦПД TLR1 связывать цинк имеет решающее значение для активации рецептора. *Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№203470024, ЯМР-анализ), Национального фонда естественных наук Китая (21877106, 21807098), программой «Пионерская сотня талантов» (CAS) и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075 003372003, проект FSMG 20200003, Рентгеновская кристаллография).*

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ КОРОТКИХ СЕКРЕТИРУЕМЫХ ПЕПТИДОВ В ИММУННОМ СИГНАЛИНГЕ РАСТЕНИЙ И.С. Ляпина¹, С.И. Ковальчук¹, Р.Х. Зиганшин¹, А.С. Мамаева¹, В.Н. Лазарев², И.А. Лацис², В.Т. Иванов¹, И.А. Фесенко¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

В процессе эволюции у растений появилась сложная система врожденного иммунитета, способная противостоять большому числу патогенов. Ее основой служат рецептор-подобные киназы (РПК), способные узнавать широкий спектр лигандов, включая пептиды – фрагменты белков как патогенов, так и самого растения. Пептидные лиганды участвуют как в детекции патогена, так и в тонкой настройке иммунного ответа, обеспечивая компромисс между процессами роста и стрессовым ответом. Короткие секретлируемые пептиды – SSP – были найдены у многих видов покрытосеменных. Значительная часть известных SSP участвует в иммунном ответе, выполняя в том числе регуляторную и антимикробную функции. Система пептидного иммунного сигналинга не обнаружена у зеленых водорослей, что поднимает вопрос о ее появлении в процессе выхода растений на сушу. Для изучения эволюции иммунного пептидного сигналинга у растений мы впервые проанализировали геномы представителей Бриофитов на наличие генов различных групп SSP. В нашей работе мы обнаружили ранее не аннотированные кандидаты известных SSP в геномах бриофитов, которые показывали высокую степень консервативности при сравнении с покрытосеменными, а также содержали ключевые для функциональности аминокислотные мотивы. Мы также выполнили поиск компонентов сигнального пути одного из хорошо изученных SSP – plant elicitor peptide (PEP) в геномах бриофитов. Нам не удалось обнаружить ген-прекурсор данного пептида, однако мы идентифицировали гомологи его рецептора – PEPR1 в геноме мха *Physcomitrella patens*. Предположив, что отдаленные ортологи данного типа иммунных пептидов все же присутствуют у мха, мы обработали клетки мха синтетическими PEP из *Arabidopsis thaliana* и *Solanum tuberosum*. Мы обнаружили накопление молекул АФК в клетках мха при обработке PEP, что указывает на возможное связывание с РПК на поверхности клеток. Мы также обнаружили ключевые для связывания PEP аминокислоты у предполагаемых гомологов рецептора PEPR в геноме мха, что может предполагать схожую функцию этих РПК в регуляции иммунного ответа неизвестными пептидными лигандами. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-14-01189.*

СКРИНИНГОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИДЕПРЕССИВНЫХ ЭФФЕКТОВ ДИПЕПТИДНЫХ МИМЕТИКОВ NGF И BDNF А.Г. Межлумян, А.В. Таллерова, Н.М. Сазонова, Т.А. Гудашева

НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова были сконструированы и синтезированы дипептидные миметики отдельных петель NGF (1-й петли ГК 6 и 4-й петли ГК 2) и BDNF (1-й петли ГСБ-214, 2-й петли ГТС-201 и 4-й петли ГСБ-106). Установлено, что ГК-2 [Середин С.Б., Гудашева Т.А., 2015] и ГСБ-214 [Гудашева Т.А. и др., 2015] активируют PI3K/AKT и PLC-gamma, а ГТС 201 [Гудашева Т.А. и др., 2017] – MAPK/ERK и PLC-gamma. ГК-6 [Gudasheva et al., 2015] а также ГСБ-106 [Гудашева Т.А. и др., 2015] активируют все три сигнальных каскада. Цель исследования – анализ антидепрессивных эффектов миметиков разных петель NGF и BDNF при субхроническом введении. Исследование выполнено на мышцах-самцах BALB/c массой 18-20 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных «Столбовая». В качестве препарата сравнения был использован амитриптилин. Группе контроля вводили физ. раствор. Антидепрессивную активность миметиков оценивали в тесте вынужденного плавания [San A. et al., 2012]. Миметики, амитриптилин и физ. р-р вводили ежедневно в одно и то же время на протяжении пяти дней. Спустя 24 ч после последней инъекции, проводили первую сессию плавания продолжительностью 10 мин, а еще через 24 ч – вторую пятиминутную сессию плавания с регистрацией поведения животных. Межгрупповые различия оценивали с использованием критерия Краскела-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Амитриптилин (10,0 мг/кг) достоверно снижал время иммобильности мышей по сравнению с интактным контролем на 16%. Миметики NGF в исследуемых дозах статистически значимо снижали время иммобильности по сравнению с интактным контролем: ГК-2 (1,0 мг/кг) на 10%, ГК 6 (2,0 мг/кг) на 15%. Миметик 4-й петли BDNF ГСБ-106 (1,0 мг/кг) снижал время иммобильности на 16%, что совпадало с ранее полученными результатами [Tallerova A.V. et al., 2020]. Миметик 1-й петли BDNF ГСБ-214 (1,0 мг/кг) снижал время иммобильности на 18% ($p < 0.01$). Миметик 2-й петли BDNF ГТС-201 (в диапазоне доз от 0,1 до 5,0 мг/кг) не оказывал статистически значимого влияния на время иммобильности. Таким образом, при субхроническом введении установлены антидепрессивные свойства миметиков NGF ГК-2 и ГК-6 и миметиков BDNF ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №18-15-00381).*

ОЦЕНКА ВКЛАДА АКТИВАЦИИ TRKB РЕЦЕПТОРА И АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В АНТИДЕПРЕССАНТ-ПОДОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИПЕПТИДНОГО МИМЕТИКА МОЗГОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГСБ-106

А.Г. Межлумян, А.В. Тарасюк, Н.М. Сазонова, Т.А. Гудашева

НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова был сконструирован и синтезирован дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора (BDNF) ГСБ-106 [Гудашева Т.А. и др., 2012]. В экспериментах *in vitro* установлено, что ГСБ-106 активирует TrkB и ассоциированные сигнальные каскады MAPK/ERK, PI3K/AKT и PLC γ [Гудашева Т.А. и др., 2015]. Цель данного исследования – оценить зависимость антидепрессант-подобного действия миметика от активации TrkB и его сигнальных путей с использованием метода фармакологического ингибиторного анализа. Исследование выполнено на мышцах-самцах BALB/c массой 18–20 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных «Столбовая». В качестве препарата сравнения был использован амитриптилин. В качестве блокатора TrkB использовали соединение K252A, ингибитора PLC γ – соединение U73122, ингибитора PI3K – LY294002, ингибитора MEK1/2 – PD98059 (Sigma-Aldrich). Антидепрессивную активность оценивали в тесте вынужденного плавания [Can A. et al., 2012]. Ингибиторы вводили за 30 мин до ГСБ-106 или амитриптилина. Статистическую обработку результатов проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA, тест Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. ГСБ-106 и амитриптилин оказывали статистически значимое антидепрессивное действие, снижая время иммобильности мышцей по сравнению с контрольной группой. Сами ингибиторы в выбранных дозах на время иммобильности не влияли. На фоне введения блокатора TrkB и ингибиторов MEK1/2, PI3K и PLC γ антидепрессивное действие как ГСБ 106, так и амитриптилина полностью устранялось. Таким образом, для проявления антидепрессант-подобной активности ГСБ-106 и амитриптилина необходима активация TrkB и трех основных пострецепторных сигнальных путей. Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №18-15-00381).

ПЕПТИДЫ РЕГУЛИРУЮТ ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И МИТОГЕННЫЕ СИГНАЛЫ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК МОНОЦИТОВ/МАКРОФАГОВ ЛИНИИ THP-1

Е.С. Миронова¹, В.Х. Хавинсон^{1,2}

¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии; ²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Клетки THP-1 (острый моноцитарный лейкоз) используются как модельная система для изучения регуляции дифференцировки моноцитов в макрофаги в условиях *in vitro*. Цель работы – изучение пролиферативных и митогенных сигналов THP-1 в условиях *in vitro* при воздействии ультракоротких пептидов EDG (Glu-Asp-Gly) и AEDG (Ala-Glu-Asp-Gly). Материалы и методы. Индукцию дифференцировки клеток THP-1 в макрофаги производили с добавлением форбол-12-миристан-13-ацетата (PMA) в концентрации 50–100 нг/мл. Макрофагальные клетки были разделены на 3 группы: 1 – добавление EDG (100 нг/мл), 2 – добавление AEDG (100 нг/мл), 3 – добавление натрий-фосфатного буфера (контроль). Проведен цитофлуориметрический анализ количества везикул в дифференцированных клетках THP-1 при воздействии на них пептидов. Выполнен вестерн-блот анализ синтеза белка Phospho-ERK 1/2 и Phospho-JNK киназы в клетках макрофагального фенотипа после воздействия пептидов. Результаты исследования. Пул экзосомных пузырьков и их концентрация повышалась при добавлении пептидов EDG, AEDG в 1,67; 2,05 раза, соответственно, по сравнению с контролем. Пептиды увеличивают способность транспортной функции и пролиферативной активности макрофаго-подобных клеток, повышая количество экзосом. Синтез белка Phospho-ERK 1/2 при добавлении пептидов EDG, AEDG увеличился в 21,84; 8,01 раза, а синтез белка Phospho-JNK – в 7,68 и 12,44 раза, соответственно, по сравнению с контролем. Таким образом, пептиды стимулируют митогенные пути клеток макрофагального фенотипа, способствуя активации (фосфорилированию) цитоплазматических киназ ERK 1/2 и JNK, которые играют ключевую роль в механизме их пролиферации. Заключение. Установлено, что ультракороткие пептиды EDG и AEDG способны увеличивать межклеточную коммуникацию, секрецию белков, стимулировать пролиферацию и деление клеток макрофагального фенотипа посредством увеличения концентрации экзосом. Кроме того, обнаружена способность этих пептидов активировать ERK 1/2 и JNK киназы, которые участвуют в буферизации токсического эффекта клеточного стресса, вызванного свободными радикалами. Таким образом, пептиды EDG и AEDG способствуют повышению антиоксидантной активности клеток линии THP-1, преддифференцированных в макрофаги.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ТЕРАПИИ НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b В КЛЕТКАХ РАКА ЯИЧНИКА

А.К. Нургалиева¹, В.С. Скрипова¹, Л.Ф. Булатова¹, В.Е. Попов¹, Д.В. Савенкова¹, С.З. Сафина², Э.Ж. Шакирова², Р.Г. Киямова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет; ²Республиканский клинический онкологический диспансер, Казань

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b – это мембранный белок, который кодируется геном SLC34A2 и сверхэкспрессируется при раке яичника (РЯ) и других видах рака, таких как рак щитовидной железы, легкого, молочной железы и другие. В настоящее время конъюгированные с ауристатином F (AF-NPA) терапевтические моноклональные антитела ХМТ-1536 и ХМТ-1592, направленные против NaPi2b, успешно проходят клинические испытания для лечения РЯ и немелкоклеточного рака легкого. В данной работе мы стремились оценить NaPi2b в качестве молекулярного маркера для диагностики и прогнозирования течения и исхода заболевания РЯ. Анализ экспрессии гена SLC34A2 в опухолях яичника проводили с помощью ПЦР в реальном времени, цифровой капельной ПЦР и Вестерн-блоттинга. Статистический анализ проводили с учетом клинико-патологических характеристик, таких как степень злокачественности заболевания, стадия заболевания, наличие асцита, выживаемость и наличие неоадъювантной терапии, которая преимущественно проводилась по схе-

ме ТСб (паклитаксел, карбоплатин). Мы не обнаружили различия в экспрессии NaPi2b в опухолях с учетом степени злокачественности заболевания, выживаемости и наличия асцита у пациентов с РЯ. Выявлена тенденция к снижению экспрессии гена транспортера NaPi2b с увеличением стадии заболевания, что может быть связано с уменьшением степени дифференцировки опухолевых клеток на более поздних стадиях. Был выявлен интересный факт, что экспрессия транспортера NaPi2b снижается в опухолях пациентов, получавших неoadъювантную терапию. Полученные данные свидетельствуют, что пациенты с РЯ, которые получали неoadъювантную терапию, могут быть нечувствительны к таргетным препаратам, направленным против транспортера NaPi2b. Таким образом, показано, что уровень экспрессии гена транспортера NaPi2b может служить потенциальным маркером для дифференциальной диагностики РЯ и мониторинга применения неoadъювантной и таргетной терапии у пациентов с РЯ. *Работа выполнена в рамках программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета, при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00166) и за счет средств субсидии, выделенной Казанскому Федеральному Университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.*

РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК uS3 – УЧАСТНИК ПРОЦЕССА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА мРНК

А.С. Очкасова, М.И. Мещанинова, А.Г. Веньямина, Д.М. Грайфер, Г.Г. Карпова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

В последнее время ряд нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона, связывают с накоплением в мРНК специфических повреждений – апуринов/апириимидиновых (АР) сайтов – нуклеотидных звеньев, лишенных азотистого основания. Встречаясь с такими повреждениями в процессе трансляции, рибосомы останавливаются, в результате чего образуются укороченные «недосинтезированные» пептиды, которые могут неправильно сворачиваться и агрегировать друг с другом, образуя нерастворимые белковые структуры, характерные для амилоидных бляшек, образующихся при упомянутых заболеваниях. При нарушениях в процессах контроля качества мРНК и синтезированных пептидов в клетке укороченные пептиды накапливаются. Данных о молекулярных механизмах остановки трансляции на АР-сайте в мРНК практически нет. Мы показали, что остановка опосредована взаимодействием АР-сайта с рибосомным белком uS3 40S субчастицы. Недавно нами было показано, что АР-сайт на 3'-конце аналога мРНК может сшиваться с uS3 через остаток K62 в упрощенных модельных комплексах 80S рибосом человека, где 3'-концевой фрагмент аналога находится перед участком входа мРНК в рибосому. В настоящей работе с использованием набора синтетических мРНК, несущих АР-сайт в заданных положениях и бесклеточной белоксинтезирующей системы из ретикулоцитов кролика мы показали, что АР-сайты действительно сшиваются с uS3 в процессе трансляции. При этом сшивка происходит, как только АР-сайт в процессе трансляции оказывается в благоприятном положении относительно белка uS3, независимо от его положения в цепи мРНК. Таким образом, белок инспектирует качество движущейся мимо него в процессе трансляции мРНК, и при обнаружении АР-сайта сшивается с ним, что неизбежно приведет к остановке трансляции. Получившийся в результате комплекс с «застрявшей» мРНК автоматически станет мишенью для пути no-go decay, предназначенного в клетке для разборки подобных рибосомных комплексов и последующей деградации поврежденной мРНК. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00098 и частично государственного бюджета (проект АААА-А17-117020210022-4).*

ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССА НОНСЕНС-ОПОСРЕДОВАННОЙ ДЕГРАДАЦИИ РНК (NMD) НА ТРАНСКРИПЦИЮ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК У РАСТЕНИЙ

Е.А. Петров^{1,2}, И.А. Фесенко², А.Н. Князев²

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Эукариотическая система нонсенс-опосредованной деградации мРНК (nonsense-mediated mRNA decay) контролирует качество мРНК, деградируя абберантные транскрипты, содержащие преждевременный стоп кодон (premature stop codons, PTC). Более того, до 10% транскриптов в клетке могут регулироваться системой NMD, позволяя клетке тонко подстраивать экспрессию генов под внешние воздействия. При этом, мало известно о регуляции системой NMD длинных некодирующих РНК (длнкРНК), которые содержат короткие открытые рамки считывания, способные кодировать пептиды. В своей работе мы исследовали влияние системы NMD на регуляцию транскрипции длнкРНК у растений. Для проведения экспериментов были использованы нокаутные по гену SMG1, одного из ключевых компонентов системы NMD у животных и большинства растений, линии мха *Physcomitrium patens*. Линии были получены нами из всемирной коллекции Moss Stock Center. Для анализа мы отобрали 10 длнкРНК, которые обладали наиболее высоким уровнем транскрипции в линиях мха с нокаутированной SMG1 киназой. Также мы проверили уровень транскрипции ранее идентифицированных в нашей лаборатории четырех транслирующихся длнкРНК в линиях мутантных по NMD. Уровень транскрипции оценили при помощи количественного ОТ-ПЦР-анализа в режиме реального времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR GreenI. Мы установили, что у нокаутных smg1Δ1 и smg1Δ2 линий мха наблюдается повышение уровня транскрипции нескольких длнкРНК. Наиболее интенсивно растет транскрипция длнкРНК, кодирующей 57-аа микробелок PSEP3, а также его паралога. Кроме того, согласно нашим данным, окислительный и солевой стресс влияют на транскрипцию длнкРНК, что указывает на комплексную регуляцию этого типа транскриптов. Наши результаты указывают на то, что у растений транскрипция отдельных длинных некодирующих РНК, может контролироваться системой нонсенс-опосредованной деградации РНК. Выключение данной системы может приводит к увеличению количества продуктов трансляции длнкРНК. Нарушения по системе NMD и мутации, связанные с продуктами трансляции длнкРНК могут снижать жизнеспособность клеток в условиях абиотического стресса. *Работа поддержана грантом РФФИ № 17-14-01189.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРИТИЧЕСКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА FtsZ МИКОПЛАЗМ

Н.А. Румянцева¹, Д.М. Голофеева¹, Е.В. Пономарева¹, М.А. Ходорковский¹, И.Е. Вишняков^{1,2}, А.Д. Ведякин¹

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

FtsZ – ключевой белок бактериального деления, гомолог эукариотического тубулина. Важнейшим свойством белка FtsZ является способность к полимеризации. В хорошо изученном модельном организме *Escherichia coli* критическая концентрация белка FtsZ, при достижении которой происходит полимеризация, известна и составляет около 6 мкМ. В процессе деления, полимеризуясь, он формирует Z-кольцо, которое является каркасом для других белков деления, главным образом белков, участвующих в ремоделировании клеточной стенки. FtsZ является консервативным белком, присутствующим у большинства бактерий. Микоплазмы являются одними из самых простых организмов, и у большинства из них также имеется FtsZ, однако его роль в делении этих бактерий остается непонятной, в частности, потому что у микоплазм отсутствует клеточная стенка. Определение свойств белка FtsZ данных организмов, в частности, его способности к полимеризации должно помочь установить эту роль. Данная работа посвящена определению критической концентрации белков FtsZ из двух видов микоплазм: *Mycoplasma gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii*. В ходе работы были наработаны рекомбинантные белки FtsZ и оценена их способность к полимеризации в различных буферах с использованием ГТФ в качестве кофактора. Для оценки степени полимеризации белков был использован метод статического светорассеяния. В результате было установлено, что FtsZ из *M. gallisepticum* полимеризуется при концентрации 1,2 мкМ, то есть меньшей, чем FtsZ из *E. coli*. Белок FtsZ из *A. laidlawii* имеет большую критическую концентрацию, около 15 мкМ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00760.

ТРАНСПОРТНАЯ АКТИВНОСТЬ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b ЗАВИСИТ ОТ КОНФОРМАЦИИ БОЛЬШОГО ЭКСТРАМЕМБРАННОГО ДОМЕНА

Д.В. Савенкова, Д.Д. Решетникова, Л.Ф. Булатова, И.А. Макаренко, Р.Г. Киямова, М.В. Богданов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; Медицинская школа Макговерн, Хьюстон, США

Содержание неорганического фосфата в микроокружении опухоли коррелирует с ее прогрессированием, что подчеркивает вклад фосфатных транспортеров в метаболизм опухоли и их выбор как потенциально важных фармацевтических мишеней контроля роста опухоли. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b экспрессируется на поверхности клеток рака яичника, легкого и других. NaPi2b имеет несколько трансмембранных доменов, в том числе большой экстрамембранный домен (ЭМД4, 250-360 а.о.), включающий эпитоп (311-340 а.о.), распознающийся терапевтическими моноклональными антителами. Полученные данные показывают, что в распознавании эпитопа принимают участие дисульфидные связи, которые могут образовываться между остатками цистеина в положениях 303, 322, 328 и 350. Целью исследования является изучение влияния конформации ЭМД4, обусловленной дисульфидными связями между 4 цистеинами, на транспортную активность транспортера NaPi2b. Мы провели анализ транспортной активности мутантных форм NaPi2b с заменами четырех цистеинов в положениях 303, 322, 328 и 350 на аланин. Транспортную активность оценивали по способности трансфицированных рекомбинантными плазмидами клеток OVCAR-8 переносить дигидроортофосфат калия, содержащий 5 $\mu\text{Ci/ml}$ радиоактивного фосфора [³²P]. Показано, что транспортная активность мутантных форм NaPi2b с заменой С303А сохранялась на уровне дикого типа, а при замене С322А была даже выше. При замене С328А наблюдалось снижение транспортной активности по сравнению с диким типом, а при замене С350А она оказалась намного ниже. Полученные данные позволяют сделать предварительное заключение, что Cys350 является критичным для сохранения конформации белка, обеспечивающей транспортную активность NaPi2b, в том числе благодаря образованию альтернативных связей с Cys 322 и Cys328. Таким образом мы предполагаем, что ЭМД4 конформационно свободен, в том числе благодаря образованию альтернативных дисульфидных связей, обеспечивая ему пластичность и универсальность в различных физиологических условиях, а также в условиях опухолевого микроокружения, регулируя тем самым его транспортную активность.

Работа выполнена в рамках программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета, при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00166).

РОЛЬ ШАПЕРОНА HSP70 В ПРОЦЕССЕ РЕПОПУЛЯЦИИ ОПУХОЛИ ПОСЛЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Д.В. Сверчинский, Л.В. Колударова, А. Зивана, А.Н. Копонова, В.Ф. Лазарев, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Одной из главнейших проблем современной онкологии является проблема рецидива, в ходе которого, после медицинского вмешательства и этапа ремиссии, происходит возобновление роста опухоли, при этом новая опухоль, образовавшаяся в результате рецидива, зачастую является более агрессивной, а кроме того, обладает повышенной резистентностью к терапевтическому воздействию. В основе явления рецидива опухоли лежит процесс репопуляции раковых клеток, выживших после терапевтического воздействия, имеющих резистентный фенотип и повышенный пролиферативный потенциал (раковые стволовые клетки, РСК). Репопуляция РСК реализуется за счет механизма компенсаторной пролиферации – явления, в ходе которого массовая клеточная гибель стимулирует пролиферацию выживших клеток. Известно, что важную роль в регуляции компенсаторной пролиферации играют алармины, молекулы, высвобождающиеся из умирающих клеток и способные стимулировать сигнальные пути выживших клеток при взаимодействии с ними. Изучение роли аларминов в молекулярных и клеточных процессах, обуславливающих репопуляцию опухоли, видится важным этапом для поиска способов борьбы с рецидивом раковых заболеваний. В нашей работе мы продемонстрировали, что шаперон Hsp70, отвечающий за поддержание белкового протеостаза в клетке, экспрессирующийся в опухолевых клетках на высоком уровне и лежащий в основе их цитопротекторной системы, способен высвободиться из раковых клеток во внешнюю среду после гибели под действием цитостатических агентов и активировать пролиферацию опухолевых клеток. Мы показали, что наибольшее влияние на активацию

пролиферации оказывает комплекс Hsp70 с другими факторами, высвобождающимися в ходе гибели опухолевых клеток. Проведя анализ этого комплекса, мы выяснили, что в его состав входит алармин HMGB1, негистоновый белок ядра, способный менять свою локализацию под действием внешних факторов, роль которого в опухолевой репопуляции хорошо изучена. Мы показали важную роль HMGB1 как участника комплекса, обуславливающего репопуляцию, а также продемонстрировали способность Hsp70 напрямую связываться с HMGB1 *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-315-70049.

ПРОТЕАЗА S ИНСЕКТОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *PHOTORHABDUS LUMINESCENS* ОБЛАДАЕТ БАКТЕРИОТОКСИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ

А.О. Светлова, М.А. Карасева, И.В. Демидюк

Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Протеаза S (PrtS), протеализинподобная протеаза (ППП) инсектопатогенной бактерии *Photorhabdus luminescens*, традиционно рассматривается как вероятный фактор патогенности, поскольку способен подавлять иммунный ответ насекомых, вызывая неконтролируемую меланизацию и гидролиз антибактериальные пептиды. В то же время информация, полученная недавно о гомологе PrtS из *Serratia proteamaculans*, привела к гипотезе об участии ППП в межбактериальной конкуренции. Предполагается, что ферменты этой группы являются бактериотоксинами. Однако эта гипотеза основывается на косвенных данных и в настоящее время не имеет прямого подтверждения. При культивировании рекомбинантного продуцента PrtS, полученного нами на основе клеток *E. coli* T7 Express lysY/Iq (New England Biolabs) и плазмиды pETDuet-1 (Novagen), мы обнаружили, что после 2 ч индукции экспрессии целевого гена начинается гибель бактерий, а через 3 ч все клетки в культуре лизируются. Электрофоретический анализ показал, что после индукции PrtS накапливается в клетках в форме предшественника, а затем быстро переходит в зрелую форму, что по времени совпадает с гибелью бактерий. Введение инактивирующей мутации в область каталитического центра PrtS приводит к полному подавлению токсического эффекта и накоплению в клетках только белка-предшественника. Токсическое действие и процессинг PrtS также блокируются при коэкспрессии генов протеазы и ее природного белкового ингибитора из *Ph. luminescens*, биологические функции которого до настоящего времени были не известны. Таким образом, нами впервые продемонстрировано, что протеализинподобная протеаза может обладать бактериотоксическим действием, обусловленным каталитической активностью. Кроме того, полученные данные приводят к выводу о том, что биологической функцией белковых ингибиторов ППП является подавление нежелательной внутриклеточной активности этих ферментов. Все вместе свидетельствует в пользу гипотезы о том, что ППП являются токсинами – элементами неустановленной системы межбактериальной конкуренции, в которой белковые ингибиторы этих ферментов, по-видимому, играют роль иммунных белков, защищающих клетку от действия ППП.

СИНТЕЗ ПОЛИ (АДФ-РИБОЗЫ) НЕОБХОДИМ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ СТРЕССОВЫХ ГРАНУЛ И ТРАНСЛЯЦИИ С УЧАСТИЕМ БЕЛКОВ FUS И HUR

А.Ш. Сингатулина¹, М.В. Суханова¹, В. Джоши², Б. Десфоржес², Д. Пастре², О.И. Лаврик¹

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;*

²*Университет Эври-Валь-де'Эссонна, Эври, Франция*

Одним из последствий окислительного стресса является повреждение ДНК. Недавно было показано, что ядерный белок поли (АДФ-рибоза) полимеразы 1 (ПАРП1) может играть важную роль не только в регуляции процесса репарации ДНК, но и в регуляции трансляции в условиях окислительного стресса [1]. ПАРП1 взаимодействует с разрывами ДНК и катализирует синтез поли(АДФ-рибозы) (ПАР), ковалентно-присоединенной к самой ПАРП1 или белку-акцептору (ПАРилирование). ПАР-полимер недавно был идентифицирован как компонент безмембранных клеточных органелл – стрессовых гранул (СГ), образующихся при воздействии арсената натрия [1]. СГ образуются в цитоплазме эукариот в ответ на различные стрессовые воздействия (тепловой шок, химические реагенты, осмотический стресс, окислительный стресс, вирусную инфекцию, гипоксию и другие раздражители). В состав СГ входят полиаденилированная мРНК, факторы инициации элонгации (eIF), малые рибосомные субъединицы и более 50-ти РНК-связывающих белков (РСБ), среди которых обнаруживаются FUS (Fused in Sarcoma), TDP-43 (Transactive response DNA binding protein 43) и HuR (Human antigen R). FUS, HuR и TDP-43 преимущественно локализируются в ядре, участвуют в образовании безмембранных ядерных и цитоплазматических клеточных компартментов, могут подвергаться ПАРилированию и(или) эффективно взаимодействовать с поли(АДФ-рибозой). В настоящем исследовании мы обнаружили, что в условиях окислительного стресса, вызванного перекисью водорода, активация ПАРП1 в ядре влияет на уровень образования СГ с участием белков FUS и HuR. Использование ингибиторов ПАРП1 или подавление экспрессии ее гена (siRNA) ингибирует формирование СГ, изменяет полисомный профиль и снижает общий уровень трансляции в клетках линии HeLa в условиях окислительного стресса. На основании наших исследований мы предполагаем, что существует ПАРП1-зависимый путь формирования СГ, например, через ПАРилирование и ядерно-цитоплазматическую транслокацию ряда РСБ (например, FUS и HuR) и включение ПАР и(или) ПАРилированных РСБ в состав СГ.

Работа выполнена в рамках проекта: РФФ (20-14-00086).

1. Leung, A. K., Vyas, S., Rood, J. E., Bhutkar, A., Sharp, P. A., & Chang, P. (2011). Poly (ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. *Mol. Cell*, 42(4), 489-499.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ СКОРОСТИ РЕАКЦИЙ, ПРОТЕКАЮЩИХ С УЧАСТИЕМ АТФ

Д.О. Третьяков¹, А.С. Лапашина^{1,2}, Б.А. Фенюк^{1,2}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Множество ферментативных реакций сопряжено с образованием или затратой АТФ. Однако существующие на сегодняшний день методы измерения скорости этих реакций *in vitro* имеют ряд ограничений в использовании. Ни один из них не позволяет в реальном времени наблюдать за изменением концентрации АТФ в условиях, приближенных к физиологическим (в присутствии АДФ и нескольких мМ неорганического фосфата). Целью данной работы являлась постановка метода количественного измерения изменений концентрации АТФ *in vitro* в режиме реального времени с использованием флуоресцентных белковых зондов. Эти зонды содержат субъединицу ϵ бактериальной АТФ-синтазы, конформационный переход которой при обратимом связывании АТФ детектируется за счет изменения спектральных свойств флуоресцентных белков. Новый метод позволяет, варьируя вид зонда и температуру, достаточно точно измерять концентрацию АТФ в пределах одного порядка величины в интервале от 1 мкМ до 10 мМ. Зонды позволяют вести измерения в присутствии АДФ, фосфата, других нуклеотидов, а также в интервале значений pH от 7 до 9, что позволяет приблизиться к физиологическим условиям. Метод был успешно использован для измерения активностей гексокиназы и АТФ-синтазы. Результаты этих измерений были подтверждены альтернативными методами. Таким образом, использование флуоресцентных зондов предоставляет множество новых возможностей для измерения кинетики реакций, протекающих с участием АТФ.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 20-14-00268).

КО-ТРАНСЛЯЦИОННОЕ САЙТ-НАПРАВЛЕННОЕ ВКЛЮЧЕНИЕ ФОСФОСЕРИНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФОСФОБЕЛКОВ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С БЕЛКАМИ 14-3-3

К.В. Тугаева¹, А.А. Сысоев¹, Р. Кулей², Н.Н. Случанко¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Кафедра биохимии и биофизики, Государственный университет Орегона, Корваллис, США

Белок-белковые взаимодействия (ББВ) лежат в основе подавляющего большинства процессов жизнедеятельности клетки. Одним из эффективных механизмов регуляции ББВ является фосфорилирование белков клеточными киназами. Появление фосфатной группы в определенных положениях в белке-мишени приводит к изменению его свойств и модулирует узнавание другими белками. Классическим примером белков, узнающих и связывающих преимущественно фосфорилированные формы белков-партнеров, являются белки семейства 14-3-3. 14-3-3 узнают определенные последовательности в белках, в центральном положении которых находятся остатки pS/pT. Так, для белков 14-3-3 биоинформатическими методами предсказано несколько тысяч партнёров. При этом структурно-функционально описано только несколько сотен из них, поскольку получение фосфорилированных форм белков-партнёров часто оказывается сложным и трудоемким процессом. Разработанная нами ранее бактериальная система ко-экспрессии целевого белка в присутствии протеинкиназы А позволила получить ряд фосфорилированных белков для дальнейших исследований их взаимодействия с 14-3-3. Однако применение такого подхода при анализе белков с несколькими сайтами фосфорилирования затруднительно. Альтернативой точечным поэтапным заменам сайтов фосфорилирования на нефосфорилируемые аминокислотные остатки является набирающий популярность подход, основанный на изменении генетического кода. Суть метода заключается в замене в гене триплета, кодирующего остаток Ser, на стоп-кодон TAG. В результате амбер-кодонной супрессии вместо прерывания синтеза полипептида встраивается pS, и синтез белка продолжается. Целью данной работы было определить основной участок взаимодействия N белка коронавируса SARS-CoV-2, содержащего серин-богатый (SR) регион, с белками 14-3-3. С помощью метода кодонной супрессии мы получили N белок с единственной фосфогруппой – pS197. Далее, используя методы аналитической гель-фильтрации с последующим электрофорезом фракций в денатурирующих условиях мы подтвердили, что такой белок образует комплекс с 14-3-3. Таким образом, данный подход позволил избежать трудоемкий и длительный процесс мутагенеза N белка и показать, что решающую роль в узнавании белками 14-3-3 играет фосфорилирование S197 в SR области N белка.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-74-10031.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПОЧКИ

А.С. Фролова¹, А.А. Замятнин (мл.)^{1,2,3}

¹Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ; ²Научно-технологический университет «Сириус», Сочи;

³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Лизосомальные протеиназы, или катепсины, играют особую роль в патогенезе опухолей почек человека. В основном, катепсины являются лизосомальными протеиназами, однако, их можно обнаружить и в других компартментах клетки, включая ядро, а также в клеточном окружении. Ядерные катепсины были выявлены во многих тканях, при различных патологиях и заболеваниях. Однако лишь для немногих ядерных катепсинов была определена специфическая функция в ядре. В клетках почек ядерная локализация цистеиновых катепсинов до настоящего времени охарактеризована не была. Поэтому в настоящей работе изучалась ядерная локализация цистеиновых катепсинов в линии эмбриональных клеток почки HEK293, а также в клетках линий почечно-клеточных карцином человека 769-P и A-498. Анализ клеточных фракций и иммунофлуоресцентный анализ показали, что многие из цистеиновых катепсинов локализуются как в цитоплазме, так и в ядрах эмбриональной и опухолевых клеток почки. Причем, количество ядерных катепсинов значительно различалось в эмбриональных и опухолевых клеточных линиях почки. Кроме этого, мы количественно оценили уровни катепсинов в клеточных фракциях. Получен-

ные результаты указывают на то, что ядерные цистеиновые катепсины, скорее всего, необходимы в этой части клетки и могут обладать ранее неизвестными функциями и, возможно, участвовать в определенных процессах как в здоровых, так и опухолевых клетках почки человека. *Работа выполнялась при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-30020).*

СЕЛЕКТИВНЫЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ-РЕАКТИВАТОРЫ МУТАНТНОГО БЕЛКА p53(Y220C)

Р.Р. Хадиуллина¹, Р.М. Миргаязова¹, В.В. Часов¹, Д. Стефенсон-Кларк², М. Бауд², Р.Н. Мингалеева¹,
Р.Р. Мифтахова¹, А.А. Ризванов¹, Э.Р. Булатов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ² Университет Саутгемптона, Великобритания

Фактор транскрипции p53 действует как супрессор опухолей и считается одним из наиболее многообещающих молекулярных мишеней для лечения онкологических заболеваний, поскольку регулирует множество внутриклеточных метаболических путей, включая восстановление поврежденных ДНК, апоптоз и старение. Большинство мутаций p53 приводят к структурной дестабилизации белка, вызывая его частичное развертывание и инактивацию в физиологических условиях, либо к нарушению его ДНК-связывающих свойств. Ранее показано, что селективные низкомолекулярные соединения способны стабилизировать мутантный белок и восстанавливать его нарушенные транскрипционные функции. Онкогенная миссенс-мутация Y220C белка p53, на долю которой приходится примерно 75 000 новых диагностированных случаев рака ежегодно, представляет собой подходящую мишень для разработки таких соединений. В данном исследовании мы оценили равновесные и кинетические параметры взаимодействия рекомбинантных белков p53(wt) и p53(Y220C) с серией низкомолекулярных соединений с применением методов изотермического калориметрического титрования (ИКТ) и поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Значения констант диссоциации (Kd), независимо полученных двумя разными биофизическими методами, определены в диапазоне 0,5–15 мкМ. Таким образом, разработанные нами соединения на данный момент превосходят все описанные в литературе аналоги по сродству к белку p53(Y220C). Далее методом иммуноблоттинга определяли уровень экспрессии белков p53 и p21 в клеточных линиях MCF7 p53(wt), MCF7 p53(k/o), MCF7 p53(Y220C) и HUH7 p53(Y220C) под действием соединений. Используемые в эксперименте клеточные линии MCF7 p53(Y220C) были получены с помощью лентивирусной трансдукции гена TP53(Y220C) в линию MCF7 p53(k/o). Методом иммуноблоттинга выявлено, что экспрессия белка p53 существенно повышается в клетках MCF7 p53(Y220C) под действием соединений. Также под действием соединений наблюдается повышение экспрессии белка p21 в клетках MCF7 p53(Y220C) и MCF7 p53(k/o). Помимо этого, проведен скрининг и оптимизация условий кристаллизации белка p53(Y220C) для дальнейшего определения структуры мутантного белка p53(Y220C) в комплексе с соединениями. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-74-10022.*

ПРОТЕАЛИЗИНОВЫЙ ОПЕРОН КОДИРУЕТ НОВЫЙ ИНГИБИТОР ПЕПТИДАЗ СЕМЕЙСТВА M4

К.Н. Чухонцева, И.М. Бердышев, А.О. Светлова, Д.Р. Сафина, М.А. Карасева, И.В. Демидюк

Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Протеализин (PLN), металлопротеаза из бактерии *Serratia proteamaculans*, – прототип группы протеализинподобных протеаз (ППП), входящей в семейство пептидаз M4. ППП широко распространены у бактерий, однако биологические функции этих ферментов остаются невыясненными. В то же время имеющиеся данные указывают на вовлеченность ферментов группы во взаимодействие бактерий с другими организмами. В ходе сравнительно-геномного анализа мы обнаружили, что у бактерий гены ППП локализованы с генами небольших консервативных гипотетических белков. Для *S. proteamaculans* мы показали, что гены протеазы и гипотетического белка транскрибируются с образованием одной мРНК и, таким образом, организованы в оперон. Мы получили рекомбинантный гипотетический белок в *E. coli* и обнаружили, что он формирует с PLN эквимольный комплекс, взаимодействуя с протеазой в области активного центра, и является сильным медленно связывающимся конкурентным ингибитором фермента ($K_i=52\pm 14$ нМ). Поскольку исследуемый ингибитор способен подавлять активность не только PLN, но и других протеаз семейства M4, то есть, является универсальным ингибитором ферментов семейства, мы назвали его эмфорин (M4in, M4 inhibitor). Анализ накопления PLN и M4in в культуре *S. proteamaculans* показал, что оба белка не секретрируются конститутивно и равномерно распределены в цитоплазме. Отсутствие сходства аминокислотных последовательностей M4in и его гомологов с последовательностями известных ингибиторов позволяет заключить, что он является прототипом нового семейства белковых ингибиторов протеаз. Таким образом, нами впервые установлено, что у бактерий гены ППП ассоциированы с генами их ингибиторов. Логично заключить, что ингибитор призван подавлять нежелательную активность фермента. Однако необходимость такого подавления, по крайней мере в случае PLN, не очевидна: наши данные демонстрируют, что M4in является внутриклеточным белком, а PLN накапливается в клетках *S. proteamaculans* в виде неактивного предшественника, который не обладает токсическим действием, а активация фермента происходит при его выходе из клетки. На основании этого можно предположить, что активные ППП могут попадать в клетку извне (например, из сестринских клеток), что заставляет по-новому взглянуть на биологические функции этих ферментов.

АНАЛИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР КЛЕТОК *SERRATIA MARCESCENS* SM6

Т.В. Ширшикова¹, Ю.Д. Романова¹, А.В. Лайков¹, М.Р. Шарипова¹, Л.М. Богомольная^{1,2}

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

²Marshall University, Joan C. Edwards School of Medicine, Huntington, West Virginia, USA

Эффлюкс системы – мембранные белковые комплексы, функционирующие как молекулярные насосы, которые выводят антибиотики из клетки и защищают от их токсичного действия. Кроме того, бактериальные эффлюкс системы участвуют в других физиологических процессах микробных клеток (Alcalde-Rico et al., 2016). Показано, что эффлюкс системы играют опосредованную роль в подвижности бактерий. При оценке подвижности штаммов оппортунистического патогена *Serratia marcescens* SM6 выяснили, что удаление эффлюкс системы MacAB значительно уменьшило способность мутантного штамма

S. marcescens ΔmacAB к подвижности (Shirshikova et al., 2021). С целью определения поверхностных структур исследуемых штаммов использовали трансмиссионную электронную микроскопию. Установили, что клетки дикого типа *S. marcescens* SM6 содержали на поверхности перитрихально расположенные длинные жгутики, которые отсутствовали у мутантного штамма. Вместо них по всей поверхности бактериальной клетки мутантного штамма наблюдали короткие поверхностные структуры (Shirshikova et al., 2021). Такая морфология характерна для фимбрий или пилей грамтрицательных микроорганизмов (von Mentzer et al., 2017). Для детальной характеристики поверхностных структур клеток исследуемых штаммов провели их сравнительный анализ с помощью масс-спектрометрии. Для детекции фимбриальных белков использовали их аминокислотные последовательности, идентифицированные в *S. marcescens* SM6 при помощи биоинформационного анализа с использованием алгоритма BLAST (NCBI). Количественный анализ фимбриальных белков проводили с помощью трипсинолиза в геле с последующей экстракцией пептидов ультразвуком. Детекцию пептидов осуществляли с использованием метода мониторинга множественных реакций на масс-спектрометре Q-TRAP 6500, комбинированном с жидкостным хроматографом Infinity1290. Показали, что на поверхности *S. marcescens* SM6 дикого типа преобладают фимбрии 1 типа. При инактивации эффлюкс системы MacAB наблюдали значительное увеличение концентрации поверхностных белков, кодирующих фимбрию 1 и 3 типа. Таким образом, преобладание у мутантного штамма фимбриальных белков позволило нам предположить, что короткие поверхностные структуры представляют собой фимбрию 1 и 3 типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 21-74-00032.

SLURP-1 ИНГИБИРУЕТ МИГРАЦИЮ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

О.В. Шлепова¹, А.В. Кириченко¹, М.Л. Бычков¹, И.Н. Михайлова², Е.Н. Люкманова¹, М.А. Шулепко¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва

Активация никотиновых рецепторов ацетилхолина (nAChR) усиливает пролиферацию и миграцию раковых клеток и подавляет апоптоз. Секретируемый белок человека SLURP-1 ингибирует nAChR α7 типа (α7-nAChR) и подавляет пролиферацию клеток различных карцином. Экспрессия SLURP-1 снижена в клетках меланомы по сравнению со здоровой тканью, и в большей степени в клетках метастатической меланомы по сравнению с первичной опухолью. В данной работе мы проанализировали экспрессию SLURP-1 и α7-nAChR в образцах меланом и нормальных тканей из базы данных TCGA и выявили связь между низкой экспрессией α7-nAChR и повышенной выживаемостью пациентов с меланомой. Было изучено влияние рекомбинантного аналога SLURP-1 (rSLURP-1) на пролиферацию и миграцию первичных клеточных линий меланомы человека: Mel P, Mel Kor, Mel H и Mel Gi, полученных от пациентов РОНЦ им. Блохина. Мы обнаружили, что rSLURP-1 не оказывал антипролиферативного действия на клеточные линии меланомы, однако селективно ингибировал миграцию клеток Mel P с EC50 = 13.0 ± 2.5 нМ. Мы показали, что эффект rSLURP-1 на миграцию клеток Mel P опосредован α7-nAChR. Методами конфокальной микроскопии выявлена со-локализация rSLURP-1 и α7-nAChR на поверхности клеток Mel P, а нокадаун гена кодирующего α7-nAChR отменял эффект rSLURP-1. Однако, с помощью проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченого α-бунгаротоксина, – специфического лиганда α7-nAChR, мы не обнаружили отличий в уровне экспрессии α7-nAChR на поверхности всех исследуемых линий. При этом анализ методом ПЦР в реальном времени показал, что в клетках Mel P, по сравнению с другими исследуемыми линиями меланом, значительно снижена экспрессия гена CHRFAM7A, кодирующего мутантную форму субъединицы α7-nAChR, – dupα7, лишённую части лиганд-связывающего внеклеточного домена. Известно, что гетерорецепторы, содержащие субъединицы α7 и dupα7 обладают сниженной ионотропной активностью, но способны образовывать комплекс с α-бунгаротоксином. Таким образом, мы предполагаем, что эффект rSLURP-1 на миграцию клеток Mel P опосредован α7-nAChR, а нечувствительность Mel H, Mel Kor и Mel Gi к действию rSLURP-1 связана с экспрессией в этих клетках dupα7, которая приводит к образованию нефункционального гетерорецептора. *Работа поддержана Российским научным фондом (проект 17-74-20161).*

РОЛЬ hTERP В МОДУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, РЕГУЛИРУЮЩИХ АУТОФАГИЮ

В.Л. Шляпина¹, М.А. Корягина², О.А. Донцова^{1,2,3}, М.П. Рубцова²

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова;

³Сколковский институт науки и технологий, Москва

Аутофагия – это процесс самопереваривания в клетках, который в нормальных условиях может поддерживать энергетический гомеостаз (1), за счет направленного удаления поврежденных органелл, белковых агрегатов и внутриклеточных патогенов посредством образования аутофагосом, которые впоследствии подвергаются расщеплению лизосомами (2). Исследования аутофагии приобрели большое значение в последние десятилетия в связи с ростом интереса к изучению онкологических заболеваний. С одной стороны, данный процесс в опухолевых клетках способствует их росту и избыточной пролиферации, а также приводит к возникновению устойчивости к некоторым видам терапии. С другой стороны, аутофагия приводит к нарушению энергетического гомеостаза раковых клеток, что способствует их апоптозу (1). Таким образом, понимание регуляции аутофагии является решающим в лечении онкологических заболеваний. Ранее было выявлено, что предшественник теломеразной РНК человека содержит в себе открытую рамку считывания белка, названного hTERP (human Telomerase RNA Protein) (3). В ходе исследования функции hTERP получены данные, позволяющие предположить, что белок может быть вовлечен в регуляцию аутофагии, однако точная роль hTERP установлена не была. Для определения роли hTERP в регуляции сигнальных путей аутофагии был проведен анализ статуса фосфорилирования регуляторных киназ путей AMPK и АКТ в клетках дикого типа и нокаутных по исследуемому белку в условиях культивации в полной среде и в среде с пониженным содержанием глюкозы. В ходе проведения экспериментов наблюдалось снижение уровня фосфорилирования AMPK и отсутствие различий в уровне фосфорилирования АКТ в клетках, нокаутных по hTERP. Также в этих клетках наблюдалось усиление фосфорилирования ULK1 по Ser 757 (наблюдается во время активации mTORC1), ULK1 по Ser555 и TSC2 по Ser1387

(обе киназы являются нижестоящими мишенями AMPK). Таким образом, можно отметить, что hTERP участвует в регуляции активности AMPK и mTORC, являющихся важными звеньями в каскаде сигнальных путей аутофагии.

Работа поддержана грантом: РФФИ[18-29-07031 МК].

1. Chen C. et al., doi:10.3892/etm.2021.10142
2. Ichimiya T. et al., doi:10.3390/ijms21238974
3. Rubtsova M. et al., doi:10.1093/nar/gky705

СЕКРЕТОМЫ ОТ ПОГИБАЮЩИХ В ХОДЕ ХИМИОТЕРАПИИ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА ПРИВОДЯТ К ИЗМЕНЕНИЮ ЭКСПРЕССИОННЫХ ПРОФИЛЕЙ РЕЦИПИЕНТНЫХ КЛЕТОК И ИХ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

П.В. Шнайдер^{1,2}, И.К. Мальянц^{3,4}, О.М. Иванова², К.С. Ануфриева², Г.П. Арапиди^{2,5}, Ж.Ж. Баймуханова^{1,4}, М.А. Лагарькова², В.М. Говорун⁴, В.О. Шендер^{2,5}

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева; ⁴ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ⁵Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

Одной из причин высокой смертности от онкологических заболеваний является быстрое снижение чувствительности к используемому типу терапии. В последнее время все больше внимания стало уделяться вкладу межклеточной коммуникации в этот процесс. Так, было показано, что погибающие в ходе терапии опухолевые клетки секретируют во внеклеточное пространство сигнальные молекулы, которые повышают устойчивость реципиентных клеток к лечению. В данной работе мы исследовали механизм приобретения устойчивости, опосредованной сигналами от погибающих опухолевых клеток на модели аденокарциномы яичника. Было обнаружено, что секреты, полученные от погибающих в ходе химиотерапии клеток приводят к повышению химиорезистентности реципиентных клеток. Далее фракционирование секретов по молекулярной массе, а также сбор секретов от донорных клеток с заблокированным везикулярным транспортом показали, что основные эффекторные сигнальные молекулы секретируются в составе внеклеточных везикул. На следующем этапе были проанализированы отличия в протеомных и транскриптомных профилях реципиентных клеток, инкубированных с секретами от контрольных или погибающих в ходе химиотерапии клеток. Было показано, что индуцированные терапией секреты вызывают i. изменение экспрессии генов, отвечающих за клеточный цикл, ii. изменение сплайсинга генов, вовлеченных в процесс перестройки цитоскелета, внутриклеточный транспорт и формирование ресничек, iii. повышение представленности белков, участвующих в сплайсинге мРНК и репарации ДНК. Суммарно полученные данные указывали на то, что масштабные изменения протеомных профилей клеток, инкубированных с секретами от погибающих опухолевых клеток, опосредованы не только изменениями в экспрессии генов, но также и значительными перестройками в регуляции альтернативного сплайсинга. Таким образом, погибающие клетки направленно секретируют во внеклеточное пространство сигнальные молекулы, которые приводят к обширным изменениям в экспрессии генов в реципиентных клетках и приобретению ими более устойчивого к терапии фенотипа. *Данная работа была поддержана грантом Российского научного фонда 19-75-10123 (LC-MS/MS анализ) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 075-15-2019-1669 (транскриптомный анализ).*

РОЛЬ ФАКТОРА SOX9 В ПОДДЕРЖАНИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО ФЕНОТИПА КЛЕТОК РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Л.Г. Кондратьева, Е.П. Копанцев, И.П. Чернов

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

Транскрипционный фактор SOX9 является одним из главных участников ген-регуляторной сети эмбриогенеза поджелудочной железы (ПЖ), процессов развития предраковых состояний ПЖ и злокачественной трансформации. Известно, что функция SOX9 связана с несколькими протонкогенными свойствами, включающими способность стимулировать пролиферацию, ингибировать старение клеток и взаимодействовать с другими онкогенами в трансформации опухоли. В данной работе было исследовано влияние siRNA деплеции гена SOX9 в клетках шести линий рака ПЖ на экспрессию в них генов и белков регуляторов клеточного цикла, эпителиально-мезенхимальных маркеров, транскрипционных факторов, а также на их пролиферативную активность, морфологию и метастатический потенциал. В клетках линий рака ПЖ при подавлении экспрессии гена SOX9 было выявлено изменение в экспрессии белков маркеров эпителиальных характеристик: цитokerатинов KRT7, KRT18, KRT19, катенинов CTNNB1, CTNNA1, CTNND1, муцина MUC1 и белка плотных контактов ZO-1. Наибольшее число изменяющих уровень синтеза белков обнаружено в эпителиальной клеточной линии Colo357. Таким образом, подавление экспрессии белка SOX9 приводило к выраженному снижению экспрессии нескольких белков маркеров эпителиальной дифференцировки, что демонстрирует роль SOX9 как стабилизатора эпителиального фенотипа в опухолях ПЖ. При исследовании siRNA деплеции гена SOX9 на клетки рака ПЖ было показано влияние на уровень синтеза белков активаторов и ингибиторов клеточного цикла. Был выявлен повышенный уровень экспрессии белков ингибиторов митотической прогрессии p21 и p27, а также циклина D3 (CCND3) в клетках после трансфекции siPHK SOX9. Кроме того, методом проточной цитофлуориметрии было показано снижение доли клеток линии PANC1 после обработки siPHK SOX9, находящихся в S и G2 фазах клеточного цикла. Эти данные были подтверждены при исследовании кинетики роста клеток линии PANC1 с подавленным с помощью siPHK геном SOX9. Это свидетельствует о снижении способности клеток вступать в митоз, и уменьшает их пролиферативную активность. *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 19-15-00317) и гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00447).*

X РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ» Биоинженерия белков и пептидов Устные доклады

СОЗДАНИЕ НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S1

О.В. Галзитская^{1,2}, С.Р. Курпе¹, С.Ю. Гришин¹, А. В. Мачулин³, Е.И. Дерюшева³, А.В. Глякина^{1,4}, М.В. Слизень¹, А.В. Панфилов¹, А.П. Кочетов⁵, А.К. Сурин^{5,6}

¹Институт белка РАН, Пуцино; ²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцино; ³ФНЦ «Пуцино», Научный центр биологических исследований РАН, Пуцино; ⁴ИМПБ РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН, Пуцино; ⁵Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пуцино; ⁶ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Московская обл.

Антибиотикорезистентность бактерий является серьезной проблемой для мирового сообщества и здравоохранения. Широкое и подчас неконтролируемое использование антибиотиков в медицинской практике и сельском хозяйстве увеличивает представленность антибиотикорезистентных бактерий в окружающей среде. Распространение антибиотикорезистентности и низкая скорость создания новых антимикробных препаратов заставляет научное сообщество искать новые пути противодействия патогенным микроорганизмам. Одним из возможных решений является использование антимикробных пептидов (АМП).

Нами был предложен и успешно апробирован на *Thermus thermophilus* и *Escherichia coli* новый механизм действия АМП – механизм направленной коагрегации, который основан на взаимодействии пептида, способного формировать фибриллы, с белком-мишенью. Изучение агрегационных (амилоидогенных) и антибактериальных эффектов пептидов, разработанных на основе последовательности рибосомного белка S1, представляет интерес, как для выяснения участков в структуре белка, ответственных за агрегацию, так и для разработки антимикробных препаратов. Модификация пептидов приводила к снижению способности модифицированных пептидов формировать вытянутые структурированные агрегаты, однако усиливала их способность подавлять рост клеточной культуры *T. thermophilus*.

Мы проанализировали протеом изучаемых бактерий *Thermus thermophilus* после обработки АМП при действии концентраций, не приводящих к ингибированию роста и приводящих к замедлению роста клеток. Мы исследовали суспензию клеток, подвергнутых действию АМП разной концентрации, с помощью масс-спектрометрического анализа. Нами проведена работа по идентификации и анализу белковых смесей разных проб. Данный анализ необходим для идентификации мишени/мишеней исследуемых пептидов и предположения механизма их действия. Полученные результаты будут важны для создания новых АМП для патогенных организмов. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 18-14-00321).

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ВИРУСНЫМ ИНФЕКЦИЯМ С ВОВЛЕЧЕНИЕМ ВИРУС-КОДИРУЕМЫХ ПРОТЕАЗ

И.Э. Грановский^{1,2}, Д.С. Калинин¹, Д.С. Зражаева¹, М.Ю. Земскова¹, Н.С. Холод¹, С.Г. Майоров¹, О.Р. Латыпов¹, М.Г. Шляпников¹, А.В. Ефимов³

¹ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН», Пуцино; ²ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ³Институт белка РАН, Пуцино

Вирусные заболевания сельскохозяйственных животных приводят к существенному экономическому ущербу, а также служат источником опасных для человека инфекций. Традиционные методы терапии и профилактики зачастую являются дорогостоящими и неэффективными. В мировой науке активно развиваются направления, связанные с получением пород сельскохозяйственных животных, генетически устойчивых к определенным инфекционным заболеваниям. Тем не менее, спектр имеющихся на сегодняшний день подходов крайне узок, а сами подходы не универсальны. Постоянно возникающие вызовы делают актуальными разработки новых механизмов вирусной устойчивости животных, которые могут быть легко адаптируемы к широким группам вирусов. Данное исследование посвящено разработке антивирусных механизмов с использованием вирус-кодируемых протеаз. Протеазы осуществляют процессинг вирусных белков на различных стадиях цикла развития вируса и необходимы для эффективной инфекции. Объектом настоящего исследования является вирус африканской чумы свиней (АЧС), ДНК-содержащий вирус семейства Asfarviridae. Он вызывает контактно-заразную высоколетальную болезнь свиней. На сегодняшний день эффективные средства профилактики и лечения АЧС отсутствуют. Вирус АЧС кодирует собственную протеазу, рS273R, которая играет важную роль в морфогенезе, осуществляя процессинг вирусных структурных полибелков. Протеаза рS273R входит в состав вириона и необходима на начальных стадиях инфекции. Исследования проводятся в двух направлениях. Первое связано с возможностью вовлечения протеазы вируса АЧС в активацию каспазы-3 в клетках млекопитающих и последующую индукцию апоптоза. Второе основано на активации протеазой рS273R неспецифической нуклеазы, колицина E9. Предполагается, что последующая за активацией колицина деградация вирусной ДНК приведет к остановке его репликации или формированию неинфекционных вирионов. Нами сконструирована рекомбинантная прокаспаса-3 свиньи, которая эффективно активируется протеазой рS273R как *in vitro*, так и в клетках млекопитающих. Также получен модифицированный белок иммунитета Im9, который специфически расщепляется протеазой рS273R и при этом теряет свои ингибирующие свойства. Разрабатываемые подходы активации антивирусных механизмов вирусными протеазами могут быть перспективны против широкого спектра вирусов.

СТРУКТУРНАЯ ДИНАМИКА БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА NEIL2, ПОЛУЧЕННАЯ С ПОМОЩЬЮ HDX-MS

П.В. Жданова^{1,2}, Д.О. Жарков^{1,2}, В.В. Коваль^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет; ²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Ферменты системы репарации ДНК – белки, которые распознают и исправляют физические повреждения ДНК, вызванные воздействием радиации, ультрафиолетового света или активных форм кислорода. Коррекция повреждений ДНК снижает потерю генетической информации, образование двуцепочечных разрывов и перекрестных связей ДНК. Одним из представителей таких ферментов является белок человека NEIL2, участвующий в эксцизионной репарации оснований. Данный фермент относится к семейству Fpg/Nei и обладает ДНК-гликозилазной и AP-лиазной активностью. Предпочтительными субстратами фермента являются окисленные производные цитозина, например, 5'-гидроксисурацил. Расщеплению эндонуклеазой подвергаются дцДНК, оцДНК и с большей предпочтительностью – пузырьковые структуры ДНК. Бурный рост в области исследования ДНК-узнающих белков обусловлен развитием современных методов: разработкой современных установок для изучения кинетики ферментативных реакций в миллисекундном диапазоне, позволяющих к тому же работать с небольшими количествами биологических веществ; развитию методов компьютерного моделирования, усовершенствованием микроскопических методов для изучения реакций на одной молекуле (single-molecule experiment) и др. Мы использовали комбинацию методов компьютерного моделирования и водородно-дейтериевого обмена с последующей масс-спектрометрией (HDX-MS) для изучения структуры белка человека NEIL2, а также его комплекса с ДНК-дуплексом. Такое сочетание методов позволяет изучать структуру комплекса фермент-субстрат в растворе, что недоступно большинству существующих на данный момент биофизических методов. Трёхмерная структура белка NEIL2 человека была получена моделированием по гомологии на веб-сервере Phyre2 с последующим уточнением структуры в программном обеспечении Chimera 1.14 и Modeller. Динамику глобулы фермента изучали с использованием технологии HDX-MS. В результате проделанной работы нами предложена 3D-структура белка NEIL2 человека. Работа выполнена при поддержке РФФИ (19-34-90052).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ОКИСЬЮ АЗОТА И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ НИТРОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

В.И. Муронец^{1,2}, М.В. Медведева², Е.В. Шмальгаузен¹

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и ²Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Оксид азота играет важную роль в регуляции многих процессов, происходящих в живых организмах, и изучению ее воздействия на отдельные белки и на жизнедеятельность клеток посвящено огромное количество работ. Кроме того, создан ряд лекарственных препаратов, позволяющих регулировать содержание NO и оказывать нужное воздействие на организм. Однако многие аспекты влияния NO на белки остаются недостаточно исследованными из-за нестабильности продуктов их модификации при S-нитрозилировании. Наша работа была посвящена выяснению молекулярных механизмов нитрозилирования белков, связанных с нейродегенеративными заболеваниями – альфа-синуклеина, прионного белка и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД), а также последствий нитрозилирования и связанного с ним окисления белков для функционирования клеток и патологической трансформации амилоидных белков. Особое внимание было уделено идентификации продуктов, образующихся в присутствии доноров окиси азота. Известно, что NO приводит к трем основным модификациям белков – S-нитрозилированию или окислению сульфгидрильных групп остатков цистеина и нитрозилированию остатков тирозина белков. В качестве модельного объекта для изучения продуктов действия NO и соотношения между продуктами S-нитрозилирования/окисления сульфгидрильных групп остатков цистеина, а также воздействия двух типов модификации на свойства белков была исследована ГАФД, участвующая как в регуляции энергетического обмена, так и в индукции апоптоза при нейродегенеративных изменениях. Было показано, что в результате воздействия окиси азота на ГАФД происходит как S-нитрозилирование цистеинового остатка активного центра, так и его окисление до сульфеновой кислоты. Сравнение последствий S-нитрозилирования ГАФД дикого типа и фермента с заменой второго (некаталитического) остатка цистеина активного центра на серин показывает, что только высокорезакционные сульфгидрильные группы в особом микроокружении могут подвергаться такой модификации. Изучены особенности нитрозилирования прионного белка и альфа-синуклеина. Рассмотрена взаимосвязь нитрозилирования и болезни Паркинсона, поскольку альфа-синуклеин и ГАФД непосредственно вовлечены в патологические процессы, вызывающие это заболевание. Работа была поддержана грантом Российского научного фонда № 21-14-00037.

РАЗРАБОТКА ПРОТОТИПА СОВРЕМЕННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА

Н.А. Никитин, Е.М. Рябчевская, Е.А. Евтушенко, М.В. Архипенко, О.А. Кондакова, О.В. Карпова

Кафедра вирусологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Вирус болезни Ньюкасла является возбудителем высококонтагиозного заболевания сельскохозяйственных птиц (псевдо-чума птиц), протекающего с высоким уровнем смертности и вызывающим серьезный экономический ущерб. Это чрезвычайно опасное вирусное заболевание, вызывающее большую смертность птицы, особенно молодняка в возрасте до 2 мес. В настоящее время в качестве профилактики применяются живые аттенуированные и инактивированные вакцины против болезни Ньюкасла. Однако несмотря на интенсивные программы вакцинации достигается лишь частичная эффективность в предотвращении инфекции и распространения вируса. Вспышки болезни Ньюкасла регулярно фиксируются у вакцинированных птиц, приводя к экономическим потерям. Одной из основных причин недостаточной эффективности используемых вакцин является антигенная вариабельность штаммов различных генотипов. В связи с этим разработка прототипа безопасной эффективной рекомбинантной вакцины является чрезвычайно актуальной задачей. В рамках данной работы для разработки прототипа кандидатной вакцины против вируса болезни Ньюкасла на основе проведенного анализа аминокислотных последовательностей

штаммов различных генотипов, имеющих широкое географическое распространение в последнее десятилетие и высокую вирулентность, сформированы две консенсусные последовательности для эпитопов белка HN (346-353 а.о.) и F-белка (65-81 а.о.). Выбранные эпитопы белков HN и F имеют слишком короткую аминокислотную последовательность, поэтому полученные для них нуклеотидные последовательности были объединены для экспрессии в одну генно-инженерную конструкцию и повторены 6 раз. В качестве экспрессионного вектора был использован вектор pQE-30, имеющий в своем составе последовательность, кодирующую шесть гистидиновых остатков. Рекомбинантный белок HN-F выделен и очищен методом металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Выход рекомбинантного белка составил 4 мг на 1 л культуральной среды. Белок HN-F проанализирован и охарактеризован с помощью методов спектрофотометрии и электрофореза в геле. Полученный белок, содержащий эпитопы двух основных антигенов вируса болезни Ньюкасла может служить перспективной основой для создания новой современной рекомбинантной вакцины. *Работа поддержана грантом РФФИ №20-016-00063.*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРЕХПЕТЕЛЬНОГО НЕЙРОМОДУЛЯТОРА Lynx2 ЧЕЛОВЕКА И ЕГО РОЛИ В КОГНИТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ

А.С. Парамонов¹, М.Л. Бычков¹, Д.С. Кульбацкий¹, Д.А. Кондратьева^{1,2}, А.М. Махонин^{1,3}, М.В. Кочаровская¹, М.А. Шулепко¹, М.П. Кирпичников^{1,2}, З.О. Шенкарев¹, Е.Н. Люкманова^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова;

³НИУ «Высшая школа экономики», Москва

Многие белки семейства L_υ6/uPAR человека, имеющие характерную “трехпетельную” организацию, являются эндогенными нейромодуляторами никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR). Настоящая работа посвящена исследованию структурных и функциональных свойств трехпетельного белка человека Lynx2, одного из самых малоизученных членов семейства L_υ6/uPAR. Известно, что Lynx2 ассоциирован с мембраной с помощью GPI-якоря. Также ранее было показано, что Lynx2 специфически взаимодействует с α4β2-nAChR и участвует в контроле уровня тревожности у млекопитающих. Рекомбинантный аналог водорастворимого (без GPI-якоря) варианта белка человека Lynx2 был получен в клетках *E. coli* в виде цитоплазматических телец включения с последующей ренатурацией. Структуру и динамику Lynx2 изучали методом ЯМР-спектроскопии в водном растворе. Было показано, что Lynx2 образует характерную “трехпетельную” структуру, включающую компактное β-структурное ядро (“голова”), стабилизированное дисульфидными связями, а также три выступающие “петли”. Методом экстракции из тотального гомогената мозга крысы с помощью магнитных частиц, конъюгированных с Lynx2, были определены потенциальные мишени белка. Показана специфическая экстракция α4-, α6- и β2-субъединиц nAChR а также α5- и γ2- (но не β2-) субъединиц GABA_A рецептора. Достоверного взаимодействия Lynx2 с α1-, α3- и α7-субъединицами nAChR не наблюдалось. Также впервые было показано, что рекомбинантный Lynx2 ингибирует долговременную потенциацию (LTP), моделирующую синаптическую пластичность в срезах гиппокампа мыши. Сходство эффектов α-Vgtx (селективный ингибитор α7-nAChR) и Lynx2 позволило предположить, что механизм Lynx2-опосредованного подавления LTP может быть связан с отрицательной модуляцией α7-nAChR. Однако, эксперименты на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих α7- и α4β2-nAChR, выявили взаимодействие рекомбинантного Lynx2 только с последним типом рецептора. Обработка нейронов гиппокампа крысы рекомбинантным препаратом Lynx2 приводила к уменьшению количества дендритных шипиков и подавлению экспрессии мРНК α7-, α4- и β2- субъединиц nAChR, синаптофизина и синапсина-1. В совокупности эти данные указывают на возможное негативное влияние Lynx2 на когнитивные процессы. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-20176).*

РАВНОВЕСНЫЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОСТОЯНИЯ В ПРОЦЕССАХ РАЗВОРАЧИВАНИЯ И СВРАЧИВАНИЯ *IN VITRO* ГЕКСАМЕРНОГО Hfq ИЗ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Г.В. Семисотнов, В.В. Марченков, Н.Ю. Марченко, И.А. Кашпаров, Н.В. Леконцева, А.Д. Никулин, В.В. Филимонов
Институт белка РАН, Пушино

Несмотря на то, что большинство клеточных белков функционируют в различных олигомерных формах, мало что известно о процессах сворачивания олигомерных белков. В настоящей работе исследованы процессы разворачивания и сворачивания *in vitro* термостабильного гексамера (Hfq) мезофильных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Для исследования этих процессов в широком интервале концентраций в межсубъединичную область гексамера был включен триптофановый остаток (Y55W). Показано, что кристаллическая структура мутанта практически не отличается от дикого типа. Кроме того, была получена мономерная форма Hfq введением тройной мутации в область межсубъединичных контактов (D9A/V43R/Y55W). Показано, что мономерная форма Hfq является глобулярной и жестко упакованной, а содержание элементов вторичной структуры близко к их содержанию в олигомерной структуре. Кроме того, она характеризуется высокой термостабильностью, но сильно дестабилизирована по отношению к действию мочевины. Методами собственной флуоресценции, гель-хроматографии (HPLC) и динамического рассеяния света (DLS) показано, что в процессе диссоциации гексамерной структуры Hfq (Y55W) экстремально низкими рН~1.5 кроме мономерной формы накапливаются тримеры и димеры. Уменьшение концентрации белка в начале денатурационного перехода, индуцируемого Gu-HCl, приводит к кооперативной диссоциации гексамера до мономера. Кинетика сворачивания гексамера Hfq (Y55W), зарегистрированная по изменению триптофановой флуоресценции, свидетельствует о том, что сворачивание субъединиц Hfq происходит быстрее 10⁻² с. Затем следуют 3 кинетические фазы, зависящие от концентрации белка, которые отражают, по-видимому, формирование димеров, тримеров и гексамеров. Заключительная 4-я кинетическая фаза практически не зависит от концентрации белка и отражает, по-видимому, подстройку субъединиц в составе гексамера. *Работа поддержана грантами РФФИ и МКБ Президиума РАН.*

ТАНДЕМНЫЙ ДИМЕР S-RBD- АКТИВНЫЙ КОМПОНЕНТРЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ZF-UZ-VAC2001

О.С. Чарышникова¹, Д.А. Далимова¹, Динг Фанг², Н.А. Циферова^{1,4}, Э.И. Мусабаев³, Ш.У. Турдикулова¹

¹Центр передовых технологий при Министерстве инновационного развития РУз; ²Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical Co., Ltd, Kuitai; ³НИИ вирусологии МЗ Руз; ⁴Институт биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана

Структурный мембранный спайковый белок S коронавируса SARS-CoV-2 является основной детерминантой его контагиозности и является мишенью для распознавания и нейтрализации антителами. Ранее разработанные субъединичные вакцины на основе S-RBD домена против MERS и SARS обладали относительно низкой иммуногенностью.

Результаты оценки иммуногенного потенциала RBD-мономера показали низкие уровни антиген-специфических антител и титра нейтрализующих антител против псевдотипированного вируса в сыворотках крови иммунизированных мышей линии BALB/c. Напротив, димерный вариант индуцировал образование антител обоих типов, причем, титр нейтрализации составил 90%.

Для повышения стабильности RBD-димера в растворе, два мономера RBD были связаны N и с терминальными остатками, усечены в положении N602 до C603 и объединены в однопочечный tandemный повтор (RBD-sc-димер), что позволило не только сохранить иммуногенную эффективность, но и достичь 10-100-кратного увеличения титров нейтрализующих антител в сыворотках иммунизированных животных.

На основе полученных результатов был разработан рекомбинантный вариант вакцины против новой коронавирусной инфекции, активным компонентом которого является дисульфидно-связанная димерная форма RBD коронавируса SARS-CoV-2 (NCP-RBD), экспрессируемая клетками CHOZN GS-/ZNF-modified CHO cell line.

По результатам III фазы клинических испытаний эффективности, иммуногенности и безопасности рекомбинантной вакцины «ZF-UZ-VAC2001» проведенных в Узбекистане при совместном участии Центра передовых технологий при Министерстве инновационного развития РУз и НИИ вирусологии Министерства здравоохранения РУз было доказано, что вакцина индуцирует формирование гуморального и клеточного иммунитета в отношении коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2 у добровольцев в возрасте старше 18 лет. Иммуногенность вакцины «ZF-UZ-VAC2001» составляет 97%, а безопасность – более 99%.

Вакцина «ZF-UZ-VAC2001» стала первой зарегистрированной в Республике Узбекистан вакциной против коронавирусной инфекции COVID-19. В настоящее время проводится масштабная вакцинация населения республики.

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА ПЕПТИДОВ

М.С. Юркова, К.Э. Князева, В.А. Зенин, А.Н. Федоров

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Разработана система биосинтеза пептидов на основе шаперона GroEL (Yurkova, M.S., Sadykhov, E.G. & Fedorov, A.N. Sci Rep 10, 21024 (2020)). За основу взят шаперонин GroEL из термостабильного организма *T. thermophilus*. Целевые пептиды включены в состав полипептидной цепи GroEL таким образом, что шаперонин экранирует их от цитоплазматического окружения, нивелируя тем самым потенциальные отрицательные эффекты, такие, как лабильность, токсичность, склонность к агрегации и др. В этой системе получены биосинтетическим путем пептиды с различными физико-химическими характеристиками. Данная работа посвящена изучению свойств полученных конструкторов GroEL в зависимости от того, какие целевые пептиды включены в состав полипептидной цепи GroEL.

ПОВЫШЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕЦЕПТОР-СПЕЦИФИЧНОГО ЦИТОКИНА TRAIL DR5-B МЕТОДАМИ БЕЛКОВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

А.В. Яглович^{1,2}, М.Э. Гаспарян¹, А.А. Артыков^{1,2}, М.П. Кирпичников^{1,2}, Д.А. Долгих^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Преодоление устойчивости путем реактивации апоптоза является основным направлением поиска перспективных способов лечения рака. Ранее мы получили мутантный вариант цитокина TRAIL DR5-B, который связывается с рецептором смерти DR5 так же эффективно, как TRAIL дикого типа, но практически не связывается с рецептором смерти DR4 и рецепторами ловушками DcR1, DcR2 и OPG, блокирующими TRAIL-индуцированный апоптоз. DR5-B в разы эффективнее индуцирует гибель опухолевых клеток по сравнению с исходным TRAIL в большинстве линий опухолевых клеток как отдельно, так и при комбинированном воздействии с химиопрепаратами. Кроме того, DR5-B не проявил цитотоксичности по отношению к не-трансформированным клеткам. На ксенографтных мышинных моделях колоректальной карциномы было показано, что DR5-B в 2,5-3 раза эффективнее ингибирует рост опухолей по сравнению с TRAIL дикого типа. Для дополнительного усиления противоопухолевой активности и улучшения фармакокинетических свойств с помощью белковой инженерии был разработан ряд модификаций рецептор-специфического цитокина DR5-B. Одно направление модификации связано с конъюгацией DR5-B с полимерными наноносителями. В результате было получено несколько вариантов DR5-B-конъюгированных полимерных наноносителей, которые эффективно индуцировали гибель опухолевых клеток на 2D- и 3D-моделях *in vitro*. Другое направление модификации связано с получением мультитаргетных гибридных белков на основе цитокина TRAIL, способных параллельно воздействовать на несколько молекулярных сигнальных путей, ответственных за развитие опухоли. С помощью методов белковой инженерии был разработан ряд перспективных вариантов, которые продемонстрировали высокую противоопухолевую эффективность *in vitro*. Можно полагать, что в ходе дальнейших исследований гибридные белки на основе DR5-B с аффинностью к нескольким опухолевым мишеням будут более эффективно тормозить рост опухолей и действовать в более низких дозах по сравнению с TRAIL дикого типа *in vivo*. Получение новых модификаций рецептор-специфического цитокина DR5-B позволит расширить применение препаратов на основе DR5-опосредованной клеточной гибели в терапии неопластических заболеваний. Работа поддержана грантом РФФ № 21-14-00224.

СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОГО БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

Т.Н. Бозин^{1,2}, К.Н. Чухонцева², И.В. Демидюк², Э.В. Бочаров^{3,4}

¹НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ²Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ⁴Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный

Эмфорин (M4in) из *Serratia proteamaculans* — это новый белковый ингибитор протеазин-подобных протеаз (ППП), — подгруппы хорошо известных и широко распространённых металлопептидаз семейства M4. Хотя биологическая роль ППП не установлена, опубликованные данные указывают на их вовлечённость в патогенез. Организация генов некоторых ППП и их ингибиторов в бицистронный оперон (в частности, в случае с M4in и соответствующей протеазой — протеализином) предполагает совместное функционирование обоих молекул. Анализ аминокислотной последовательности M4in позволяет предположить, что этот белок относится к новому семейству белковых ингибиторов протеаз. Поэтому задачей данной работы стало изучение пространственной структуры нового ингибитора и исследование его динамики. Для образца рекомбинантного 13C-, 15N-меченого M4in методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения была установлена пространственная структура. Репрезентативный набор из 20 структур характеризуется отсутствием значимых нарушений наложенных при расчёте ограничений, хорошим соответствием наблюдаемого распределения углов ϕ , ψ карте Рамачандрана и достаточно низкими значениями попарных среднеквадратичных отклонений. Отсутствие структур гомологов и значимого структурного сходства с моделями белков из банка данных PDB позволяют сделать вывод о том, что M4in является прототипом новой группы белковых ингибиторов протеаз с уникальной пространственной укладкой. Измерение времени вращательной корреляции протонов амидных групп позволяет заключить, что помимо N- и C-концевых участков в молекуле есть два участка, обладающих высокой подвижностью. Нами было установлено, что аминокислотная последовательность, этих областей консервативна у гомологов M4in. Это позволяет предположить, что конформационные изменения данных участков важны для тонкой подстройки при связывании M4in с протеализином. По-видимому, выявленные регионы формируют активный центр ингибитора. Таким образом, проведенные нами исследования структуры и динамики эмфорина из *Serratia proteamaculans* демонстрируют, что этот белок является прототипом нового семейства белковых ингибиторов протеаз и позволяют сформулировать гипотезу о строении активного центра представителей этого семейства. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00756.

УВЕЛИЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСТАФИНА С АЛЬБУМИН-СВЯЗЫВАЮЩИМ ДОМЕНОМ ЗА СЧЕТ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ НАТИВНОГО ЛИЗОСТАФИНА

И.В. Васина, А.В. Гришин, А.С. Карягина, В.Г. Лунин

НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Ферменты, расщепляющие пептидогликан бактериальной клеточной стенки, являются перспективными антибактериальными агентами, активными в отношении антибиотико-резистентных штаммов. Однако из-за небольшой молекулярной массы они быстро выводятся из кровотока за счет почечной фильтрации, что затрудняет их клиническое применение. Ранее нами был получен вариант лизостафина – фермента, эффективного против золотистого стафилококка, – с доменом, связывающим альбумин крови. Это позволило увеличить время элиминации химерного белка из кровотока, но привело к значительному снижению антистафилококковой активности при образовании комплекса с альбумином. В данной работе мы исследовали возможность использования лизостафина с междоменным линкером, содержащим короткие последовательности, гидролизующие тромбин. Такой подход должен обеспечить постепенное высвобождение нативного высокоактивного лизостафина в кровотоке из связанного с альбумином слабоактивного химерного белка. В ходе работы были сконструированы три химерных белка, состоящих из лизостафина, короткого GS спейсера со встроенным сайтом гидролиза тромбина (FNPKTP, LVPRVD, KGRVD), альбумин-связывающего домена и шести остатков гистидина на C-конце. Сайты подбирались с учетом разной скорости гидролиза. Бактериолитическая активность рекомбинантных белков в опыте с просветлением суспензии клеток *S. aureus* оказалась сравнимой с активностью лизостафина ($0.028 \Delta OD550 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, против $0.024 \Delta OD550 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$). При связывании с альбумином бактериолитическая активность снижалась до $0.009 \Delta OD550 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$. Минимальная ингибирующая концентрация полученных белков оказалась равна 1,5 мкг/мл в отсутствие альбумина и 6 мкг/мл в комплексе с альбумином, при 0,025 мкг/мл для нативного лизостафина. Гидролиз линкера для FNPKTP и LVPRVD наблюдается уже через 15 мин инкубации с 10 МЕ/мл тромбина при разделении фрагментов в 12% ПААГ, для KGRVD – через 1 час. К 24 часам для LVPRVD уже не обнаруживается цельного белка. Это свидетельствует о постепенном расщеплении линкера и высвобождении нативного лизостафина. При этом также существенно увеличивалась антистафилококковая активность химерных белков после инкубации с тромбином как в опыте с просветлением суспензии, так и при определении МИК.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 18-15-00235П.

ДИЗАЙН ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ И ТЕРМОАКТИВИРУЕМЫХ МИНИ-ИНТЕИНОВ НА ОСНОВЕ DnaE1 ИЗ THERMUS THERMOPHILUS HB27

Е.А. Заяц, М.А. Костромина, Д.Д. Лыкошин, Ю.А. Абрамчик, Р.С. Есипов

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

Разработка новых подходов к выделению и очистке рекомбинантных малых белков и пептидов является одной из ключевых задач биотехнологии. Их получение невозможно без использования белка-носителя. Такими белками, обладающими целым рядом функций, являются интеины, выполняющие роль автокаталитической протеазы в составе гибридного белка. Дизайн

интеинов с новыми способами управления белковым сплайсингом и отщеплением экстеинов может открыть новые возможности для разработки технологий получения рекомбинантных белков. Данное исследование посвящено разработке термостабильных и термоактивируемых мини-интеинов на основе полноразмерного интеина DnaE1 из *Thermus Thermophilus* HB27 (TthDnaE1). Такие интеины могут обладать рядом значительных преимуществ. Во-первых, высокий температурный оптимум отщепления экстеинов может позволить предотвратить расщепление гибридного белка *in vivo* при температурах культивирования мезофильных продуцентов. Во-вторых, благодаря термостабильности интеинов можно осуществлять выделения рекомбинантного гибридного белка за счет температурного осаждения клеточных белков. В результате проведенного рационального дизайна на основе полноразмерного интеина были определены три участка (272, 280 и 287 аминокислот), удаление которых не влияло на структуру Hint-домена, отвечающего за белковый сплайсинг. В результате были получены мини-интеины TthDnaE1 Δ 272, Δ 280 и Δ 287. Показано, что все три мини-интеина стабильны в исследованном температурном диапазоне (до 80°C). Высокоэффективный сплайсинг наблюдали у TthDnaE1 Δ 272 и Δ 280 при повышенных температурах (>50°C). Следующим этапом было превращение наиболее активного мини-интеина Δ 280 в самоотщепляющийся носитель N-концевых аффинных меток. Для этого мы осуществили блокирующие отщепление N-экстеина и лигирование экстеинов мутации: C1A, D405G и C1A+D405G. Максимальную эффективность отщепления C-экстеина наблюдали при повышении температуры до 60°C у мини-интеина Δ 280 с двумя ключевыми мутациями C1A и D405G. Таким образом, мы успешно разработали термостабильные и термоактивируемые мини-интеины с высокой эффективностью белкового сплайсинга и отщепления C-экстеина. Полученные мини-интеины могут служить перспективной основой для разработки новых подходов к выделению и очистке рекомбинантных белков.

АНТИТЕЛЬНОЕ ОТВЕТ НА ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ И ЛИНЕЙНЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ S-БЕЛКА ВИРУСА SARS-CoV-2 У БОЛЬНЫХ COVID-19

Н.Н. Костин¹, Т.В. Бобик¹, Г.А. Скрябин¹, М.А. Симонова¹, В.Д. Кнорре¹, О.Н. Стратиев², Н.Л. Алешенко², Ю.А. Мокрушина¹, И.В. Смирнов¹, А.И. Алехин², А.Э. Никитин², А.Г. Габибов¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Центральная клиническая больница РАН, Москва

Пандемия, вызванная распространением SARS-CoV-2, стала причиной более 3 млн летальных исходов, поразила более 170 млн человек на всех континентах. В работе представлены результаты анализа образцов сыворотки или плазмы 155 пациентов Московского региона, проходивших лечение в Центральной клинической больнице РАН. Критерием включения стал положительный ПЦР-тест и наличие типичной рентгенологической картины вирусной пневмонии в виде «матового стекла» при КТ исследовании. Пациенты были поделены на 4 группы: не находившихся на ИВЛ (1), находившихся на ИВЛ (2) и тех из них, кто впоследствии выздоровел (3) или скончался (4). Учитывали также отягощающие патологии (сахарный диабет, метаболические синдромы, гипертоническая болезнь и другие нозологии). Уровень иммуноглобулинов классов М, А, G и их подклассов, а также тотальный ответ иммуноглобулинов определяли с использованием оригинального набора для ИФА, включающего в качестве антигена фрагменты RBD-SD1 и NTD S-белка, а также N-белок, полученные в прокариотической системе *E. coli*. В качестве антигена, представляющего конформационные эпитопы RBD, использовали рекомбинантный RBD (RBD CHO), полученный в эукариотической системе CHO. Установлено, что уровень IgA является самым ранним серологическим критерием развития инфекционного процесса, вызванного SARS-CoV-2, и обуславливает лучшие показатели чувствительности и диагностической значимости ИФА по сравнению с уровнем IgM. Показано, что скорость сероконверсии «ранних» М и А антител, специфичных к N-белку, сравнима со скоростью сероконверсии антител, специфичных к конформационным эпитопам RBD. В то же время сероконверсия иммуноглобулинов класса G, специфичных к N-белку вируса SARS-CoV-2, значительно опережает этот показатель для антител другой специфичности. Согласно полученным данным, сильную иммуногенность RBD-фрагмента в большей степени обеспечивают конформационные эпитопы, в то время как линейные эпитопы RBD и NTD обладают наименьшей иммуногенностью. Анализ частот встречаемости SARS-CoV-2-специфичных иммуноглобулинов разных классов позволил установить необходимость одновременного определения RBD- и N-специфичных антител для увеличения чувствительности ИФА. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-74-30019 и ICGEB CRP/RUS18-01.

КОНСТРУИРОВАНИЕ РНК ПОЛИМЕРАЗ, РАСПОЗНАЮЩИХ СИНТЕТИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ

С.А. Мукба^{1,2}, Т.В. Егорова¹, Е.Ю. Шувалова¹, А.В. Шувалов¹, П.К. Власов³, П.М. Колосов⁴, Е.З. Алкалаева¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ²Сколковский институт науки и технологий, Москва; ³Institute of Science and Technology, Vienna, Austria; ⁴Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

В настоящее время достижения в области модификации генов и вирусной терапии привели к разработке различных векторов на основе вирусов, способных к репликации и экспрессии терапевтических белков в определенных тканях и даже в опухолевых клетках. Однако вирусная терапия все еще имеет некоторые ограничения, прежде всего связанные с риском неконтролируемой репликации вируса и преждевременной экспрессии терапевтических белков. Мы предложили систему, которая включает в себя репортерный ген, несущий искусственные нуклеотиды, и мутантную ДНК-зависимую T7 РНК полимеразу, способную считывать искусственные нуклеотиды в генах и транскрибировать их в природную мРНК. Такая генетическая конструкция не сможет реплицироваться, а гены в ней не будут транскрибироваться клеточными ДНК и РНК полимеразой. Для выбора позиций для сайт-направленного мутагенеза мы провели молекулярное моделирование, в частности докинг ДНК-матрицы, содержащих искусственные нуклеотиды, в активном центре мутантных форм T7 РНК полимеразы. Лиганд представлял собой последовательность, состоящую из природных и синтетических нуклеотидов. Отобранные кандидаты были дополнительно протестированы в предложенном нами новом методе, основанном на системе сопряженной транскрипции-трансля-

ции. В данной системе активность мутантных T7 РНК полимераз определялась по люминесценции синтезированной нанолуциферазы (Nluc). В результате удалось оценить эффективность транскрипции синтетических матриц с различными мутантами полимеразы. Нам удалось продемонстрировать высокую чувствительность и простоту разработанного метода, а также продемонстрировать способность мутантов T7 РНК полимеразы распознавать синтетические нуклеотиды.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-29-08044.

БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ 2 МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

В.А. Немашкалов¹, А.С. Белеля¹, А.М. Рожкова², А.П. Сеницын^{2,3}

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ БПНЦБИ РАН, Пущино; ²ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ³Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Ферментативная конверсия целлюлозосодержащего сырья лежит в основе многих биотехнологических процессов, осуществляемых в различных отраслях промышленности – целлюлозно-бумажной, текстильной, пищевой, в сельском хозяйстве при производстве кормовых добавок. Эндоглюканаза 2 (ЭГ2) мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* является одним из ключевых промышленных ферментов, участвующих в расщеплении природных некрахмальных полисахаридов. Целью данного исследования было увеличение активности ЭГ2 гриба *P. verruculosum* с помощью сайт-направленного мутагенеза. На основании полученных данных о кристаллической структуре нативного белка (PDB ID: 5L9C) в последовательности ЭГ2 *P. verruculosum* были осуществлены мутации W183F, D213A и S213A. На основе новых рекомбинантных штаммов ЭГ2-D213A и ЭГ2-S213A получены ферментные препараты, обогащенные мутантными формами ЭГ2. Методом ионообменной хроматографии выделены и очищены мутантные формы ЭГ2 и исследованы их биохимические характеристики. Показано, что внесение в структуру ЭГ2 мутаций W183F и D213A приводит к улучшению каталитических свойств фермента. Увеличение выхода глюкозы и восстанавливающих сахаров при гидролизе микрокристаллической целлюлозы под действием мутантных форм ЭГ2 составило до 32 и 17%, соответственно, по сравнению с немутантной формой ЭГ2.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА *BACILLUS PUMILUS* 7P

Д.С. Пудова, М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Использование ферментов протеиназ в составе кормовых добавок позволяет усилить усвоение белков животными и птицами, увеличивает биодоступность азота, снижая уровень загрязнения почвы аммиаком. Потенциальными кандидатами для практического использования являются протеиназы *B. pumilus*. Однако высокий уровень спорообразования, конкурентная секреция внеклеточных белков во время ферментации, а так же синтез поверхностных липопептидов препятствуют внеклеточной продукции и очистке целевого белка. С целью получения эффективной экспрессии генов внеклеточных протеиназ мы планируем провести редактирование генома *B. pumilus* 7P методом CRISPR/Cas9. Для эффективного использования технологии CRISPR/Cas9 необходимо наличие точной информации о расположении и последовательностях генов в геноме. Целью данной работы являлось завершение секвенирования и сборка полного генома *B. pumilus* 7P, аннотация и подбор генов-кандидатов для направленного редактирования методом CRISPR/Cas9. Полногеномное секвенирование штамма *B. pumilus* 7P проводили на платформах Ion Torrent, 454 GS Junior и Oxford Nanopore MinION, сборку генома проводили с использованием геномного ассемблера SPAdes v.3.12. В результате была получена полная последовательность генома длиной 3.61 Мб, которую депонировали в базу данных NCBI под номером CP058911.1. Аннотацию генома выполняли с помощью программы Prokka v.1.12. Наличие в геноме штамма генов внеклеточных протеолитических ферментов устанавливали с помощью баз данных MEROPS и SignalP v.4.1. Удаление генов внеклеточных протеиназ может способствовать увеличению секреции нативных ферментов – субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы. В результате было найдено 143 гена протеиназ, среди которых 12 генов кодируют внеклеточные ферменты (epg, gseBp, aprBp, vpr, bprA, mprBp и др.). Используя базы данных IMG, RAST и сервер antiSMASH были идентифицированы ген второй стадии споруляции sigF, кластеры биосинтеза антимикробных метаболитов (бациллина, бацитиллина, бактериоцина) и поверхностных липопептидов (лихенизина), которые могут препятствовать секреции и очистке целевого белка. В дальнейшем планируется провести редактирование генома штамма *B. pumilus* 7P, путем удаления найденных генов с помощью системы CRISPR/Cas9.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-08-00853 (А).

ЭПИТОП-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ОТВЕТ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ГРУДНОГО МОЛОКА ЖЕНЩИН, РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ COVID-19

Г.А. Скрыбин, Т.В. Бобик, Н.Н. Костин, М.А. Симонова, В.Д. Кнорре, А.Г. Габибов

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

Кормление грудных младенцев матерями, инфицированными коронавирусом SARS-CoV-2, стало серьезной проблемой здравоохранения. ВОЗ рекомендует инфицированным женщинам не отказываться от грудного вскармливания, при этом существует риск контактной передачи вируса. Донорское молоко реконвалесцентов может обеспечить как защиту от коронавируса, так и устранить последствия искусственного вскармливания. Поэтому очень важно охарактеризовать эпито-специфический иммунологический ландшафт грудного молока женщин, перенесших COVID-19 на разных сроках беременности. Было обнаружено, что грудное молоко женщин – реконвалесцентов COVID-19, содержит sIgA-антитела к SARS-CoV-2: к эпитопам N-белка, к линейным эпитопам областей NTD, RBD, SD1 S-белка и к конформационным эпитопам области RBD S-белка. Наиболее часто молоко содержит sIgA-антитела к эпитопам N-белка SARS-CoV-2. sIgA-антитела к конформационным эпитопам области RBD S-белка сохраняются долгое время и даже выявляются в грудном молоке женщин, перенесших COVID-19 в

первом триместре беременности. Эпитопы S-белка вызывают ответ иммуноглобулинов класса sIgA1, эпитопы N-белка вызывают ответ иммуноглобулинов класса sIgA1 и класса sIgA2. Таким образом, донорское молоко женщин – реконвалесцентов COVID-19 может быть потенциальным защитным агентом от коронавируса SARS-CoV-2.

Работа поддержана Грантом РФФИ № 17-74-30019.

ПОЛУЧЕНИЕ Fab-scFv НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К ИНТЕРФЕРОНУ БЕТА-1А И ФАКТОРУ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-АЛЬФА ЧЕЛОВЕКА И АНТИТЕЛА ТРАСТУЗУМАБ В *E. COLI*

В.А. Топорова¹, В.С. Рыбченко^{1,2}, Д.С. Балабашин¹, А.А. Панина¹, В.В. Аргентова², М.А. Силичева², О.Н.Солопова⁴, Т.К. Алиев³, Д.А. Долгих^{1,2}, П.Г. Свешников⁴, М.П. Кирпичников^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Биологический факультет и

³Химический факультет, ²МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁴Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

Биспецифические антитела имеют хороший потенциал применения в противоопухолевой терапии. Одним из видов биспецифических антител являются так называемые Fab-scFv. Они представляют собой объединение Fab-фрагмента одного антитела и одноцепочечного варианта другого антитела. Ранее на основании кодирующих последовательностей двух антител к интерферону бета-1а человека и антитела Трастузумаб нами были получены и охарактеризованы несколько Fab-scFv. Однако получение Fab-scFv в эукариотической системе экспрессии – процесс достаточно дорогостоящий. Отсутствие гликозилирования Fab-scFv позволяет рассмотреть возможность их экспрессии в бактериальной системе.

Нами получены Fab-scFv, в которых одноцепочечные варианты антитела Трастузумаб присоединены к С-концу Fab-варианта тяжелой цепи антител к интерферону бета-1а или фактора некроза опухоли-альфа человека. Для упрощения выделения целевых белков с помощью аффинной хроматографии на С-конец scFv помещена додекагистиновая последовательность. В качестве линкера между Fab и scFv использованы последовательности EPSGP и (GGGGS)₃. В качестве линкера между переменными доменами в scFv использована последовательность (GGGGS)₆.

Разработаны векторы для биосинтеза Fab-scFv в клетках *E. coli* и система очистки целевых белков. Fab-scFv были выделены из культуральной жидкости и охарактеризованы. Показано, что целевые белки функционально активны.

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-773).

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ОСНОВЕ S-БЕЛКА SARS-CoV-2 В РЕСПУБЛИКЕ УЗБЕКИСТАН

Н.А. Циферова^{1,2}, Д.А. Далимова¹, М.И. Муминов¹, Ш.Н. Ибрагимов¹, В.Э. Цой¹, С.С. Бозоров¹, О.С. Чарышникова¹, Ю.В. Левицкая¹, Ш.У. Турдикулова¹

¹Центр передовых технологий при Министерстве инновационного развития РУз; ²Институт биофизики и биохимии, Национальный университет Узбекистана

Согласно опубликованным данным трекера ВОЗ по доклиническим исследованиям вакцин-кандидатов Covid-19 на конец мая 2021 зарегистрировано 184 вакцин – кандидатов, под номером 111 заявлен рекомбинантный вариант вакцины, на основе S-белка SARS-CoV-2, разрабатываемый в Республике Узбекистан.

Известно, что наиболее высокую иммуногенную активность проявляют мембранный спайковый S-белок коронавируса SARS-CoV-2 и димерная версия рецептор-связывающего домена (RBD – receptor-binding domain), расположенный на S1-субъединице S-белка. В связи с этим нами были разработаны несколько видов плазмидных конструкций – это внеклеточной участок тримерного S-белка, мономер внеклеточного участка S-белка, RBD димер и вирусоподобный мультимер, содержащий до 24 фрагментов S-белка. В качестве экспрессирующей системы нами была использована линия клеток ExpiCHO (ThermoFischer Scientific).

На данный момент очищенный препарат мономерного S-белка с алюминием гидроксидом в качестве адъюванта исследован на уровень иммуногенной активности. Иммунизацию проводили на самцах белых беспородных мышей и оценивали уровень иммуногенной активности по количеству нейтрализующих антител против S-белка SARS-CoV-2. Было показано, что титр нейтрализующих антител увеличивался с возрастанием дозы вводимого препарата.

На следующем этапе исследований запланировано проведение доклинических испытаний, изучение токсикологических свойств вакцины – кандидата и переход к стадии клинических испытаний.

Конкурс молодых ученых

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ FOF1 АТФазы *Inh1p* И *Stf1p* В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

К.В. Галкина^{1,2}, О.В. Маркова², Н.Д. Кашко¹, В.М. Зубарева¹, А.С. Лапашина^{1,2}, Б.А. Фенюк^{1,2}, Д.А. Кнорре^{1,2}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

FOF1 АТФ-синтаза использует трансмембранную разность электрохимического потенциала протона для синтеза АТФ. Если электрохимический потенциал оказывается ниже определенного порога, АТФаза переключается на гидролиз АТФ, сопряженный с переносом протонов через мембрану. При дальнейшем снижении электрохимического потенциала белок IF1 ингибирует гидролиз АТФ АТФазой. Ядерный геном пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* содержит два гена гомолога IF1: *INH1* и *STF1*. В присутствии протонифоров, митохондрии, выделенные из штамма дрожжей с двойной делецией генов *Δinh1Δstf1*, гидролизуют АТФ значительно быстрее, чем митохондрии дрожжей дикого типа. Однако описанные фенотипы делеции *INH1* и *STF1* не дают представления о его физиологической роли в интактных клетках. Скорее, наоборот, наличие функционального гена *INH1* мешает клеткам функционировать в случае подавления активности дыхательной цепи. Таким образом, до сих пор неизвестно, какую адаптивную роль выполняют эти белки в целых клетках дрожжей. В своей работе мы исследовали физиологическую роль *Inh1p* и *Stf1p*. С помощью проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии мы показали, что концентрация *Inh1-GFP* увеличивается в стационарной фазе роста. При этом при переходе от роста на среде со сбраживаемым источником углерода к голоданию наблюдается гетерогенность клеток дрожжей по содержанию ингибитора АТФазы *Inh1p*. В наших экспериментах делеция генов ингибиторов АТФазы *INH1* и *STF1* препятствовала возобновлению роста клеток на среде с глюкозой после голодания. Этот эффект усиливался добавлением протонифоров (пентахлорофенол, FCCP). Кроме того, клетки дрожжей *Δinh1Δstf1* не были способны поддерживать высокую скорость дыхания в присутствии протонифоров. Мы предполагаем, что *Inh1p* и *Stf1p* препятствуют гидролизу АТФ дезэнергизованными митохондриями, что позволяет сохранить АТФ для реакций “верхнего” гликолиза при переходе от голодания к активному росту.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-14-00268.

КЛЕТочная СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЦЕНТА CRISPR/CAS9-АССОЦИИРОВАННОЙ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ

Н.А. Пустогаров, К.С. Евменов, Д.Ю. Пантелеев, П.М. Колосов, Е.З. Алкалаева

Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Редактирование генома с использованием CRISPR системы основано на введении сайт-специфичных двуцепочечных разрывов с использованием CAS9 эндонуклеазы совместно с направляющей гайдовой РНК. Такие двуцепочечные разрывы затем могут быть репарированы клетками двумя основными путями: с помощью гомологичной рекомбинации (HDR), которая позволяет произвести точное геномное редактирование, или же с помощью негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ), что приводит к появлению неспецифических нуклеотидных инсерции или же делеции. Причем частота HDR значительно ниже частоты NHEJ, поэтому усилия многих исследовательских групп направлены на стимуляцию выбора клетками пути HDR. В данной работе представлен метод повышения частоты гомологичной рекомбинации при использовании CRISPR/CAS9 системы совместно с системой белков гомологичной рекомбинации бактериофагов. Нами была создана модельная система оценки частоты гомологичной рекомбинации на основе клеток HEK293 с введенной в геном экспрессионной кассетой, состоящей из гена красного флуоресцентного белка RFP, соединенного через T2A пептид с последовательностью зеленого флуоресцентного белка GFP, но содержащего стоп-кодону внутри рамки считывания. В качестве донорной ДНК нами был использована последовательность ДНК, кодирующая GFP, но не содержащая стоп-кодону. Таким образом, в случае репарации по пути HDR после трансфекции клеток CRISPR/CAS9 системой мы могли наблюдать появление зеленого сигнала флуоресценции. Это позволило нам производить оценку частоты HDR.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1660.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АДЪЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ С РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ ВИРИОНА

Е.А. Евтушенко, Е.М. Рябчевская, Н.А. Никитин, О.В. Карпова

Кафедра вирусологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Вирусы растений безопасны для человека и успешно используются в качестве носителя целевых эпитопов/антигенов при создании новых кандидатных вакцин. В последнее время появляется все больше данных о наличии адъювантных свойств у вирионов и вирусоподобных частиц вирусов растений. В ходе настоящей работы проведен сравнительный анализ адъювантных свойств вирусов растений с различным типом вириона (вирус табачной мозаики (ВТМ), палочковидный вирион, геном представлен РНК; Х вирус картофеля (ХВК), нитевидный вирион, геном представлен РНК; вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК), сферический вирион, геном представлен ДНК; вирус мягкой мозаики фасоли, (ВММФ), сферический вирион, геном представлен РНК) и структурно модифицированных сферических частиц (СЧ), полученных при термической перестройке ВТМ. В качестве модельных антигенов были использованы овальбумин (ОВА) и лизоцим куриного яйца (ЛИЗ). Анализ иммунного ответа на индивидуальный белок и на ОВА/ЛИЗ в композициях с растительными вирусами/СЧ выявил, что ВМЦК, ВТМ и СЧ могут эффективно индуцировать общие IgG к модельному антигену. Интересные данные были получены при анализе иммунного ответа на потенциальные адъюванты (вирусы растений/СЧ). Высокие титры антител сами на себя индуцировали ВМЦК, ВММФ и ХВК, тогда как ВТМ и СЧ стимулировали значительно более низкие титры IgG. Учитывая данные по

эффективности стимуляции иммунного ответа на целевой антиген, а также результаты оценки титров на вирионы/СЧ, для дальнейшей разработки вакцинных препаратов наиболее перспективными представляются ВТМ и СЧ. Проведенные исследования открывают новые возможности для использования вирусов растений в качестве адъювантов в вакцинах против патогенов различной природы.

Работа поддержана грантом РФФИ №18-14-00044 (получение СЧ) и грантом Президента РФ №075-15-2019-188.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ УЗНАВАНИЯ СУБСТРАТА БЕЛКОМ Cas9

П.В. Жданова^{1,2}, А.А. Чернонос¹, Г.А. Степанов¹, В.В. Коваль^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Эндонуклеаза Cas9 (CRISPR associated protein 9) связана с адаптивной иммунной системой CRISPR у ряда бактерий, в частности *Streptococcus pyogenes*. Cas9 выполняет проверку последовательности посредством раскручивания инородной ДНК и определения её комплементарности с двадцатью спаренными основаниями спейсера управляющей РНК (sgRNA). Если субстрат комплементарен управляющей РНК, Cas9 расщепляет чужую ДНК. Технология CRISPR-Cas9 широко используется в фундаментальной науке, биотехнологии и в разработках терапии будущего. По этой причине необходимо установление детальных механизмов селективности и специфичности узнавания и расщепления целевой ДНК системой CRISPR-Cas9. Несмотря на то, что у исследователей уже есть понимание структурных особенностей комплекса Cas9-gRNA и механизма узнавания и расщепления целевого субстрата, данная тема актуальна на сегодняшний день и представляет большой интерес для научного сообщества. Так, для комплексов Cas9-sgRNA-dsDNA существуют структуры, полученные методами рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии. Однако, данные методы структурного анализа не позволяют идентифицировать состояние фермент-субстратного комплекса в растворе. В нашей работе для изучения структуры комплекса Cas9-sgRNA-dsDNA использована комбинация методов компьютерного моделирования и водородно-дейтериевого обмена с последующей масс-спектрометрией (HDX-MS). Компьютерное моделирование эндонуклеазы проводили по гомологии с использованием Rhyge2 с последующим уточнением структуры в программе Chimera 1.14. Полученную модель белка дополнили sgRNA, DNA-дуплексом и ионами Mg²⁺. Для комплекса провели молекулярную динамику в неявной модели растворителя с использованием силовых полей Amber20. Вторую составляющую эксперимента – HDX-MS – проводили при 22°C, останавливая реакцию в определенные временные точки и немедленно замораживая образцы. Образцы размораживались непосредственно перед масс-спектрометрическим анализом. Полученные данные обрабатывались в HDX-Analyzer 3. Сравнение результатов эксперимента и компьютерного моделирования позволили предложить уточненную структуру комплекса эндонуклеазы Cas9 с направляющей РНК и ДНК-субстратом. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (20-04-00214).*

БИОСИНТЕЗ АНТИРЕТРОВИРУСНОГО ПЕПТИДА ЭНФУВИРТИДА В СОСТАВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ШАПЕРОНА

В.А. Зенин, М.С. Юркова, А.М. Цедиллин, А.Н. Федоров

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН», Москва

Пептиды, благодаря большей поверхности взаимодействия с белковыми мишенями, чем классические биологически активные вещества — высоко потенциальная область разработки лекарственных средств. Для преодоления ограничений существующих методов синтеза пептидов был разработан оригинальный метод биосинтеза пептидов в составе слитого белка на основе термостабильного шаперона. В качестве модельного пептида был взят энфувиртид — пептид, применяемый для терапии ВИЧ. Более широкое применение этого препарата ограничивает его высокая стоимость. За основу был взят шаперон микроорганизма *Thermus thermophilus* HSP60. В аминокислотную последовательность субъединицы GroEL были внесены изменения — остатки метионина были заменены на изолейцин, а также между Ser199 и Tyr201 была введена последовательность Gly-Ser-Lys-Leu-Glu-Phe, соответствующая полилинкеру с сайтами рестрикции BamHI, HindIII, EcoRI в нуклеотидной последовательности. Участок, кодирующий последовательность энфувиртида, ограниченную метионинами на N и C конце, был клонирован по BamHI/EcoRI в бицистронную плазмиду pET-DUET-1 и экспрессирован вместе с GroES субъединицей шаперона в штамме *E. coli* BL21(DE3). Полученный продуцент показал высокие уровни экспрессии без оптимизации — 140–350 мг/л, целевой белок находился полностью в растворимой фракции белков и был стабилен при нагревании лизата до 65 °C для денатурации белков клетки-хозяина. Слитый белок был очищен при помощи анионообменной хроматографии, переведен в летучий буфер и лиофилизирован. Энфувиртид с гомосеринлактоном на C-конце был получен путем гидролиза бромцианом по остаткам метионина в последовательности слитого белка. Пептид был очищен при помощи ОФ-ВЭЖХ, последовательность была подтверждена методом тандемной масс-спектрометрии. Также был изучен состав реакционной смеси. Показано, что в ходе гидролиза около 20% пептида формилировано из-за контакта с муравьиной кислотой, были обнаружены окисленные формы. Таким образом, крупный (37 АО) пептид был получен в разработанной системе биосинтеза. Система проста в использовании и позволяет применять базовые подходы к очистке — денатурация сопутствующих белков, ультрафильтрация, ионообменная хроматография. Эффективность системы в лабораторных условиях — более 1 мкмоль готового пептида на 1 л культуральной жидкости.

УНИВЕРСАЛЬНАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ КОРОНАВИРУСОВ НА ОСНОВЕ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ А.О. Коваленко, Е.А. Евтушенко, Е.М. Рябчевская, Т.И. Манухова, М.В. Архипенко, О.А. Кондакова, П.А. Иванов, Н.А. Никитин, О.В. Карпова

Кафедра вирусологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В марте 2020 г. Всемирная организация здравоохранения объявила о начале пандемии COVID-19, вызванной вирусом SARS-CoV-2, который относится к семейству Coronaviridae. Ранее представители этого семейства (вирусы SARS-CoV и MERS-CoV) уже становились причиной вспышек опасных инфекционных заболеваний, однако ввиду ограниченного распространения данных инфекций вакцины против них созданы не были. В связи с этим весьма актуальной задачей представляется разработка поливалентной вакцины, эффективной против SARS-CoV-2 и других коронавирусов. Основным антигеном коронавирусов – S-белок, состоящий из субъединиц S1 и S2. Рецептор-связывающий домен (RBD, receptor-binding domain) в составе S1-субъединицы является главной мишенью для нейтрализующих антител. Для создания прототипа вакцины были получены генетические конструкции для четырех рекомбинантных белков: Co1, PE, CoF и MERS, содержащих антигенные детерминанты S-белка коронавирусов, включая SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV. Антигенные свойства белков были подтверждены вестерн-блот анализом, который проводили с использованием коммерческих поликлональных антисывороток к полноразмерному S-белку SARS-CoV-2, к полноразмерному S-белку SARS-CoV и к S1-субъединице S-белка MERS-CoV. Все четыре белка реагировали с поликлональной антисывороткой к S-белку соответствующего вируса. В качестве адъюванта и платформы-носителя полученных белков-антигенов использовали сферические частицы вируса табачной мозаики (СЧ ВТМ), формирующиеся при термической обработке палочковидных вирионов ВТМ. Для белков Co1, PE и CoF получали композиции с СЧ, иммуногенность которых проверяли на лабораторных животных. Было установлено, что добавление СЧ к антигену приводит к усилению иммунного ответа по сравнению с иммунизацией животных индивидуальными белками. При иммунизации композициями иммунный ответ вырабатывается преимущественно на антигены, а не на платформу-адъювант – титры антител к целевым антигенам были до 10 раз выше, чем к СЧ. Таким образом, полученные белки-антигены и их композиции с СЧ ВТМ могут служить перспективной основой для создания универсальной рекомбинантной вакцины против различных коронавирусов. *Работа поддержана грантом РФФИ 20-04-60006.*

ЭКСПРЕССИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГЕНОВ ПРОТЕИНАЗ *V. PUMILUS* В ШТАММАХ С РЕДУЦИРОВАННЫМИ ГЕНОМАМИ

А.О. Корягина, Ф.Р. Османова, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова

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

Сериновые протеиназы являются одной из самых распространённых групп протеолитических ферментов, которые используются в различных областях промышленности. Для получения ферментов разрабатывают эффективные системы экспрессии, обеспечивающие максимальный выход белка и его функциональную продуктивность. Для улучшения продукции рекомбинантных белков разработаны различные генетические стратегии, такие как использование протеазодефицитных штаммов для предотвращения деградации целевого белка и оптимизация промоторов. Бактерии рода *Bacillus* широко используются в качестве штаммов-реципиентов, ввиду ряда преимуществ: высокая скорость роста, развитые системы секреции, статус GRAS (generally recognized as safe). В настоящей работе для получения сериновых протеиназ (субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы) *Bacillus pumilus* нами протестированы две системы экспрессии: LIKE система (индуктивный промотор PLiaI *B. subtilis*) и вектор pGP382 (конститутивный промотор P_{DegQ36} *B. subtilis*). В качестве штаммов-реципиентов были протестированы беспротеазные штаммы *B. subtilis*: штамм 20-36, в котором удалены гены двух внеклеточных протеиназ и штамм 27-31, полученный с помощью CRISPR системы, с инактивированными генами спорообразования, антимикробных метаболитов, образования биопленок и восьми внеклеточных протеиназ. Целью настоящего исследования являлось количественное определение сериновых протеиназ *B. pumilus* в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов с помощью масс спектрометрического анализа. Было показано, что наибольшее накопление протеиназ происходит в штамме *B. subtilis* 20-36: количество белка после индукции промотора PLiaI составило 1,5 мкг/мл для субтилизиноподобной протеиназы, 0,8 мкг/мл для глутамилэндопептидазы; количество белка под контролем конститутивного промотора составило: 0,8 и 0,3 мкг/мл, соответственно. В штамме *B. subtilis* 27-31 концентрация белка была ниже ~10 раз для выбранных протеиназ. Возможно, что это связано с отсутствием стационарной фазы и быстрым отмиранием культуры штамма *B. subtilis* 27-31. Таким образом, полученные нами результаты дают новый вектор для исследования рекомбинантных штаммов. *Работа выполнена в рамках ИСАЛ Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана грантом РФФИ №19-08-00853.*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭСТЕРАЗЫ PMGL3 ИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ

М.В. Крюкова¹, Л.Е. Петровская², Е.А. Крюкова², К.М. Бойко³, А.Ю. Николаева¹, Д.А. Корженевский¹, Д.А. Долгих², В.О. Попов³

¹НИЦ «Курчатовский институт»; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;

³ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Вечная мерзлота представляет собой уникальную среду обитания микроорганизмов, которые выживают в экстремальных условиях, вызванных низкими температурами. Выяснение структурных и молекулярных механизмов приспособления микроорганизмов обеспечивает понимание возможных пределов существования жизни и является основой для разработки новых биокатализаторов. В результате конструирования и скрининга фосмидной библиотеки метагеномной ДНК из вечномёрзлого грунта получены гены новых эстераз, принадлежащих к семейству гормон-чувствительных липаз (HSL). Для определения

молекулярных основ микробной адаптации к условиям вечной мерзлоты мы изучили функциональные характеристики фермента PMGL3 (активность в различных условиях и термостабильность), а также установили 3D структуру белка с разрешением 2.1 Å. PMGL3 обладает типичной α/β -гидролазной укладкой и образует димеры в кристаллах и растворе. Обнаружено, что PMGL3 является холодоактивным ферментом с пониженной термальной стабильностью. В результате прогрева при 40°C или при длительном хранении наблюдается образование тетрамеров и последующая олигомеризация белка, сопровождаемая потерей активности. Детальный анализ структуры показал, что кристаллический тетрамер PMGL3 имеет уникальную архитектуру по сравнению с гомологичными белками. Для повышения стабильности PMGL3 проведен сайт-направленный мутагенез пяти аминокислотных остатков (D7N, E47Q, K67A, R97Q, H279A), участвующих в образовании тетрамерных форм белка. Термодинамические и кинетические характеристики полученных мутантов были исследованы в сравнении с белком дикого типа PMGL3. Гель-фильтрационный анализ мутантных вариантов показал существенное снижение доли тетрамерной формы после прогрева при 40°C, сравнению с диким типом. Кроме того, мутанты D7N и K67A продемонстрировали увеличение периода полуинактивации на 40 и 60%. Мутанты R97Q, H279A и 5х (мутант, содержащий все 5 замен) оказались лишены липолитической активности, однако гель-фильтрация показала, что 5х остается в димерной форме даже после продолжительного прогрева. Значения K_m полученных мутантов были аналогичны значениям w_t PMGL3, а их каталитические константы снижены на 25-40%.

СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СФЕРИЧЕСКИЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ВИРИОНОВ И ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ВИРУСА МОЗАИКИ АЛЬТЕРНАНТЕРЫ

Т.И. Манухова, Е.А. Евтушенко, А.Л. Ксенофонов, А.М. Арутюнян, Н.А. Никитин, О.В. Карпова

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В настоящей работе исследован процесс структурной перестройки вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт, род Potexvirus, семейство Alphaflexiviridae) и вирусоподобных частиц (ВПЧ ВМАльт), образующихся при самосборке белка оболочки ВМАльт *in vitro* в отсутствие РНК. Явление структурного перехода вирусов растений при нагревании с образованием сферических частиц (СЧ) было детально описано для нескольких спиральных вирусов растений (вирус табачной мозаики (ВТМ), X вирус картофеля (ХВК)) (Atabekov et al., 2011, Nikitin et al., 2016). В предшествующих работах (Трифорова и др., 2017) была показана возможность формирования СЧ из ВПЧ ВМАльт (СЧВПЧ) при нагревании до 90°C в воде. В рамках представленной работы впервые были получены СЧ из вирионов ВМАльт (СЧВ). Условия образования СЧВ ВМАльт отличаются от описанных для ВТМ и ХВК. Кроме того, условия образования СЧВПЧ и СЧВ также различны, что, по-видимому, обусловлено продемонстрированными нами ранее особенностями структуры вирионов и ВПЧ (Donchenko et al., 2017). Структурный переход вирионов в СЧВ осуществляется с образованием промежуточных форм и завершается окончательно при 94°C. Структурная перестройка ВПЧ ВМАльт происходит при более низких температурах (65°C) и не сопровождается формированием аналогичных интермедиатов. СЧВ представляют собой исключительно белковые структуры, и не содержат вирусную РНК. В соответствии с данными спектров кругового дихроизма, собственной флуоресценции и тиофлавинового теста, структура белка, входящего в состав СЧВПЧ и СЧВ, отличается от таковой в составе ВПЧ и вирионов. В результате термической перестройки происходит снижение доли α -спиралей и увеличение содержания β -структур. ВПЧ, СЧВПЧ, СЧВ взаимодействуют с флуоресцеин изотиоционатом и 5-(N-малемидо)-флуоресцеин диацетатом более эффективно, чем вирионы ВМАльт, что свидетельствует о большей доступности аминокислотных остатков лизина и цистеина на поверхности белка в составе указанных частиц. Таким образом, термическая перестройка сопровождается изменением состава поверхностных аминокислот. СЧВПЧ и СЧВ способны к адсорбции модельных белков и могут быть рассмотрены как перспективная платформа для сборки функционально активных комплексов. *Работа поддержана грантом РФФИ №20-34-70023.*

МУТАНТНЫЕ ЦИТОХРОМЫ С С ЗАМЕНАМИ, ИМИТИРУЮЩИМИ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ОСТАТКОВ Туг ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКА

Д.Д. Никонова^{1,2}, Ж.В. Бочкова³, Н.А. Браже^{1,3}, Д.А. Долгих^{1,2}, Р.В. Черткова¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; ²Биологический факультет и ³Кафедра биофизики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Цитохром с (цит с) – железосодержащий белок, участвующий в переносе электронов между комплексами III и IV электрон-транспортной цепи митохондрий, инициации запуска клеточного апоптоза через активацию каспазного каскада, регуляции выхода ионов Ca^{2+} в цитоплазму, репарации ДНК, реконструкции нуклеосом и некоторых других процессах. Широкий функциональный спектр цит с регулируется за счет механизма посттрансляционных модификаций (ПТМ). Одной из важнейших ПТМ цит с является фосфорилирование, в частности остатков Туг в положениях 48 и 97. В настоящее время не до конца понятно влияние фосфорилирования остатков Туг, оказываемое на конформацию простетической группы цит с – гема с. Изучение изменений структуры гема в результате ПТМ цит с, поможет лучше понять механизмы, которые клетка использует для регуляции активности митохондрий и других внутриклеточных компонентов. В настоящей работе для изучения структурных изменений гема с, вызванных фосфорилированием остатков Туг, были сконструированы и получены мутантные варианты лошадиного цит с, в которых остатки Туг в положениях 48, 67, 74, 97 были заменены на отрицательно заряженные остатки, имитирующие избирательное фосфорилирование. Для введения мутаций в ген цит с методом сайт-направленного мутагенеза использовали плазмидный вектор pVPCYS1, содержащий ген лошадиного цит с и ген гем-лиазы. Экспрессию мутантных генов проводили в клетках *E. coli*. Выделение и очистку рекомбинантных белков осуществляли по двухстадийной схеме, включающей жидкостную хроматографию на катионообменном сорбенте MP HS (Bio-Rad, США) и на гидроксипатите. Для изучения конформационных изменений в структуре гема с, мутантные варианты, содержащие замены в 48 и 97 положениях, исследовали методами комбинационного рассеяния (КР). Окисленные формы мутантных вариантов цит с анализировали методом гигантского КР. Для этого молекулы цит с адсорбировали на наноструктурированных серебряных поверхностях. При

исследовании восстановленной формы использовали спектроскопию резонансного КР. По спектрам КР оценивали изменение конформации гема с и жесткости белкового микроокружения.

РАЗРАБОТКА СТАБИЛЬНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ДЛЯ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Е.М. Рябчевская, Д.Л. Грановский, Е.А. Евтушенко, П.А. Иванов, О.А. Кондакова, Н.А. Никитин, О.В. Карпова
Кафедра вирусологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Сибирская язва – тяжелое инфекционное заболевание, вызываемое грамположительной спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Споры *B. anthracis* являются потенциальным биотеррористическим агентом. В связи с этим разработка эффективных вакцин против сибирской язвы с пролонгированным сроком хранения важная и актуальная задача. Основным антигеном токсина сибирской язвы – протективный антиген (РА – protective antigen) представляет собой четырехдоменный белок с молекулярной массой 83 кДа и является ключевым компонентом как существующих, так и разрабатываемых вакцин против сибирской язвы. Основная проблема, которую необходимо преодолеть при создании рекомбинантной вакцины – это крайне низкая стабильность рекомбинантного РА (гРА). К основным причинам нестабильности гРА относят наличие в составе белка сайтов протеолиза фурином и химотрипсином, а также остатков аспарагина, подверженных спонтанному дезаминированию. Известно, что отдельные домены РА также обладают протективной активностью. Ранее нами был получен короткий антиген сибирской язвы гРА3+4, представляющий собой третий и четвертый домены РА с заменами аминокислотных остатков аспарагина (Asp713 и Asp719), которые в наибольшей степени подвержены спонтанному дезаминированию, на глутамины. В настоящей работе был получен рекомбинантный антиген сибирской язвы гРА1+2, представляющий собой первый и второй домены РА с модификациями аминокислотной последовательности, приводящими к инактивации сайтов протеолиза (замена 162NSRKKR167 на 162QSSNKE167 и делеция 313FF314). Протестирована стабильность антигенов гРА3+4 и гРА1+2 в течение как минимум 19 дней при +37°C и как минимум 160 дней при +25°C. На основе экспрессионных конструкций для гРА1+2 и гРА3+4 впервые получен полноразмерный рекомбинантный РА, содержащий одновременно как замены аминокислотных остатков, подверженных спонтанному деаминированию, так и замены в сайтах протеолиза (гРА83m). Таким образом, показана возможность эффективной стабилизации гРА83m по сравнению с немодифицированным полноразмерным гРА. Полученные стабильные рекомбинантные антигены гРА1+2, гРА3+4 и гРА83m, а также комбинация гРА1+2 и гРА3+4 могут рассматриваться в качестве основы для создания вакцины против сибирской язвы.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-14-00044.

АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В eRF3 ЛЕТАЛЬНЫ В ПРИСУТСТВИИ ПРИОНА [PSI+] У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Н.П. Трубицина¹, О.М. Землянко¹, Е.М. Максютенко^{1,2}, Т.М. Рогоза^{1,2}, Е.И. Порфирьева¹ Г.А. Журавлева¹

¹Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет; ²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Санкт-Петербургский филиал, Санкт-Петербург

Жизненно важный ген SUP35 дрожжей *S. cerevisiae* кодирует фактор терминации трансляции eRF3 (Sup35p). Белок Sup35 состоит из трех доменов: С-домен необходим для терминации трансляции и имеет сайты связывания ГТФ и фактора терминации трансляции eRF1. N-домен обеспечивает возможность агрегации Sup35p с образованием приона [PSI+]. Линкерный М-домен участвует в поддержании приона [PSI+]. Мутации в гене SUP35, как и прион [PSI+] вызывают снижение точности терминации трансляции и приводят к нонсенс-супрессии. Мутации sup35, приводящие к аминокислотным заменам в N-домене, влияют на возникновение и поддержание приона [PSI+]. В настоящей работе мы охарактеризовали свойства белковых продуктов трех спонтанных миссенс-мутаций sup35-m (m от англ. missense), расположенных внутри области гена SUP35, соответствующей С-домени белка Sup35. С помощью методов электрофореза в полуденатурирующем агарозном геле (SDD-AGE) и флуоресцентной микроскопии, мы показали, что агрегаты [PSI+] пропадают после замены гена SUP35 дикого типа на мутантные аллели sup35-m. Для того, чтобы проверить, могут ли белки Sup35-m агрегировать, мы наработали рекомбинантные белки Sup35-m и показали, что они формируют фибриллярные агрегаты *in vitro*. Причиной несовместимости приона [PSI+] и мутаций sup35-m могут быть дефекты в процессе терминации трансляции. Мы измерили ГТФазную активность белков Sup35-m и выявили, что она отличается от дикого типа. Беря во внимание, что прион [PSI+] и мутации sup35-m являются сильными супрессорами, их совместное присутствие в клетке способно привести к ее гибели. Мы пришли к выводу, клетки с мутациями sup35-m не могут поддерживать прион [PSI+] из-за нарушения терминации трансляции.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-14-00050.

ВЛИЯНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ УЗНАВАНИЯ РНК-СУБСТРАТА НУКЛЕАЗОЙ PguCas13b В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

А.В. Чиринская¹, М.А. Мисюрин¹, А.С. Фотина¹, Ю.В. Сопова^{1,2}, Е.И. Леонова^{1,3}

¹Центр трансгенеза и редактирования генома, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет; ²Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН;

³Научно-технологический университет «Сиркус», Сочи, Россия

На систему нуклеаз CRISPR/Cas возлагаются большие надежды в вопросе лечения генетических заболеваний человека. Помимо широко используемой нуклеазы Cas9, на данный момент известен целый ряд менее изученных нуклеаз, таких как Cas12 и Cas13, которые могут быть использованы для редактирования генома или транскриптома самых разных организмов, начиная от бактерий и заканчивая растениями и млекопитающими. В отличие от ДНК-специфичных представителей семейств

Cas9 и Cas12, ферменты семейства Cas13 являются РНК-специфичными. Для активации ферментам Cas13 требуется взаимодействие с направляющей РНК, последовательность которой комплементарна целевой РНК. Связывание направляющей РНК белком семейства Cas13 с целевой РНК считается наиболее специфичным среди Cas-нуклеаз. Помимо целевой нуклеазной реакции, для белков Cas13 было показано наличие так называемой «коллатеральной активности» - неспецифического разрезания РНК, происходящего после внесения нуклеазой целевого разреза. С использованием системы CRISPR/Cas13 разрабатываются системы модификации РНК, имиджинга клеток и молекулярной диагностики, поэтому активно ведутся исследования по поиску новых и модификации существующих белков семейства Cas13. Мы наработали и выделили рекомбинантную нуклеазу PguCas13b и показали, что в условиях *in vitro* даже однонуклеотидные неспаренности между направляющей и целевой РНК инактивируют нуклеазную активность данного фермента. Помимо белка PguCas13b дикого типа мы получили белок PguCas13b, несущий мутацию в домене, ответственном за взаимодействие с направляющей РНК. Высокая специфичность продуцированной нами нуклеазы открывает широкие возможности для использования системы CRISPR/SUMO-PguCas13b в качестве диагностической системы, а также высокоточной системы визуализации тканеспецифичной экспрессии генов, а также прочих задач, связанных с направленным редактированием клеточной РНК в том числе млекопитающих.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 19-315-51030 и СПбГУ ID 73023210.

ПОДБОР РЕЦИПИЕНТНОГО ШТАММА ДЛЯ ПРОДУКЦИИ ПРОТЕИНАЗ *V. PUMILUS*

А.О. Корягина, Ю.А. Васильева, Д.С. Пудова, М.Р. Шарипова

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

Задача получения биологически активных белков по результатам секвенирования многих бактериальных геномов актуальна для многих отраслей промышленности. Поэтому индустрия новых биоинженерных методов для получения большого количества активных белковых продуктов постоянно совершенствуется. Основными задачами являются: снижение затрат на исходное сырье, сокращение времени производства и увеличение выхода конечного целевого продукта. Рекомбинантные ДНК-технологии позволяют использовать бактерии в качестве доступных экспрессионных систем с относительно небольшими затратами. Среди бактерий особый интерес представляют бациллы – они не патогенны, имеют статус безопасных микроорганизмов. Особенно важно, что бациллы способны накапливать целевые белки и вторичные метаболиты (пептиды, антибиотики) в культуральной жидкости. Последнее свойство позволяет существенно сократить время и стадии очистки для получения целевого продукта. Целью данного исследования являлся анализ экспрессии генов протеиназ *V. pumilus* в редуцированном штамме *B. subtilis* IIG-Bs27-28. Штамм реципиент был получен при помощи направленного редактирования системой CRISPR/Cas9. Из исходного штамма *B. subtilis* 168 были удалены гены профагов, внеклеточных протеиназ (bpr, wprA, nprB, vpr, prgE, erg, mpr, aprX), вторичных метаболитов (бациллизина, бациллина, субтилозина), гены, продукты которых ответственны за подвижность, спорообразование (spoIIA, sigE, sigG, sigF и др) и образование биопленок. Для повышения эффективности трансформации в геном штамма IIG-Bs27-28 была интегрирована кассета comK/comS под контролем промотора PmtIA. Для получения эффективной экспрессии белка, в клетки *B. subtilis* IIG-Bs27-28 трансформировали вектора с генами глутамил-эндопептидазы (gseVp) и субтилозиноподобной протеиназы (aprVp) *V. pumilus*, соответственно. Активность рекомбинантных ферментов глутамилэндопептидазы и субтилозиноподобной протеиназы была равна 0,425 и 0,589 Ед/мл, соответственно. В дальнейшем планируется установить зависимость уровня активности от динамики роста модифицированных штаммов, оптимизировать условия культивирования для получения большей экспрессии рекомбинантных белков и провести количественную оценку протеиназ в составе рекомбинантных штаммов. *Работа поддержана грантом РФФИ № 19-08-00853.*

НОВЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КО-ФАКТОРА SAM ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ

А.Ю. Руденко^{1,2}, С.С. Марьясина¹, В.И. Польшаков¹

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Лаборатория магнитной томографии и спектроскопии; ²Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

Метилтрансферазы (МТазы) представляют собой обширную группу ферментов, катализирующих присоединение метильной группы (СН₃) к различным субстратам внутри клетки. Источником метильной группы для реакции метилирования становится S аденозилметионин (SAM) — молекула, содержащая в своей структуре трёхвалентную серу. Среди прочего, субстратами МТаз являются нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), поэтому нарушения в их работе зачастую приводят к развитию тяжелых патологий. Изучение структуры МТаз, в том числе методами ЯМР, может помочь в исследовании заболеваний, связанных с нарушениями в их работе. Одним из современных подходов к изучению биомолекул методами спектроскопии ЯМР является использование парамагнитных спиновых меток — органических молекул, содержащих неспаренные электроны и способных связываться с другими молекулами. Введение спиновых меток в белок позволяет получить ценную структурную информацию о нём с помощью регистрации и анализа 2D ЯМР-спектров молекулы белка до и после введения метки. В ходе исследования были разработаны подходы к синтезу трех групп аналогов SAM, содержащих лантанид-хелатирующий фрагмент. Полученные соединения апробированы на модельной МТазе WBSR27: методами спектроскопии ЯМР измерена способность этой МТазы связывать SAH и 10 его аналогов. Показано, что подход введения нековалентной спиновой метки в МТазу для изучения структуры белка перспективен, а основным фактором, влияющим на качество регистрируемых структурных данных, является сила взаимодействия белка с меткой. Наиболее перспективными соединениями для создания спиновых меток представляются аналоги SAH, содержащие лантанид-хелатирующий фрагмент, связанный через ароматическое кольцо.

Х РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

Физико-химические методы исследования структуры пептидов и белков.

Взаимосвязь «структура – функция»

Устные доклады

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ZAD-ДОМЕНОВ АРХИТЕКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ

К.М. Бойко¹, А.Ю. Николаева², А.Н. Бончук³, П.Г. Георгиев³, В.О. Попов^{1,2}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН;

²НИЦ «Курчатовский институт»; ³Институт биологии гена РАН, Москва

Пространственная архитектура генома сложна, динамична и имеет ключевое значение для корректной регуляции генов. Значительная часть заболеваний человека связана с нарушениями в работе регуляторных систем генома, приводящими к сбоям в программе клеточной дифференцировки и пролиферации. Установлено, что структурная организация хроматина контролируется особым классом сложных мультидоменных архитектурных белков, к числу которых относятся белки, содержащие т.н. ZAD-(zinc finger associated) домены. Такие домены, широко распространенные у членистоногих, но обнаруженные также и животных (в т.ч. у человека), присутствуют на N-конце многих белков, имеющих в своем составе цинковые пальцы типа C₂H₂. Несмотря на большой объем молекулярно-биологических данных о ZAD-доменах, структурные данные немногочисленны – так ранее была установлена лишь одна структура представителя ZAD-доменов из белка Grauzone. Нами впервые установлен ряд пространственных структур различных ZAD-доменов и показано, что несмотря на крайне низкую степень гомологии по первичной последовательности (не более 20% в среднем) все они имеют сходную пространственную укладку. Выявленные при этом тонкие отличия в структуре определяют специфичность взаимодействия ZAD-доменов, что определяет, по-видимому, механизмы регуляции процессов установления и поддержания пространственной организации хроматиновых доменов. Данная работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10099).

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ БИТОПНЫХ БЕЛКОВ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

Э.В. Бочаров^{1,2}, Я.В. Бершацкий^{1,2}, А.С. Урбан^{1,2,3}, Д.М. Лесовой¹, О.В. Бочарова¹, К.В. Павлов³, Н.В. Кузьмина⁴, А.А. Можаяв¹, И.С. Охрименко², А.С. Кузнецов^{1,2}, П.Е. Вольнский¹, В.В. Бритиков⁵, Е.В. Бритикова⁵, С.А. Усанов⁵, Р.Г. Ефремов^{1,2}, А.С. Арсеньев^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный; ³ФННКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ⁴Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва; ⁵Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Биологическая функция битопных мембранных белков, имеющих только один трансмембранный сегмент, обеспечивается сетью разнообразных межмолекулярных взаимодействий в клеточной мембране. Битопные белки из цитохром P450-зависимой системы принимают участие в биосинтезе и метаболизме физиологически активных веществ в организме человека. К этому классу белков также принадлежат рецепторы типа I, которые принимают непосредственное участие в развитии и поддержании гомеостаза тканей организма человека. Рецепторные тирозинкиназы служат удобными моделями рецепторов типа I, чтобы показать, как лиганд-индуцированные конформационные перестройки и специфическая димеризация внеклеточных и трансмембранных доменов приводят к аллостерической активации цитоплазматических доменов при передаче сигнала через мембрану клетки. Болезнь Альцгеймера представляет собой возрастную патологию, связанную с накоплением β-амилоидных пептидов, - продуктов ферментативного расщепления секретазой битопного белка-предшественника β-амилоида, принадлежащего к рецепторам типа I. Нарушения функционирования данных битопных белков приводят к развитию ряда патологий, а их ингибиторы являются одними из самых успешных примеров таргетной терапии онкологических и нейродегенеративных заболеваний на сегодняшний день. В течение ряда лет мы определили альтернативные конформации примембранных и трансмембранных сегментов данных битопных белков в имитирующих мембрану средах, используя ЯМР-спектроскопию высокого разрешения в сочетании с другими методами структурной биологии. Нами показано, что функционирование данных битопных белков обуславливается не только специфическими белок-белковыми и белок-липидными взаимодействиями, но и физическим состоянием липидного окружения, как одного из главных компонентов самосогласованной системы биологической мембраны. Это позволило нам раскрыть принципы, лежащие в основе передачи сигнала через мембрану клетки и распознавания субстрата мембранными белками, а также механизмы действия ряда патогенных мутаций. Работы по исследованию цитохромов поддержаны РФФИ и БРФФИ, проекты 205400041 и X20P159. Работа по исследованию рецепторных тирозинкиназ и белка-предшественника β-амилоида выполнена при поддержке Российским научным фондом, проекты 18-14-00375 и 20-64-46027, соответственно.

КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ ПЛОТНОУПАКОВАННЫХ А-СПИРАЛЕЙ В БЕЛКАХ

А.В. Ефимов

Институт белка РАН, Пущино

Взаимное расположение или упаковка α-спиралей в белках зависит от нескольких факторов. Одним из основных является принцип плотной упаковки, в соответствии с которым выступы на одной спирали должны входить во впадины на другой

и наоборот [1]. Это определяет дискретность значений углов Ω между осями спиралей, однако не отбирает одну из возможных ориентаций. Другим важным фактором является амфифильность α -спиралей в белках, т.е. наличие кластера гидрофобных боковых цепей на одной стороне спирали и гидрофильных боковых цепей на другой. Чтоб гидрофобные кластеры взаимодействовали между собой, а полярные боковые цепи между собой или с молекулами воды, имеется два основных способа упаковки амфифильных α -спиралей, – это так называемые упаковки «лоб-в-лоб» и «бок-о-бок» [2]. Это накладывает существенные ограничения на вращение α -спиралей друг относительно друга. С другой стороны, форма и размеры гидрофобных кластеров существенно влияют на отбор углов Ω между осями спиралей. Оптимальная упаковка α -спиралей достигается, если гидрофобные кластеры комплементарны друг другу. Так, например, если гидрофобные остатки спиралей находятся в позициях 1-4-8-11-15... (это так называемый гептадный повтор), то наиболее выгодная упаковка двух спиралей с такими кластерами достигается при $\Omega = 20^\circ$, а если гидрофобные остатки занимают позиции 1-4-8-12-15-19-23... (ундекатадный повтор) в обеих спиралах, то предпочтительным будет интервал углов $\Omega = 0^\circ - (-10^\circ)$. Еще одним фактором, от которого зависит взаимное расположение α -спиралей, является размер гидрофобных боковых цепей, образующих кластер и находящихся в зоне контакта между спиралами. Так, например, если в α -спиралах с гептадными повторами (abcdefg)_n а-позиции заняты большими, а d-позиции – малыми остатками, то отберется антипараллельная упаковка, в которой а-позиции одной спирали будут располагаться в углублениях, образованных d-позициями на другой и наоборот. Таким образом, отбор уникальных упаковок α -спиралей определяется совокупностью факторов, согласованных друг с другом. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-00453).*

1. Crick F.H.C. (1953) *Acta Crystallographica*. 6, 689–697.
2. Efimov A.V. (1999) *FEBS Lett.* 463, 3–6.

ВОДНО-ЛИПИДНОЕ ОКРУЖЕНИЕ – ВАЖНЫЙ ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ РАБОТЫ ИНТЕГРАЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

А.А. Полянский^{1,4}, П.Е. Волынский¹, Д.Е. Нольде^{1,2}, А.С. Кузнецов^{1,2,3}, Ю.А. Трофимов^{1,3}, Н.А. Крылов^{1,2,3}, А.О. Чугунов^{1,2,3}, Э.В. Бочаров^{1,3}, Р.Г. Ефремов^{1,2,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²НИУ «Высшая школа экономики», Москва; ³Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный; ⁴Университет Вены, Австрия

Помимо барьерной роли, биомембраны эффективно выполняют целый ряд специфических и тонко регулируемых функций, которые делают их не только незаменимыми для обеспечения нормальной жизнедеятельности клетки, но и являются чрезвычайно перспективными с точки зрения создания на их основе новых поколений лекарств. Одно из важнейших свойств клеточных мембран – модуляция работы интегральных мембранных белков (МБ) за счет влияния водно-липидного окружения на структурно-динамическое поведение их трансмембранных (ТМ) доменов. В настоящей работе на основании результатов вычислительных экспериментов проведен анализ физико-химических и динамических свойств ТМ доменов ряда рецепторных тирозинкиназ (РТК) и термочувствительных ионных каналов семейства TRPV, встроенных в модельные липидные мембраны различного состава. Установлено что локальные перестройки мембранного окружения играют важную роль в поведении ТМ доменов белков, вызывая специфическую кластеризацию и связывание липидов. Продемонстрировано влияние мембранного окружения на способность МБ осуществлять переходы между различными функциональными состояниями. Показано, что липиды вносят значительный вклад в свободную энергию ассоциации ТМ спиралей МБ, причем этот процесс имеет преимущественно энтропийный характер. Детальный баланс различных энергетических вкладов сильно зависит от состава мембраны и аминокислотной последовательности белка. Выявлена «триггерная» роль отдельных молекул липидов в открытии ионных каналов TRPV1 и TRPV3. Таким образом, МБ и их водно-липидное окружение определяют характер биологического поведения клеточных мембран, взаимно сильно влияя друг на друга и согласованно реагируя на внешние воздействия. *Работа по моделированию ТМ доменов РТК поддержана Российским научным фондом (18-14-00375-П). Работа по картированию свойств поровых доменов ионных каналов поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (19-04-00350).*

КОМПЛЕКС НЕЙРОТОКСИНА WTX С НИКОТИНОВЫМ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ $\alpha 7$ ТИПА В МЕМБРАННОМ ОКРУЖЕНИИ

Д.С. Кульбацкий¹, М.М. Заиграев¹, М.В. Кочаровская¹, Ю.М. Чесноков², Р.А. Камышинский², А.С. Парамонов¹, М.А. Шулепко¹, Е.О. Яблоков³, А.О. Чугунов¹, М.П. Кирпичников^{1,4}, З.О. Шенкарев¹, Е.Н. Люкманова^{1,4}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; ²НИЦ «Курчатовский институт»; ³НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ⁴Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы – лиганд-зависимые ионные каналы, широко представленные в нервной системе и клетках эпителия и иммунной системы. Никотиновый рецептор $\alpha 7$ типа ($\alpha 7$ -nAChR) представляет собой гомопентамер, содержащий пять сайтов связывания лигандов, располагающихся на интерфейсе между субъединицами во внеклеточном домене рецептора. $\alpha 7$ -nAChR рассматривается как перспективная мишень для лечения рака и когнитивных расстройств при болезни Альцгеймера, шизофрении и депрессии. В работе методами криоэлектронной микроскопии исследован комплекс внеклеточного домена $\alpha 7$ -nAChR с рекомбинантным аналогом необычного «слабого» нейротоксина (weak toxin, WTX) из яда кобры *Naja kaouthia*. WTX является трехпетельным белком, структура которого стабилизирована системой дисульфидных связей, расположенных в «голове» токсина. Анализ электронных изображений подтвердил гомопентамерную организацию внеклеточного домена, имеющего диаметр ~ 9 и высоту ~ 7 нм. На карте электронной плотности наблюдались дополнительные участки, соответствующие пяти молекулам WTX, расположенным на межсубъединичных интерфейсах домена. Вписывание известных пространственных структур внеклеточного домена и токсина WTX в полученную электронную

плотность позволило реконструировать структуру комплекса (хотя и с низким разрешением $\sim 8 \text{ \AA}$ из-за преимущественной ориентации частиц в толще льда) и определить топологию взаимодействия токсин-рецептор. Оказалось, что WTX взаимодействует с внеклеточным доменом $\alpha 7$ -nAChR с помощью петли II, при этом петля I и «голова» токсина, по-видимому, касаются поверхности липидного бислоя, окружающей рецептор. Методами компьютерного моделирования была построена модель комплекса полноразмерного рецептора $\alpha 7$ -nAChR с WTX в мембранном окружении, соответствующем нейрональной мембране. Молекулярная динамика в течение >1500 нс подтвердила стабильность комплекса. Предсказанный мембраноактивный сайт молекулы WTX включает остатки Lys13 и Arg18. Исследование WTX и его мутантов Lys13Ala и Arg18Ala методом ЯМР-спектроскопии подтвердило важность этих остатков для взаимодействия с липидными везикулами. Таким образом, впервые определен тип взаимодействия необычных нейротоксинов с nAChR. Работа выполнена при поддержке *Российского научного фонда (проект № 19-74-20163)*.

НЕКОТОРЫЕ ЛЮБОПЫТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ЗАМЕРЗАНИЯ ВОДЫ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ ЧУТЬ НИЖЕ 0°C

А.В. Финкельштейн^{1,2,3}, Б.С. Мельник^{1,2}

¹Институт белка РАН, Пущино; ²Биотехнологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Пущино; ³Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Рассмотрение кинетики замерзания показывает, что (i) при малых отрицательных температурах зарождение льда в объеме воде требует огромного времени и, следовательно, не может происходить ни в озерах, ни в живых клетках; (ii) зарождение льда при таких температурах требует наличия каких-то лёд-связывающих поверхностей, но (iii) даже такое образование льда может иметь место, как правило, только при температурах на несколько градусов ниже 0°C . Обсуждается специфическая форма лед-связывающей поверхности, которая может резко ускорить зарождение льда при практически нулевой температуре. *Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 21-14-00268)*.

НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА МЕХАНИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКА АНТИФРИЗА

Б.С. Мельник¹, К.А. Глухова¹, Е.А. Соколова², И.В. Балалаева², А.В. Финкельштейн¹

¹Институт белка РАН, Пущино; ²Институт биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

Изучение адаптации различных организмов к отрицательным температурам - весьма интересная задача для биологии и биотехнологии. Однако многие «приемы», которые применяют клетки для выживания при отрицательных температурах, до сих пор не понятны. Известно, например, что белки-антифризы, связывающие лед, отвечают за адаптацию организмов к сверхнизким температурам, но механизм их действия все еще не понятен. В данной работе мы исследовали лед-связывающий белок cfAFP из *Choristoneura fumiferana*: исследовали влияние cfAFP на температуру замерзания воды и температуру плавления льда; провели теоретические расчеты и ответили на вопрос - когда, где и почему может образоваться лед; провели эксперименты по определению локализации белка cfAFP из *Choristoneura fumiferana* в клетке. Наши данные позволяют предположить, что задача белков-антифризов состоит не в том, чтобы связываться с уже образовавшимися в клетке кристаллами льда и останавливать их рост, а в том, чтобы связываться с теми поверхностями клеток, где могут образоваться зародыши льда, и тем самым полностью предотвращать образование льда. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РФ № 21-14-00268)*.

ВНУТРЕННЯЯ НЕУПОРЯДОЧЕННОСТЬ В БЕЛКАХ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ИХ СТАБИЛИЗАЦИИ

Т.Н. Мельник, В.Р. Веселова, К.А. Глухова, Г.С. Нагибина, Б.С. Мельник *Институт белка РАН, Пущино*

Стабильность структуры белков в широком диапазоне изменения внешних условий (температуры, pH, концентрации денатуранта) является важным фактором, связанным с эффективностью функционирования белков. Соответственно, умение направленно влиять на стабильность белков может помочь в решении многих проблем современной биотехнологии. Направленная стабилизация глобулярных белков путем замещения минимального числа аминокислотных остатков является одной из наиболее сложных экспериментальных задач. В этой работе мы успешно использовали алгоритмы для оценки предрасположенности аминокислотной последовательности белка к внутренней неупорядоченности (такие как PONDR@FIT и IsUnstruct) в качестве инструментов поиска «ослабленных» областей в структурированных глобулярных белках. Мы показали, что «ослабленные» области, обнаруженные этими программами как области с наиболее высоким уровнем внутренней неупорядоченности, являются подходящими мишенями для введения стабилизирующих замен. Используя этот подход, мы получили стабильные мутантные формы нескольких глобулярных белков, таких как Gao (1), GFP (2), рибосомный белок L1(3) и апикальный домен GroEL (4). *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 19-04-00420)*.

1. Nagibina G.S., Tin U.F., Glukhov A.S., Melnik T.N., Melnik B.S. Intrinsic Disorder-Based Design of Stabilizing Disulphide Bridge in Gao Protein. *Protein Pept Lett.* 2016;23(2):176-84
2. Melnik B.S., Povarnitsyna T.V., Glukhov A.S., Melnik T.N. and Uversky V.N. SS-stabilizing proteins rationally: Intrinsic disorder – based design of stabilizing disulphide bridges in GFP. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics.* 2012. 29(4): 817-24.
3. Нагибина Г.С., Марченков В.В., Глухова К.А., Мельник Т.Н., Мельник Б.С. Проверка подхода к созданию стабильных форм белков, основанного на предсказании нативно-развернутых участков, на примере рибосомных белков L1. *Биохимия*, 2020, 85(1).
4. Nagibina GS, Glukhova KA, Uversky VN, Melnik TN, Melnik BS. Intrinsic Disorder-Based Design of Stable Globular Proteins. *Biomolecules* 2020, 10(1), 64.

СТРУКТУРА ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ: РОЛЬ ИОНОВ ЦИНКА И КОНФОРМАЦИЯ ПРИМЕМБРАННЫХ РЕГИОНОВ

К.С. Минеев, М.В. Гончарук, В.А. Лушпа, Ф.Д. Корнилов, А.В. Шабалкина, С.А. Гончарук, А.С. Арсеньев

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

Толл-подобные рецепторы (TLR) - важнейшие участники системы врожденного иммунитета. TLR распознают характерные молекулы ряда патогенов (элементы клеточной стенки бактерий, РНК/ДНК вирусов и пр.) и активируют клетки иммунной системы. Важная роль TLR показана в развитии ряда аутоиммунных заболеваний и злокачественных опухолей, что делает рецепторы перспективной мишенью для разработки новых лекарств. TLR - типичные представители семейства мембранных белков I класса – они содержат массивные вне- и внутриклеточные домены, при этом их трансмембранная часть представлена одной гидрофобной α -спиралью. Активны TLR исключительно в состоянии гомо- или гетеродимеров. Структура внеклеточных доменов TLR достаточно хорошо изучена, в то время как структурная организация их трансмембранных и внутриклеточных доменов известна лишь для нескольких членов семейства. В представленной работе пространственная структура трансмембранных регионов, цитоплазматических примембранных участков и внутриклеточных TIR доменов TLR исследовалась методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. В бислой-соединяющих мембраноподобных средах были определены пространственные структуры трансмембранных и примембранных доменов пяти TLR, а также структура TIR домена TLR1. Для TIR домена TLR1 была показана способность связывать ионы цинка с нанолекарственной афинностью, идентифицирован сайт связывания. При помощи функциональных тестов было выявлено, что остатки, отвечающие за взаимодействие с цинком, являются ключевыми для активации рецептора TLR1/TLR2. Полученные данные позволяют заполнить ряд "белых пятен" в области структурной биологии толл-подобных рецепторов, построить модели полноразмерных белков.

ИССЛЕДОВАНИЯ КРУПНЫХ БЕЛКОВ МЕТОДАМИ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

В.И. Польшаков¹, С.С. Марьясина^{1,2}, А.Б. Манцызов¹, Р.С. Романов², С.В. Ефимов³, В.И. Тишков², П.В. Сергиев²

¹Факультет фундаментальной медицины и ²Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Институт физики, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Спектроскопия ЯМР – один из важнейших биофизических методов, предоставляющих уникальную информацию о строении белков в растворе, их динамических свойствах, а также о межмолекулярных взаимодействиях, в которых они участвуют. Вместе с тем, традиционные методы ЯМР позволяют изучать лишь сравнительно небольшие биомолекулы. Для изучения белков с молекулярной массой более 30–35 кДа необходимо их дейтерирование, использование специальных методов изотопного обогащения и методик измерения спектров ЯМР, а также использование парамагнитных зондов. В докладе представлены результаты изучения методами спектроскопии ЯМР полноразмерного фактора терминации трансляции eRF1 человека (50 кДа), формилатдегидрогеназы *Staphylococcus aureus* (димер 84 кДа) и неорганической пирофосфатазы из *Mycobacterium tuberculosis* (гексамер, 105 кДа). Для каждого из этих белков разработаны оптимальные методы изотопного обогащения, позволившие получить спектры ЯМР высокого качества и выполнить отнесение сигналов ¹H, ¹⁵N и ¹³C белковых цепей. Для изучения крупных метилтрансфераз (МТаз), прочно связывающих кофактор S-аденозил-L-метионин (SAM), синтезирована серия новых производных SAM, содержащих спиновые метки. Изучено связывание синтезированных соединений с метилтрансферазой WBSR27, ассоциированной с синдромом Вильямса–Бойрена. *Исследование поддержано грантами РФФИ № 19-14-00115 и РФФИ № 20-04-00318.*

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРОЕНИЯ ВИРУСОВ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИХ С КЛЕТКАМИ ХОЗЯИНА

О.С. Соколова¹, А.В. Моисеенко¹, Т.С. Трифонова¹, П.А. Зайцев¹, А.М. Егоров², О.В. Шабурова³, В.Н. Крылов³, М. Якунина⁴, М.П. Кирпичников¹

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва; ²Федеральный научный центр исследований и разработки иммунологических и биологических продуктов им. М.П. Чумакова РАН, Москва; ³НИИ институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; ⁴Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Аналитическая электронная микроскопия позволяет определить элементный состав исследуемых образцов. Биологические образцы при облучении высокоэнергичными электронами в микроскопе часто испытывают радиационное повреждение. Особенно критично оно для мелких частиц, таких как вирусы, когда сохранность объекта изучения становится решающим фактором. В результате повреждения информация о тонких деталях объекта исследования оказывается утерянной. Мы предложили подход для исследования распределения химических элементов в биологических нано-объектах при очень низких содержаниях искомого элемента. Для этого образец контрастировали молибдатом аммония и помещали в держатель с охлаждением (JEOL), после чего охлаждали до -180С. Охлаждение позволило минимизировать радиационное повреждение и проводить сбор данных на протяжении длительного времени без разрушения образцов. Образцы просматривались в аналитическом микроскопе JEOL2100 (JEOL). Элементный анализ образца методом ЭДРС проводили с использованием рентгеновского детектора X-Max (Oxford Instruments, Великобритания). Энергодисперсионные рентгеновские спектры от выбранных точечных участков образца регистрировали в диапазоне энергий рентгеновского излучения от 0 до 10 кэВ в режиме светлопольной СПЭМ. Регистрацию и обработку энергодисперсионных спектров проводили в режиме «Point&ID» в программе INCA (Oxford Instruments, Великобритания). Полученные спектры приводили в диапазоне 0,15–4 кэВ, в который входят наиболее интенсивные пики всех биологически значимых элементов и Mn. Спектры от различных пикселей выравнивали по углеродному краю К. Разработанный подход был применен к исследованию структур инактивированных вирусов и изучению взаимодействия вирусов с клеткой-хозяином. *Работа поддержана РФФИ (№20-04-60258). Электронная микроскопия выполнена на Уникальной установке «3D-EMC» МГУ.*

ГЛУБОКОЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

С.С. Терехов^{1,2}, И.В. Смирнов^{1,2}, А.Г. Габиров^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Мир живых систем наполнен множеством молекулярных взаимодействий и невероятно сложен для детального анализа. Исследования взаимодействий организмов с использованием классических методов направлены на изучение неких эффектов, усредненных в популяции, что дает весьма искаженную картину, полную артефактов. Современные методы, основанные на принципах компартиментализации и детальном высокопроизводительном анализе индивидуальных биологических объектов, лишены этих недостатков и позволяют осуществлять глубокое фенотипическое и генотипическое профилирование биоразнообразия. Применяя принципы компартиментализации к разнообразным биологическим объектам, мы показали, что они не только позволяют наиболее эффективно сохранить биоразнообразие, но также являются незаменимым инструментом для поиска уникальных представителей с заданной функциональностью. Ввиду своей универсальности, данная концепция была эффективно использована для глубокого функционального профилирование природного и синтетического биоразнообразия. Инкапсулируя индивидуальные клетки в капли эмульсии, нами была проведена направленная эволюция ферментов, поиск антибиотиков и пробиотиков, персонализированный скрининг антибиотикорезистентности, а также реконструкция природного репертуара антител человека. Полученные результаты свидетельствуют о том, что технологические платформы, основанные на принципах компартиментализации и ультравысокопроизводительного скрининга, позволяют перейти на новый уровень понимания функционирования живых систем и сообществ организмов. *Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ 21-14-00357.*

ГЕНОКОДИРУЕМЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЛИГАНДЫ Kv1-КАНАЛОВ НА ОСНОВЕ АГИТОКСИНА 2 И ИХ СВОЙСТВА

А.В. Феофанов^{1,2}, А.Л. Примак^{1,2}, А.А. Игнатова¹, О.В. Гераскина², К.С. Кудряшова¹, М.П. Кирпичников^{1,2}, О.В. Некрасова¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Калиевые потенциал-чувствительные (Kv) каналы, функционирование которых направлено на поддержание трансмембранного потенциала клетки, играют важную роль в различных клеточных процессах, включая проведение нервного импульса, пролиферацию и индукцию апоптоза. Высокоаффинные и селективные пептидные блокаторы являются традиционными молекулярными инструментами для изучения Kv-каналов и направленной коррекции их активности. Пептидные блокаторы канала Kv1.3 рассматриваются как перспективные лекарственные средства при аутоиммунных заболеваниях. Пептидные блокаторы используются для создания флуоресцентных зондов, применяемых в исследованиях Kv-каналов, а также при поиске и оценке аффинности новых блокаторов. Такие зонды получают в виде «классических» конъюгатов с органическими флуорофорами, или с недавнего времени в виде генотипируемых конструкций, содержащих в своем составе флуоресцентные белки. На основе агитоксина 2 (AgTx2, пептид из яда скорпиона *Leiurus* sp.), слитого с GFP, сконструированы флуоресцентные зонды и изучено влияние их структурной организации на аффинность в отношении каналов Kv1.x (x=1, 3, 6). Зонды GFP-AgTx2 отличались N- или C-концевым положением GFP, наличием/отсутствием 6His-тага, а также линкерными последовательностями между GFP и AgTx2. Аффинность генотипируемых лигандов изучена с использованием биоинженерной клеточной системы на основе гибридных калиевых каналов KcsA-Kv1.x (x=1, 3, 6) методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ). Обнаружено, что N-концевое положение GFP придает зонду селективность к каналу Kv1.3, а перемещение GFP на C-конец AgTx2 обеспечивает высокоаффинное взаимодействие зонда с сайтами связывания каналов Kv1.x (x=1, 3, 6). Продемонстрировано, что высокоаффинный и селективный к Kv1.3-каналу GFP-AgTx2 может быть использован для скрининга лигандов этого канала, а также для флуоресцентного имиджинга Kv1.3-каналов на мембране клеток. *Работа поддержана грантом РНФ 19-74-30014.*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА Cas9 С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ: СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

А.А. Черноносков¹, П.В. Жданова^{1,2}, Г.А. Степанов¹, А.А. Ломзов¹, В.В. Коваль^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

В настоящее время для редактирования генома широко используется система CRISPR-Cas9, состоящая только из белка Cas9 и одноцепочечной направляющей РНК (sgRNA), которая представляет собой гибридную химерную форму комплекса crRNA и tracrRNA. Для применения системы CRISPR-Cas9 в задачах геномного редактирования требуется очень высокая селективность и специфичность узнавания и расщепления целевой двуцепочечной цепи ДНК эндонуклеазой Cas9. Строго говоря, специфичность расщепления ДНК с помощью Cas9 – краеугольный камень в создании и применении систем геномного редактирования. Поскольку избирательность Cas9 является следствием комплементарности направляющей РНК к ДНК, а не модификации самого белка, то за селективность узнавания в комплексе отвечает комплементарность НК; а за специфичность расщепления ДНК отвечают аминокислоты Cas9, которые участвуют в «прочтении» ДНК. В настоящее время недостаточно информации об изменении структуры Cas9 при неполной комплементарности ДНК мишени, и регуляции самой эндонуклеазной активности Cas9. В данной работе мы изучили структурные изменения фермента Cas9 при взаимодействии с нуклеиновыми кислотами методом масс-спектрометрии, основанном на водородно-дейтериевом обмене иминопотонов в белках/нуклеиновых кислотах на изотоп дейтерия из раствора, определили термодинамические параметры такого взаимодействия методом изотермической титрационной калориметрии и провели компьютерное моделирование с учетом полученных данных. Такой подход позволяет исследовать структурно-динамические факторы специфичности и селективности узнавания эндонуклеазой Cas9 целевых последовательностей ДНК в системах геномного редактирования, что актуально для использования системы CRISPR-Cas9 в генной инженерии. *Работа выполнена при поддержке РНФ (20-04-00214).*

ТЕМПЕРАТУРНЫЙ СЕНСОР TRPV1: КОМПЬЮТЕРНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ

А.О. Чугунов^{1,2}, К.И. Лубова¹, П.Е. Волынский¹, Н.А. Крылов¹, Д.Е. Нольде¹, Я.А. Андреев^{1,3}, Р.Г. Ефремов^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²НИУ «Высшая школа экономики»;

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва

Жарочувствительный ионный канал TRPV1 — один из наиболее изученных эукариотических белков, отвечающих за температурное чувство. При нагревании >43 °С он быстро, но обратимо открывает пору, проницаемую для ионов Ca²⁺, что приводит к деполяризации нейронов и запускает распространение потенциалов действия. Лежащие в основе этого молекулярные механизмы и конформационная перестройка порового домена канала представляют несомненный теоретический и прикладной интерес, поскольку дают возможность влиять на терморегуляцию всего организма. Несмотря на то, что структуры открытого (О) и закрытого (З) состояния канала были недавно получены методом криоэлектронной микроскопии, тонкие детали перехода между этими состояниями остаются непонятными.

Мы использовали расчеты молекулярной динамики (МД) центральной части канала TRPV1 (без N-концевых анкериновых повторов и C-концевого цитоплазматического участка) в явно заданной липидной мембране, чтобы изучить конформационные особенности О- и З-состояний, а также переходов между ними, которые наблюдаются в рассчитанных траекториях МД благодаря длительному времени расчета (в сумме более 10 мкс), а также нескольким повторным расчетам при разных температурах (как ниже, так и выше температуры активации). Обнаружилось, что поровой домен и близлежащие петли претерпевают существенную перестройку в зависимости от температуры, причем эффект асимметричный — его можно приписать главным образом одной субъединице канала из четырех, что отличается от общепринятой модели «диафрагмы» открывания ионных каналов [1]. Анализ структурных, динамических и гидрофобных параметров поры канала в процессе активации показал рост конформационной энтропии, что находится в соответствии с современными идеями температурной чувствительности белков [1].

В дальнейшем мы изучили роль нескольких аминокислотных остатков порового и TRP-доменов: G643 («узкое место» верхних ворот поры), I679/A680 (нижние ворота) и K688 («передатчик» конформационных изменений из TRP домена в поровой). Предсказанная на основе исходной МД, эта роль была подтверждена в биохимических экспериментах на рекомбинантных мутантных каналах по активации канала температурой и лигандом (капсаицином), а соответствующие молекулярные механизмы были изучены в дополнительных расчетах МД мутантных каналов [2].

В совместных компьютерных и биохимических экспериментах мы получили реалистичную модель канала TRPV1, пригодную для дальнейшего изучения этого молекулярного сенсора температуры.

1. Chugunov A.O., Volynsky P.E., Krylov N.A., Nolde D.E., Efremov R.G. (2016). Temperature-sensitive gating of TRPV1 channel as probed by atomistic simulations of its trans- and juxtamembrane domains. *Sci. Rep.* 6, 33112
2. Lubova K.I., Chugunov A.O., Volynsky P.E., Korolkova Y.V., Mosharova I.V., Kozlov S.A., Andreev Ya.A., Efremov R.G. (2020). Probing Temperature and Capsaicin-Induced Activation of TRPV1 Channel via Computationally Guided Point Mutations in its Pore and TRP domains. *Int. J. Biol. Macromol.* 158, 1175-1183.

К ВОПРОСУ *AB INITIO* ВОССТАНОВЛЕНИЯ 3D ФОРМЫ И ЭЛЕКТРОННОЙ ПЛОТНОСТИ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

П.В. Конарев¹, Д.И. Свергун²

¹ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва; ²Европейская молекулярная биологическая лаборатория, Гамбург, Германия

Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) широко используется для изучения биологических макромолекул в растворе и позволяет восстановить *ab initio* 3D форму частиц с низким разрешением. В работе [1] был предложен итеративный алгоритм DENSS, который реконструирует *ab initio* 3D карту электронной плотности частиц по данным МУРР. Было заявлено, что метод работает не только для однородных белковых систем, для которых уже имеются эффективные алгоритмы восстановления 3D формы частиц, такие как DAMMIN и DAMMIF [2,3], но и для многокомпонентных систем с неоднородной электронной плотностью. Однако, в работе [4] нами было показано, что реконструкция электронной плотности от таких систем алгоритмом DENSS приводит к существенным артефактам, при которых более высокая электронная плотность оказывается расположенной в центральной части структуры. Этот эффект проявляется как при моделировании комплексов белок-ДНК, которые являются типичными представителями биологических неоднородных систем, так и для эллипсоидных неоднородных частиц. Такое поведение алгоритма DENSS обусловлено интенсивным использованием усреднения индивидуальных восстановлений электронной плотности, при котором учитывается как когерентно рассеивающий объем образца, так и некогерентно рассеивающая часть буферного раствора, окружающего частицу. Кроме того, малоугловая кривая, рассчитанная по усредненной 3D карте электронной плотности, дает существенные систематические отклонения от экспериментальных данных МУРР. Более надежное моделирование многокомпонентных систем следует проводить с помощью алгоритма MONSA при одновременном использовании нескольких кривых МУРР (от комплекса и его отдельных частей, либо с помощью метода вариации контраста) [5]. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

1. Grant, T. D. (2018) *Nature Methods*, V. 15, p. 191–193
2. Svergun, D. I. (1999) *Biophys. J.*, V. 76, p. 2879–2886
3. Franke, D., Svergun, D. I. (2009) *J. Appl. Cryst.*, V. 42, p. 342–346
4. Konarev, P.V., Svergun, D.I. (2021) *Nature Methods*, DOI: 10.1038/s41592-021-01082-x
5. Svergun, D. I., Nierhaus, K. H. (2000) *J. Biol. Chem.*, V. 275, p. 14432–14439

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИБРИЛЛООБРАЗУЮЩИХ ПЕПТИДОВ СПЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА

Д.А. Санчугова, А.Г. Бикмуллин, В.В. Клочков, Д.С. Блохин

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Около пятнадцати лет назад, в поисках факторов спермы, которые модулируют инфекцию ВИЧ, было продемонстрировано, что сперма содержит амилоидные фибриллы, способные заметно увеличивать уровень заражения ВИЧ-инфекцией [1]. Обнаруженные фибриллы образуют электростатический мостик, который преодолевает отрицательные отталкивания между вирусной и клеточной мембраной, что приводит к увеличению скорости проникновения вирусной инфекции. Это открытие создало новые возможности для предотвращения передачи ВИЧ половым путем. Особый интерес представляет собой установление механизма образования фибрилл на молекулярном уровне. Для решения этой задачи необходима информация о пространственной структуре составных частей фибрилл. На сегодняшний день, известно, что амилоидные фибриллы спермы образуются из небольших пептидных фрагментов белков PAP (простатическая кислая фосфатаза), семеногелина 1 (SEM1) и семеногелина 2 (SEM2) [3]: PAP(248–286), PAP(85–120), SEM1(45–107), SEM2(45–107), SEM1(49–107), SEM2(49–107), SEM1(68–107), SEM2(68–107) и SEM1(86–107). Ранее группой N.R.Roan и др. было установлено строение пептида PAP(248–286)[4], а нашей группой - строение пептида SEM1(86–107) [5]. В рамках дальнейшей работы нами поставлена задача по определению пространственной структуры остальных фибриллообразующих пептидов спермы. В качестве методов исследования использованы спектроскопия ЯМР и молекулярная динамика. На данный момент установлено, что амилоидные пептиды не структурированы и содержат небольшие спиральные фрагменты (α , 310-спирали). Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (Д.С. Блохин, проект № 20-73-10034).

1. P. Rusert, et al., *Virology*, 2004, 326(1): p. 113-129.
2. S.R. Sheftic, et al., *Eur. Biophys. J.*, 2012, 41, 695—704
3. N.R. Roan, et al., *Cell Host Microbe*, 2011, 10, 541–550.
4. J.R. Brender, et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1808, 1161-1169.
5. D. Sanchugova, et al., *BioNanoScience*, 2021, 11, 182-188.

СТРУКТУРА П-МОТИВА В ОБ-ФОЛДЕ

Е.В. Бражников, А.В. Ефимов

Институт белка РАН, Пущино

Проведен анализ петлевых участков в β - α - и α - β - дугах для большой выборки ОБ-фолдов. Этот фолд впервые был описан Мурзиным и потом обнаружен во многих глобулярных белках, гомологичных и негомологичных. Он состоит из 70-150 аминокислотных остатков, уложенных в два β -листа, которые образуют 6-ти тяжевый β -барель. Во многих ОБ-фолдах два β -тяжа в участке белка, в котором полипептидная цепь переходит из одного β -слоя в другой, соединяются α -спиралью. При этом переходе β -тяжи упакованы в разных слоях под углом 270 град, в отличие от $\beta\alpha\beta$ -единицы, П- и L-модулей, где они упакованы под острым углом, параллельно или под углом 90 градусов, соответственно [1,2]. Большинство ОБ-фолдов содержат СП-мотивы, которые замкнуты β -тяжем. Поэтому такую структуру мы назвали СП β -модулем. Исследуемые белки получены из PDB-банка с помощью программы SCOP. Из 26 суперсемейств исследовано 265 представительных белков и доменов, из которых отобраны 72 негомологичных белков с разрешением не менее 2.5 А. Гомологию белков определяли с помощью программы BLAST. Оказалось, что в ОБ-фолде длина переходной спирали может быть от нуля до 16 остатков, а в некоторых случаях она отсутствует. Обнаружено, что последний остаток первого тяжа перед спиралью в половине случаев имеет конформацию β (P). В 26% случаях это серин. Мы не обнаружили ни одного глицина в этом положении. Последние 3 остатка при входе во 2-й тяж в большинстве случаев имеют конформацию $\beta\gamma$ (L) β (P). Чаще других (85%) в конформации γ (L) встречаются глицины. Важно отметить, что вход в спираль происходит без напряженных конформаций аминокислотных остатков, тогда как вход во второй тяж не может формироваться без напряжения («запрещения»). Полученные данные важны для моделирования и предсказания пространственной структуры белков. Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00453.

1. Efimov A.V. Structural motifs in which β -strands are clipped together with the П-like module // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 2017, v.85, 1925-1930.
2. Каргатов А.М., Бражников Е.В., Ефимов А.В. L-модули в SH3-подобных фолдах: Структура и особенности последовательностей // *Мол. биол.*, 2018, т. 52, с. 1074-1081.

ВСТРЕЧАЕМОСТЬ И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ $\beta\alpha$ -ДУГ С ПЕТЛЯМИ РАЗЛИЧНЫХ КОНФОРМАЦИЙ В РАСЩЕПЛЕННЫХ И НЕРАСЩЕПЛЕННЫХ $\beta\alpha\beta$ -ЕДИНИЦАХ

А.М. Каргатов

Институт белка РАН, Пущино

$\beta\alpha$ -Дуга состоит из β -тяжа и идущей за ним α -спирали, соединенных петлей и расположенных в разных слоях ($\alpha + \beta$)- и $\alpha\beta$ -белков. $\beta\alpha$ -дуги входят в состав многих структурных мотивов, простейшим из которых является $\beta\alpha\beta$ -единица. $\beta\alpha\beta$ -Единица состоит из двух β -тяжей, параллельно упакованных в составе общего β -листа и соединенных с помощью одной или нескольких α -спиралей. В подавляющем большинстве случаев полипептидная цепь $\beta\alpha\beta$ -единицы образует правую суперспираль. β -Тяжи, входящие в состав $\beta\alpha\beta$ -единицы, могут лежать рядом или разделяться одним или несколькими β -тяжами, обра-

зую в первом случае нерасщеплённую $\beta\beta$ -единицу, а во втором – единожды, дважды и т.д. расщеплённую. Как показало исследование, $\beta\alpha$ -дуги с петлями определённых конформаций имеют разную встречаемость в расщеплённых и нерасщеплённых $\beta\beta$ -единицах, что отчасти является следствием различий в стрессии этих $\beta\beta$ -единиц, а отчасти – ролью петлей в формировании их структуры. Так, структура нерасщеплённой $\beta\beta$ -единицы позволяет петле иметь конформацию «е» только в том случае, если ближайшая к ней внутренняя аминокислотная позиция β -тяжа, а также вторая и третья позиции α -спирали (без учёта N-кэпа) заняты глицинами или маленькими остатками, позволяющими β -тяжу и α -спирали сближаться сильнее обычного. Петли с конформациями « $\epsilon\alpha\beta$ », « $\epsilon\delta\beta$ » и « $\alpha\text{La}\alpha\beta$ » практически не встречаются в расщеплённых $\beta\beta$ -единицах, а в нерасщеплённых так же требуют маленького остатка в третьей позиции α -спирали. Ещё одной интересной особенностью является встречаемость петли Уолкера («Walker A motif», «P-loop») только в $\beta\alpha$ -дугах расщеплённых $\beta\beta$ -единиц и её полное отсутствие в нерасщеплённых, что говорит о вероятном влиянии этой петли на отбор расщеплённых мотивов. *Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00453*

СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ИНГИБИТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕНТАМИДИНА НА ЛАТЕНТНЫЙ МЕМБРАННЫЙ БЕЛОК 1 ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР

Э.Ф. Кот^{1,2}, А.С. Гончарук¹, И. Ванг³, Б. Жанг³, А.С. Арсеньев¹, С. Ванг³, К.С. Минеев¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный; ³Чаньчуньский институт прикладной химии, Чаньчунь, Китай

Латентный мембранный белок LMP1 закодирован в геноме вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), которым в настоящее время инфицировано около 95% людей. Этот вирус может асимптоматически заражать В-лимфоциты и некоторые другие клетки. ВЭБ также способен вызывать злокачественные заболевания крови, в которых LMP1 играет ключевую роль: он мимикрирует под рецептор CD40, запуская те же каскады без внешнего стимула и вызывая пролиферацию В-клеток. Согласно недавним исследованиям, LMP1 активен только в олигомерной форме. Кроме того, его 5-й трансмембранный домен (ТМД-5) необходим для олигомеризации, а ключевую роль играет остаток D150. Было обнаружено несколько соединений, разрушающих олигомеры ТМД-5 и ингибирующих действие LMP1 в модельных системах, в том числе антимикробное лекарство пентамидин. В представленной работе ТМД-5 используется в качестве упрощенной модели LMP1 для изучения олигомеризации белка и влияния на него потенциального лекарства. Разработан метод на основе спектроскопии ЯМР высокого разрешения, позволяющий рассчитывать порядок олигомера из интенсивностей кросс-пиков различных форм белка. Метод был применен для анализа равновесия ТМД-5 в различных условиях. В мицеллах DPC ТМД-5 находится в сложном равновесии между несколькими олигомерами, которые гораздо стабильнее у белка с депротонированным остатком D150, чем с протонированным. Пентамидин взаимодействует с ТМД-5, смещая равновесие в сторону олигомеров низкого порядка. Полученные результаты указывают на необходимость и перспективность дальнейших исследований трансмембранных лекарств, способных нарушать латеральные взаимодействия мембранных белков. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 19-74-30014).*

ВЛИЯНИЕ ЛИНКЕРНОГО ГИСТОНА H1.0 НА СТРУКТУРУ НУКЛЕОСОМ

Н.В. Малюченко¹, Д.О. Кошкина¹, А.В. Феофанов^{1,2}, В.М. Студитский^{1,3}

¹Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ³Центр исследований рака Фокс Чейз; Филадельфия, США

Хроматин эукариот является сложной иерархической структурой, функционирование которой определяется взаимодействием между ДНК и ДНК-связывающими белками. Гистоны выступают важнейшими компонентами данной системы, формируя функциональные единицы хроматина – нуклеосомы и хроматосомы, в составе которых они регулируют транскрипционную и репликационную активность генома. Линкерные гистоны семейства H1 связываются с участками ДНК, расположенными между нуклеосомами, способствуя упаковке хроматиновых нитей высшего порядка и формированию неактивного хроматина. Нарушения взаимодействий H1 в хроматине приводят к глобальной дерегуляции генов, и, как следствие, к опухолевой трансформации и аномалиям эмбрионального развития. Это определяет необходимость детального исследования функций гистонов H1. Для исследований методом *spFRET* структурных изменений, происходящих под действием H1.0 в нуклеосоме и линкерных областях нами созданы конформационно-чувствительные флуоресцентные сенсоры. Для этого синтезировали 603 и 601 нуклеосом-позиционирующие матрицы с введенными в различные положения ДНК парами меток Су3 и Су5. При укладке ДНК на октамере гистонов метки располагались на расстояниях, позволяющих регистрировать изменения эффективности FRET при структурных изменениях, происходящих в меченых областях. Комплексообразование нуклеосом с гистоном H1.0 изучали методом электрофореза в нативном ПААГ. Установлено, что связывание H1.0 с нуклеосомами происходит в наномолярном диапазоне концентраций в соотношении 1:1. При формировании комплекса с H1.0 обнаружено сближение линкерных участков ДНК, а также изменение укладки ДНК на октамере гистонов, которое затрагивает как краевые, так и более глубокие (не менее 35 п.н. от входа ДНК в нуклеосому) области нуклеосомной ДНК. С использованием мутантных форм H1.0 установлено, что C-концевой домен значительно увеличивает аффинность связывания H1.0 с нуклеосомами и облегчает структурные изменения в коровой области нуклеосом. Предполагается, что конформационные перестройки под действием H1.0 изменяют участки нуклеосомной ДНК, доступные для взаимодействия с белковыми факторами в хроматосомах по сравнению с нуклеосомами и необходимы для оптимального формирования хроматиновых структур высшего порядка. *Работа поддержана проектом РНФ №19-74-30003*

ЗАКОНОМЕРНОСТИ СТРОЕНИЯ АГОНИСТОВ И АНТАГОНИСТОВ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕМИСПИРАЛЬНЫХ АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ

О.В. Мещерякова¹, А.В. Ефимов²

¹Институт биологии КарНЦ РАН, Петрозаводск; ²Институт белка РАН, Пущино

Рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCRs), составляют самое большое семейство рецепторов клеточных мембран человека, в составе которого более 800 различных белков. Они являются мишенями, по крайней мере, для 30% современных лекарств. На сегодняшний день исследованы трехмерные структуры многих GPCRs, однако структурные особенности их лигандов, обуславливающие механизм действия, еще недостаточно выяснены. В работе изучены структурные особенности и физико-химические свойства лигандов, определяющие селективность, связывание и активацию адренорецепторов. Собрана база данных из более чем 250 лигандов α - и β -адренорецепторов, включающая структуры агонистов и антагонистов, а также комплексы рецепторов с лигандами, структуры которых определены (более 60 структур из PDB).

Как показывает анализ, молекулы агонистов адренорецепторов имеют гидрофобную «головку» (обычно – одно или редко два ароматических кольца) и «хвостик» с положительной заряженной аминокислотой. Гидрофобная «головка» имеет один-два донора или акцептора H-связей для связывания с ТМ-спиралью 5, а аминокислота во многих случаях имеет алкильные заместители для усиления положительного заряда. Практически во всех молекулах агонистов β -рецепторов и в большинстве агонистов α -рецепторов между ароматическим кольцом «головки» и атомом азота в «хвостике» находятся два атома углерода. В молекулах антагонистов это расстояние увеличено, например, за счет добавления в «хвостик» атомов углерода и кислорода. Кроме этого, в антагонистах, как правило, отсутствуют доноры/акцепторы на «головках». Еще одно отличие антагонистов состоит в том, что их «головки» часто состоят из двух, трех и даже четырех колец. Таким образом, молекула агониста взаимодействует с рецептором в сайте связывания, расположенном в углублении между ТМ-спиралями 3, 5, 6 и 7, приобретает вытянутую конформацию и взаимодействует с консервативным остатком триптофана 6.48. В результате этого ТМ-спирали 3, 5 и 7 немного сближаются, и агонист фиксирует ТМ-спираль 6 в активированном состоянии. Все это приводит к открыванию центра связывания с G-белком на внутренней стороне рецептора. Увеличенная длина «хвостика» антагониста и отсутствие доноров/акцепторов на его «головке» такого эффекта не оказывают. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-00453).*

ИЗМЕНЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ И ПРЕДСКАЗАНИЕ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОСТИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

Ю.А. Мокрушина^{1,2}, А.В. Головин^{1,2}, А.В. Степанова¹, С.О. Пипия¹, С.С. Терехов^{1,2}, А.В. Степанов¹, А.А. Белогуров^{1,2}, И.В. Смирнов^{1,2}, А.Г. Габибов^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Энантиоселективность является одной из важных характеристик ферментативных реакций и лиганд-рецепторных взаимодействий. Разные энантиомеры наркотических веществ и фосфорорганических соединений (ФОС) проявляют различную токсичность. В настоящем исследовании предложен новый комбинированный метод QM/MM и моделирование метадинамики с вороночным потенциалом, позволяющий создавать биологические антитела на основе биокатализаторов, направленно увеличивая их реакционную способность, и прогнозировать стереоселективность. Предложенный вычислительный алгоритм открывают перспективы для индивидуального дизайна не только модельных антител, но и других функционально востребованных членов суперсемейства иммуноглобулинов, включая направленную модификацию клеточных рецепторов. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-74-30019.*

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ЛИГАНДОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА НА ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С АМИЛОИДНЫМ β -ПЕПТИДОМ

Е.Л. Немашкалова, Е.Л. Литус, А.С. Казаков, Е.И. Дерюшева, М.П. Шевелёва, А.А. Назипова, М.Е. Пермякова, Е.В. Разникова, С.Е. Пермяков

Институт биологического приборостроения РАН – обособленное подразделение ФИЦ БПНЦБИ РАН, Пущино

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) – мажорный внеклеточный белок, способный переносить множество эндогенных и экзогенных лигандов. В сыворотке крови и спинномозговой жидкости ЧСА выполняет функцию депо амилоидного β -пептида (А β), одного из основных участников патогенеза болезни Альцгеймера (БА). Показано, что замена сыворотки на очищенный препарат ЧСА позволяет ускорить выведение А β из центральной нервной системы пациентов с БА. Альтернативный подход к ускорению клиренса А β – применение лигандов ЧСА, усиливающих его сродство к А β . В нашей работе методом поверхностного плазмонного резонанса изучено влияние лигандов ЧСА, ассоциированных с развитием БА (Cu²⁺, олеиновая (ОК), линолевая (ЛК), арахидоновая (АК) и докозагексаеновая кислоты, триптофан (Трп) и серотонин (5-НТ)), на взаимодействие альбумина с мономерной формой А β 40/42. Показано, что присутствие меди или жирных кислот не влияет на сродство ЧСА к А β 40, в то время как ЛК и АК значительно снижают величину равновесной константы диссоциации (KD) комплекса с А β 42. Серотонин способствует взаимодействию ЧСА с А β 40/42 (1 мМ 5-НТ снижает величину KD в 7/17 раз, соответственно), в то время как его предшественник Трп не оказывает выраженного влияния на сродство ЧСА к А β . Различия в действии Трп и 5-НТ на равновесие ЧСА-А β частично объясняется различиями в их влиянии на четвертичную структуру ЧСА (показано более выраженное накопление мультимерных форм белка в присутствии серотонина), а также отличиями в паттернах связывания с ЧСА, обнаруженными *in silico*. В целом, полученные данные свидетельствуют о способности природных лигандов ЧСА значительно усиливать его сродство к А β , а также дополняют наши представления о молекулярных механизмах влияния лигандов ЧСА на развитие БА. Направленное усиление взаимодействия ЧСА с А β способно послужить основой для разработки средств терапии и профилактики БА. *Работа поддержана грантом Е.А.Л. Российского научного фонда (№ 20-74-10072).*

ПОТОЧНЫЙ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА *RHODOBACTER SPHAEROIDES* ДИКОГО ТИПА И МУТАНТНОЙ ФОРМЫ F(M197)Н С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Г.К. Селиханов¹, Т.Ю. Фуфина², Л.Г. Васильева², А.Г. Габдулхаков¹

¹Институт белка РАН; ²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пуццино

Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) бактерий *Rhodobacter sphaeroides* – это сравнительно крупный (100 кДа) мембранный пигмент-белковый комплекс, представленный тремя белковыми субъединицами (L, M и H) и набором небелковых кофакторов. Он участвует в процессе фотосинтеза и задействован в преобразовании солнечной энергии в энергию химических связей. На сегодняшний день получены высококачественные кристаллические структуры реакционных центров пурпурных бактерий в статическом состоянии, но не пространственные структуры короткоживущих промежуточных состояний. Наиболее совершенным в плане временного разрешения методом структурной биологии является кинетическая фемтосекундная поточная кристаллография с использованием лазеров на свободных электронах. Для проведения поточных экспериментов необходимо большое количество небольших изоморфных высококачественных белковых кристаллов. Нами была разработана методика кристаллизации реакционных центров с использованием липидной губчатой мезофазы в сравнительно больших объемах. С ее помощью мы закристаллизовали реакционный центр дикого типа и мутантную форму F(M197)H, содержащую дополнительную водородную связь и обладающую большей стабильностью, чем РЦ дикого типа. Полученные образцы были использованы для проведения экспериментов поточной кристаллографии на синхротроне с фиксацией кристаллов на силиконовых чипах. Были разрешены кристаллические структуры с разрешением 1,93 Å в криоусловиях и 2,14 Å при комнатной температуре для РЦ дикого типа и 1,73 Å в криоусловиях и 2,04 Å при комнатной температуре для мутантной формы F(M197)H. Во всех случаях разрешение оказалось лучше, чем у аналогичных кристаллических структур из банка данных белковых структур PDB. В дальнейшем планируется использовать разработанную технику кристаллизации для подготовки других мембранных белков для экспериментов кинетической поточной кристаллографии. Работа была выполнена при поддержке программы РФФИ мега 18-02-40008. Мы выражаем благодарность сотрудникам линии P11 синхротрона PETRAIII (Гамбург, Германия), где выполнялась съемка кристаллов, а также сотрудникам CFEL Dr. Alke Meents и Dr. Sebastian Guenther, предоставившим технологию доставки кристаллов с помощью чипов на гониометрической головке Roadrunner и оказавшим содействие в проведении экспериментов.

ВЛИЯНИЕ ШАПЕРОНА Skp *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* НА ПРОЦЕСС АГРЕГАЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ IgG1 МЫШИ ПРИ РАЗНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ pH

Е.В. Сидорин¹, О.Ю. Портнягина¹, Т.О. Мизгина¹, Д.А. Киселева², В.А. Старожук²

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; ²Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук, Владивосток

В настоящее время моноклональные антитела (МКА) широко используются в диагностических и лечебно-профилактических целях, как в медицине, так и ветеринарии. Их эффективное применение ограничивается тем, что в водной среде и при высокой концентрации иммуноглобулина являются термодинамически нестабильными и могут, с течением времени, деградировать в результате агрегации. Агрегация, в свою очередь, приводит к уменьшению активности антител, делая лекарственное средство неэффективным. Круг веществ, используемых для стабилизации антител в растворах, достаточно широк и разнообразен, начиная от небольших по молекулярной массе соединений, заканчивая макромолекулами. В данной работе для подавления агрегации антител был использован рекомбинантный шаперон Skp из бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* (rSkp). Для изучения активности rSkp как ингибитора агрегации мышинных моноклональных IgG1 к сывороточному альбумину человека, использовали метод динамического рассеяния света (ДРС), гельпроникающую хроматографию и иммуноферментный анализ (ИФА). В ходе работы было показано, что в присутствии шаперона средние размеры частиц антител были сравнимы или меньше таковых для свободных МКА, образовавшихся за время проведения эксперимента. Установлено, что в присутствии rSkp скорость процессов формирования белками-субстратами комплексов с шапероном выше их собственной самоассоциации и агрегации. Обнаружено, что rSkp способствует сохранению антигенсвязывающей активности МКА, особенно при pH 4,0, даже после 168 часов инкубации. При pH 6,0 в присутствии rSkp антитела оставались активными в течение 48 часов, и только через 7 суток наблюдается незначительная (3,18 %) потеря способности взаимодействовать с гомологичным антигеном. При pH 7,0 иммуноглобулины мыши полностью сохраняли антигенсвязывающую активность, независимо от времени наблюдения. Таким образом, показано, что рекомбинантный шаперон Skp из бактерии *Y. pseudotuberculosis* стабилизирует мышинные МКА в растворах с различными значениями pH, ингибируя процесс агрегации и способствуя сохранению функциональной антигенсвязывающей активности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 20-04-00777).

СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ ПЕПТИДНОГО ТОКСИНА ЭКТАТОМИНА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С МЕМБРАНОЙ (ПО ДАННЫМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ)

Ю.А. Трофимов, П.Е. Волынский, Р.Г. Ефремов

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

Эктадомин – пептидный токсин из яда муравья *Ectatomma tuberculatum*, связывающийся с клеточной мембраной и вызывающий в ней образование пор. Известна его экспериментальная структура в воде: четыре плотно упакованные α-спирали, скрепленные дисульфидными связями. Однако данных о структуре и механизме образования трансмембранной поры нет. Изучение структурных изменений, возникающих в водорастворимом белке при контакте и последующем встраивании в мембрану, трудно проводить существующими экспериментальными методами, и для решения подобных задач могут быть применены методы компьютерного моделирования. В работе использовали метод молекулярной динамики (МД) в крупно-

зернистом представлении с применением разрабатываемого авторами оригинального вычислительного подхода. Суть его в том, что в ходе МД производится модификация молекулярной топологии белка, приводящая к повышению подвижности участков структуры в местах контакта с мембраной. Дополнительно в работе исследовали влияние латерального давления на взаимодействие белок-мембрана путем варьирования числа липидов в контактирующем с белком слое мембраны. Подтверждение результатов моделирования в крупнозернистом приближении проводили с использованием полноатомной МД, обеспечивающей более детальный учет межатомных взаимодействий. Показано, что разработанный подход приводит к адаптации структуры и частичному встраиванию экзатомина в модельную мембрану за счет движения спирали, сопровождающегося выходом на поверхность белка неполярных остатков, образующих область гидрофобного контакта с мембраной. При этом полярные остатки (прежде всего Lys) координируют фосфатные группы липидов на ее границе. Уменьшение числа липидов приводит к постепенному росту площади гидрофобного контакта и заглублению белка в мембрану с темпом 0,1-0,2 Å на один удаленный липид. Результаты МД в полноатомном приближении подтвердили стабильность полученных структур и позволили выявить ряд полярных контактов, играющих роль в мембрано-индуцированных перестройках белка. Разработанный подход показал свою работоспособность и может в дальнейшем применяться для исследования других водорастворимых белков, взаимодействующих с мембраной. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00697 А.*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ ПЛАСТОЦИАНИНА И ЦИТОХРОМА С6 С ЦИТОХРОМОМ F В ЦИАНОБАКТЕРИЯХ И ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЯХ

В.А. Федоров, С.С. Хрущев, И.Б. Коваленко, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин

МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биофизики, Москва

Образование короткоживущих белок-белковых комплексов – это сложный многостадийный процесс: в результате диффузии белки образуют столкновительные комплексы, которые затем могут трансформироваться в финальный комплекс, пройдя при этом через ряд метастабильных состояний, или распастись. В рамках настоящего исследования нами были использованы методы молекулярного моделирования для полного детального изучения процессов образования белок-белковых комплексов цитохрома с6 и пластоцианина с цитохромом f в цианобактериях *Nostoc*, *Phormidium laminosum* и зеленой водоросли *Chlamydomonas*. В данной работе использовались комбинированный подход броуновской и молекулярной динамики и иерархический кластерный анализ. В результате исследований было установлено, что в зеленой водоросли *C. reinhardtii* электростатические взаимодействия приводят к диффузионному захвату как молекулы пластоцианина, так и молекулы цитохрома с6 положительно заряженной областью цитохрома f вблизи гема в случайной ориентации. После этого происходит сближение кофакторов белков за счет вращения молекулы подвижного переносчика и формирование финального комплекса. В цианобактерии *Nostoc* механизм формирования диффузионно-столкновительного комплекса цитохрома f с молекулами пластоцианина и цитохрома с6 различается. Несмотря на инвертированное распределение зарядов в области контакта молекул по отношению к зеленой водоросли образование комплекса с цитохромом с6 происходит в целом так же, как и у зеленой водоросли. При образовании комплекса с пластоцианином механизм другой: диффузионный захват молекулы пластоцианина молекулой цитохрома f происходит в ориентации, в которой атом меди уже обращен к цитохрому f. Дальнейшее сближение кофакторов происходит при сохранении общей ориентации молекулы пластоцианина. В цианобактерии *P. laminosum* электростатические взаимодействия на стадии формирования диффузионно-столкновительных комплексов цитохрома f с молекулами пластоцианина и цитохрома с6 не приводят к образованию продуктивных предварительных комплексов. *Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500060-0 при частичной поддержке грантами РФФИ № 20-04-00465 и 19-04-00999 и Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ.*

НАНОРАЗМЕРНЫЕ БЕЛОК-ЛИПИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РЕЦЕПТОРОВ, СОПРЯЖЕННЫХ С G-БЕЛКОМ

П.А. Хорн, Л.М. Василенко, А.П. Лугинина, А.Ю. Гусач, О.А. Сухачева, В.И. Борщевский, А.В. Мишин

Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический университет (НИУ), Долгопрудный

Рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCR), составляют самое многочисленное суперсемейство мембранных белков в геноме человека и являются терапевтическими мишенями более 30% лекарственных препаратов на фармацевтическом рынке (Latorgasa N.R. et al. (2017) Chem. Rev. 117(1): 139-155). Структурные и биофизические исследования GPCR нацелены на изучение механизмов распознавания лигандов и сигналинга с участием этих белков. Такие исследования чрезвычайно сложны из-за низкой стабильности GPCR вне их естественного мембранного окружения. Мицеллы детергентов и нанодиски на основе производных человеческого аполипопротеина А-1 являются наиболее распространенными мембраномиметическими средами (ММС) и широко используются для структурных исследований, а также для изучения функциональной активности GPCR и других мембранных белков методами ЯМР, флуоресценции одиночных молекул, масс-спектрометрии и пр. Тем не менее, выбор оптимальной ММС для различных приложений все еще является актуальной задачей (Jonas M.D. et al. (2016) Eur. Biophys. J. 45: 3–21). В первую очередь ММС должна удовлетворять ряду таких критериев, как быть совместимой с процедурой выделения и очистки исследуемого белка, термостабилизировать и позволять изучать структурные и функциональные свойства белка при условии сохранения ими нативных свойств. Этим требованиям могут удовлетворять ММС нового поколения - нанодиски на основе лизосомального белка сапозина А (Salipro®) и нанодиски на основе синтетического сополимера диизобутилена и малеиновой кислоты (DIBMALP). В случае Salipro® и DIBMALP формирование стабилизированных в растворе наноразмерных белок-липидных частиц происходит напрямую из мембраны, что качественно отличает эти системы от всех остальных и дает возможность изучения GPCR в присутствии окружающих их в мембране липидов (Lloris-Garcera P. et al. (2020) Front. Bioeng. Biotechnol. 8:215; Oluwole A.O. et al (2017) Angew. Chem. Int. Ed. 56: 1919–1924). В этой

работе мы провели сравнительный анализ стабильности и склонности к агрегации исследуемых в нашей лаборатории рецепторов, встроенных в новые и классические ММС. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-02-40020.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АДАПТАЦИЯ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ (НА ПРИМЕРЕ ФИБРИНОГЕНА, КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА XIII И ПЛАЗМИНОГЕНА)

Л.В. Юрина¹, А.Д. Васильева¹, А.Е. Бугрова¹, М.И. Индейкина^{1,3}, А.С. Кононихин², Е.Н. Николаев⁴, М.А. Розенфельд¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; ²ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН; ³Московский физико-технический институт (НИУ); ⁴Сколковский институт науки и технологий, Москва

Было изучено повреждение молекул фибриногена и плазминогена при воздействии различного количества окислительного агента, а также коагуляционного фактора XIII (FXIII) на отдельных этапах его ферментативной активации под воздействием нескольких концентраций окислителя. Окисление фибриногена вызывало ингибирование процесса самосборки фибриновой сети уже при наименьшей концентрации окислителя. Анализ результатов белкового электрофореза выявил отсутствие фрагментации белка и ковалентного сшивания его цепей. При исследовании участков, ответственных за превращение фибриногена в фибрин, с помощью масс-спектрометрии обнаружили, что они не подвергаются окислительным повреждениям, однако при этом мы идентифицировали окисленные аминокислотные остатки, которые могли бы влиять на агрегацию протофибрилл. Результаты ВЭЖХ-МС/МС, электрофореза и колориметрии показали, что в процессе превращения профермента FXIII в фермент FXIIIа уязвимость FXIII к индуцированному окислению возрастала. Показано, что ряд остатков метионина и цистеина на каталитической субъединице наделен антиоксидантной функцией. Регуляторные субъединицы FXIII-B дополнительно способствуют антиоксидантной защите каталитического центра субъединицы FXIII-A, что вместе с плотной упаковкой тетрамерной структуры профермента FXIII, являются тремя факторами, которые обеспечивают высокую устойчивость белка к окислителю. Методом ВЭЖХ-МС/МС впервые были получены данные об окислительных модификациях молекулы плазминогена при индуцированном окислении. Высокая толерантность плазминогена к окислению может быть обусловлена как его закрытой конформацией, так и способностью некоторых из остатков метионинов служить ловушками АФК.

ПЕРЕДАЧА КОНФОРМАЦИОННОГО СИГНАЛА ОТ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА P00058 В АКТИВНЫЙ ЦЕНТР ТИРОЗИН ФОСФАТАЗЫ РТР1В ЧЕЛОВЕКА

Ю.Н. Чиргадзе^a, Е.В. Бражников^a, К.П. Батайли^b, Р.Д. Гордон^c, В. Романов^c, А. Лин^c, Р. Кариш^c, Р. Лэм^c, М. Рузанов^e, Е.Ф. Паи^{c,d}, Б.Г. Нил^{c,f}, Н.Ю. Чиргадзе^{c,g}

^aИнститут белка РАН, Пуцино; ^bNew York Structural Biology Center, New York, USA; ^cOntario Cancer Institute, Princess Margaret Hospital, University Health Network, Toronto, Canada; ^dDepartment of Biochemistry and Medical Biophysics, University of Toronto, Ontario, Canada; ^eMolecular Structure and Design, Molecular Discovery Technologies, Bristol-Myers Squibb Research & Development, Princeton, New Jersey, USA; ^fLaura and Isaac Perlmutter Cancer Center, New York University Grossman School of Medicine, NYU Langone Health, USA; ^gX-CHIP Technologies Inc., Toronto, Ontario, Canada

Белковые тирозин фосфатазы относятся к обширному семейству ферментов, связанных с передачей сигналов к рецепторам [1]. Тирозин фосфатаза РТР1В человека является негативным регулятором метаболизма гормонов инсулина и лептина, которые прямо связаны с диабетом 2 и ожирением [2, 3]. Мы определили две структуры кристаллов высокого разрешения для апо-фермента и его комплекса с аллостерическим ингибитором P00058, пирролидин производным бензойной кислоты. Связывание с ингибитором приводит к изменению главной белковой цепи в области активного центра фермента, при этом место контакта удалено на 18Å (рис. 1). Обнаружены также изменения боковых цепей поверхностных аминокислотных остатков, через которые и передается сигнал. Полученный результат показывает, как происходит передача конформационного сигнала от места связывания ингибитора P00058 в область активного центра тирозин фосфатазы РТР1В и позволяет понять детали механизма действия ингибитора.

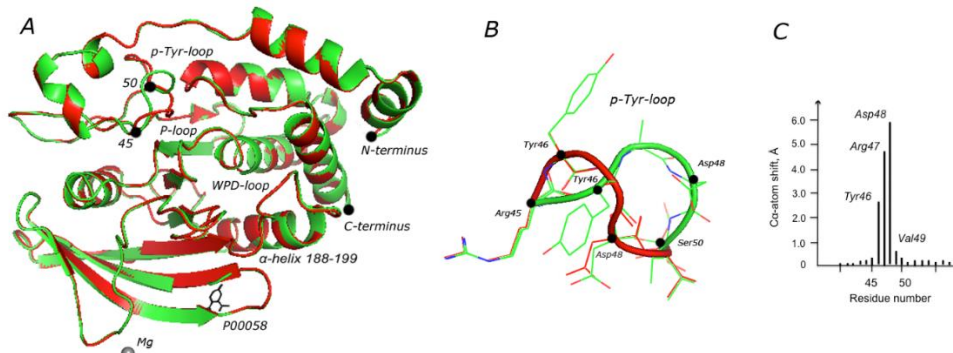


Рисунок 1. А: Наложение структуры апо-фермента РТР1В (зеленым цветом) и структуры комплекса с ингибитором P00058 (красным цветом) с разрешением 1,8Å. В, С: Наиболее существенные сдвиги Cα-атомов каталитической р-Тир-петли, остатки 45-50, индуцированные ингибитором.

1. Zhang, Z. Y. Mechanistic studies on protein tyrosine phosphatases. *Progr. Nucl. Acid and Mol. Biology*, 73, 171-220, 2003.
2. Zhang, S., Zhang, Z. Y. Mechanistic studies on protein tyrosine phosphatases. *Drug Discovery Today*, 12, 373-381, 2007.
3. Brandao T. A., Hengge A. C., Johnson S. J. Insights into the reaction of protein-tyrosine phosphatase 1B: crystal structures for transition state analogs of both catalytic steps. *J. Biol. Chem.* 21, 285, 15874-83, 2010.

Конкурс молодых ученых

СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА И ИНСУЛИНОПОДОБНЫХ ФАКТОРОВ РОСТА

Я.В. Бершадский^{1,2}, К.Д. Надеждин¹, О.В. Бочарова^{1,2}, А.С. Урбан^{1,2}, А.С. Арсеньев¹, Э.В. Бочаров^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный

Рецепторные тирозинкиназы (РТК) InsR, IGF1R и IRR - мембранные рецепторы типа I, - вовлечены в широкий спектр физиологических и патологических процессов в организме человека. Несмотря на высокую гомологию последовательностей и структурную схожесть, локализация, экспрессия и функции данных рецепторов сильно различаются. Отличительными структурными особенностями РТК семейства рецепторов инсулина и инсулиноподобных факторов роста являются преформирование ковалентно связанных димеров, посредством образования дисульфидной связи между внеклеточными лиганд-связывающими доменами, а также наличие консервативного остатка пролина в первой трети трансмембранной (ТМ) спирали. На сегодняшний день РТК являются перспективной мишенью для лекарственной терапии нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. В этой работе мы изучили структуру и динамику ТМ доменов всех 3-х рецепторов семейства (InsR, IGF1R и IRR). Используя бесклеточную систему экспрессии, мы получили ¹⁵N- и ¹⁵N,¹³C-изотопно-меченные целевые белки, которые были солюбилизованы в мембраноподобную среду из мицелл додецил фосфохолина. С помощью ЯМР-спектроскопии для ТМ фрагментов рецепторов были определены пространственные структуры высокого разрешения, а также охарактеризованы динамические параметры в мономерном состоянии. Было обнаружено, что конформационная изменчивость ТМ доменов значительно различаются у представителей данного семейства РТК. Таким образом, мы предположили, что наблюдаемое разнообразие структурной организации рецепторов InsR, IGF1R и IRR и механизмов их активации определяется в том числе гетерогенным и высокодинамичным мембранным окружением. *Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 18-14-00375).*

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО КРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА LSSmScarlet С БОЛЬШИМ СТОКСОВЫМ СДВИГОМ

А.Д. Бурцева¹, А. Ю. Николаева², О.М. Субач², Ф.В. Субач², К. М. Бойко¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»; ²НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Одним из важнейших достижений современной молекулярной биологии является возможность визуализации процессов, происходящих внутри клетки, как на уровне их пространственной локализации, так и во временной развертке. Эксперименты такого рода стали возможны благодаря открытию флуоресцентных белков (ФБ), являющихся генетически кодируемыми (т.е. без необходимости доставки в клетку извне) маркерами, идеальными для анализа локализации клеток, клеточных оргanelл и белков по флуоресцентному сигналу. Широкий спектр ФБ с различными свойствами представляет собой удобный набор инструментов для молекулярных клеточных биологов, позволяющий отслеживать целевые молекулы или клетки в модельном организме, которые могут быть помечены генетически. В то же время спектр практических применений ФБ ограничен рамками их характеристик (спектральных, яркостных и др.). В частности, особый интерес представляют красные ФБ с большим Стоксовым сдвигом (разница между максимумами возбуждения/эмиссии более 100 нм). Такая особенность этих белков позволяет использовать их в экспериментах по мультифотонной микроскопии для исследования тканей и организмов с субклеточным разрешением в режиме реального времени. В настоящей работе мы получили кристаллическую структуру с разрешением 1.4Å для красного ФБ LSSmScarlet с большим Стоксовым сдвигом и провели ее детальный анализ с целью выяснения структурных особенностей, определяющих спектральные характеристики этого белка. *Данная работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20135).*

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА ДЛЯ АНАЛИЗА ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ НА ОСНОВЕ ИЗМЕРЕНИЯ ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРК-ПЛАТФОРМЫ

А.Д. Васильева¹, И.А. Богинская², Н.Л. Нечаева^{1,3}, Л.В. Юрина¹, И.А. Рыжиков², А.С. Кононихин^{1,4}, М.А. Розенфельд¹, И.Н. Курочкин^{1,3}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва; ²Институт теоретической и прикладной электродинамики РАН, Москва; ³МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁴Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный

Посттрансляционные модификации белков (ПТМ) участвуют практически во всех аспектах биологических процессов, регулируя функции белков. Аберрантные ПТМ выделяются в качестве многообещающего инструмента для молекулярной диагностики заболеваний. Спектроскопия комбинационного рассеяния характеризуется экспрессностью, мультиплексно-

стью, селективностью, а также простотой проведения анализа. Для улучшения чувствительности метода используют подходы, основанные на эффекте гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). ГКР наблюдается для молекул вблизи или на поверхности металлических наноструктур, реализующих эффект поверхностного плазмонного резонанса. Однако, расположение белковых молекул у поверхности наноструктур не позволяет создать достаточную для обнаружения ГКР сигнала плотность молекулярного слоя. Данная проблема затрудняет исследование методом ГКР молекул белка, и ещё более значительно – их ПТМ. Для решения задачи создания высокочувствительного метода для определения уровней ПТМ белков на основе ГКР, был использован подход, основанный на предварительном ферментативном гидролизе исследуемых белков с последующим анализом пептидной смеси. В рамках работы был исследован один из основных белков системы гемостаза – фибриноген, окислительные ПТМ которого ассоциированы с развитием ряда заболеваний и могут иметь диагностическую значимость, в том числе, на ранних стадиях патогенеза. Был проанализирован контрольный образец фибриногена, а также образцы, обработанные разными количествами окислителя (от 5 мкМ до 100 мкМ NaOCl). В работе использовалась общая схема подготовки образцов для анализа методами ГКР и ВЭЖХ-МС/МС, что позволило произвести сопоставление регистрируемых ГКР-спектров и пептидных карт белков с типами ПТМ, определенными методом ВЭЖХ-МС/МС. Изменения в спектрах были проанализированы методом главных компонент. Использование гидролизата исследуемых образцов белка значительно повысило информативность получаемых ГКР-спектров по сравнению с исходными образцами белков. На основе полученного массива данных предполагается создание библиотеки ГКР-спектров, характеризующих ПТМ белков, которая будет способствовать упрощению анализа данных, полученных методом ГКР, и возможности полной автоматизации ГКР-измерения для применения в молекулярной диагностике заболеваний.

РОЛЬ ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ОСТАТКОВ В ФОРМИРОВАНИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА PLP-ЗАВИСИМОЙ ТРАНСАМИНАЗЫ ИЗ *AMINOBACTERIUM COLOMBIENSE*

С.А. Завьялова¹, М.Г. Хренова¹, Т.В. Ракитина², В.О. Попов¹, Е.Ю. Безсуднова¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые трансминазы катализируют стереоселективный перенос аминокислоты с аминокислоты на кетон или кетокислоту с образованием новой аминокислоты или амина. По типу укладки PLP-связывающего домена ТА относятся к I и IV типам. Суперсемейство ТА IV типа включает три канонических подсемейства, различающихся по субстратной специфичности: ТА D-аминокислот, ТА разветвленных L-аминокислот и ТА, специфичные к R-амину. Функциональной единицей ТА является димер, активный центр (АЦ) представляет полость, с молекулой PLP в центре, которая делит полость на два кармана, O-карман и P-карман. Аминокислотные остатки, формирующие АЦ ТА, образуют характеристические мотивы и определяют субстратную специфичность фермента. Канонические подсемейства ТА различаются характеристическими мотивами. Биоинформатическими методами была обнаружена последовательность ТА IV типа из *Aminobacterium Colombiense* (Amico) с неканоническими характеристическими мотивами. Отличительной особенностью Amico является наличие нескольких положительно заряженных остатков в O-кармане АЦ. В данной работе был проведен анализ субстратной специфичности и определена роль положительно заряженных остатков в АЦ Amico. Для работы использовали рекомбинантный фермент с His-тагом на N-конце, экспрессию которого проводили в бактериях *E. coli*. Субстратную специфичность Amico определяли по полуреакции холо-формы фермента с аминокислотами. Нами установлено, что Amico специфична к D-аминокислотам, и наибольшую активность проявляет с D-глутаминовой кислотой. В классических ТА D-аминокислот α -карбоксильная группа связана в O-кармане, а боковая цепь в P-кармане. Для понимания механизма связывания субстратов в активном центре Amico были получены модели комплексов с D-глутаминовой кислотой и с D-лейцином методом молекулярной динамики. В обоих комплексах α -карбоксильная группа аминокислоты связана в O-кармане через Arg27, но γ -карбоксильная группа D-глутаминовой кислоты также связывается в O-кармане через остатки Thr34, Arg88 и Lys99. Необычное связывание D-глутаминовой кислоты было подтверждено путем замены Arg88 и Lys99 на гидрофобные остатки, специфичность мутантов к D-глутаминовой кислоте снизилась в несколько раз. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-00164.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕЙРОМОДУЛЯТОРА Lynx2 С $\alpha 4\beta 2$ -НИКОТИНОВЫМ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ

М.М. Заиграев^{1,2}, А.О. Чугунов¹, З.О. Шенкарев¹, Е.Н. Люкманова^{1,3}, А.С. Парамонов¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва; ²Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный; ³Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Lynx2 — важный модулятор ЦНС, участвующий в холинергическом контроле тревожности. Известно, что Lynx2 усиливает десенситизацию $\alpha 4\beta 2$ -никотинового ацетилхолинового рецептора ($\alpha 4\beta 2$ -nAChR). Lynx2 является GPI-заякоренным белком, что обеспечивает его удержание около клеточной мембраны. Высокий уровень экспрессии Lynx2 отмечается в отделах мозга, отвечающих за контроль уровня тревожности — миндалине, таламусе и префронтальной коре. В настоящей работе на основе ранее полученной методом ЯМР пространственной структуры водорастворимого домена Lynx2 (код PDB: 6ZSS) методами компьютерного моделирования была построена модель Lynx2 с GPI-якорем, а также лиганд-рецепторный комплекс { $\alpha 4\beta 2$ -nAChR + Lynx2 + GPI-якорь} в мембранном окружении (POPC:POPE:CHOL=2:1:1), для которых были выполнены расчёты молекулярной динамики (МД) в GROMACS длительностью 1500 и 200 нс соответственно в силовом поле CHARMM36. С помощью МД был получен набор конформаций Lynx2 в воде и $\alpha 4\beta 2$ -nAChR со стехиометрией 3 α :2 β в мембране (код PDB: 6CNK). Затем в ZDOCK был проведён ансамблевый докинг Lynx2 в область лиганд-связывающего сайта в области интерфейса субъединиц $\alpha 4/\alpha 4$. Фильтрация решений учитывала гидрофобную комплементарность, площадь взаимодействия и число контактов. Было отобрано 33 решения, из которых по визуальным признакам было выбрано финальное с учетом про-

никновения Lynx2 в область ортостерического сайта и ориентации С-концевой последовательности Lynx2 в сторону мембраны (в соответствии с МД Lynx2 с GPI-якорем). МД комплекса {Lynx2 + GPI-якорь + мембрана} позволила получить стабильную конформацию Lynx2 с GPI-якорем относительно мембраны. На основании выбранного решения докинга и полуконной стабильной конформации Lynx2 и GPI-якоря был построен комплекс {Lynx2 + GPI-якорь + α 4 β 2-наАХР + нейрональная мембрана}; использовались программные пакеты PyMOL, IMPULSE и CHARMM-GUI. МД показала высокую стабильность комплекса, а также наличие важных взаимодействий α 4/ α 4-интерфейса с первой и второй петлями, а также С-концевым участком Lynx2. Более того, было выявлено наличие контактов рецептора с липидными хвостами и углеводными остатками GPI-якоря. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20176).*

СОЗДАНИЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПОИСКА АНТИГЕНОВ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ВТОРОГО КЛАССА И В-КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРОМЕТРИИ.

И.А. Ишина¹, М.Ю. Захарова^{1,2}, А.Э. Мамедов¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Определение пептидных лигандов, способных селективно связываться с различными рецепторами, является важной задачей для прояснения специфичности клеточных рецепторов и разработки методов терапии нового поколения. Структура клеточного рецептора, а также его микроокружение, затрудняют возможность идентификации, связывающегося с ним лиганда, особенно в условиях *in vitro*. Разработка эффективной платформы для определения антигенов главного комплекса гистосовместимости второго класса (МНС II), а также В-клеток поможет прояснить этиологию многих заболеваний. Ранее полученная платформа для определения специфичности рецепторов эукариотических клеток позволила отобрать до 97% антиген-специфичных В-клеток, с использованием системы биоконъюгатов бактериофагов, полученных на основе фагемидного вектора и метода проточной цитофлуориметрии. Система для определения антигенов была значительно улучшена благодаря созданию конструкций бактериофагов на основе фагового вектора fADL-1e, не требующего гиперфага-помощника для экспрессии, что повысило специфичность и упростило экспериментальный процесс. Улучшенная платформа была использована для поиска антигенов МНС II класса и трансгенных антиген-специфичных В-клетках, экспрессирующих рекомбинантный лимфоидный В-клеточный рецептор. Использование бактериофагов, экспрессированных при помощи фагового вектора fADL-1e, показало наибольшую эффективность отбора антигена МНС II класса человека (HLA-DR1) по сравнению с фагемидным вектором. Использование системы на основе фагового вектора fADL-1e также показало большую эффективность отбора антиген-специфичных В-клеток, по сравнению с фагемидным вектором. Бактериофаги, полученные на основе фагового вектора fADL-1e позволили отобрать до 98,5% В-клеток, с уровнем ложноположительного сигнала 0,2%. Полученные результаты показывают возможность применения системы на основе фагового вектора fADL-1e для поиска и отбора антигенов МНС II класса и В-клеток. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) №17-74-30019.*

IN SILICO ПРЕДСКАЗАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ И АНАЛИЗ СБОРКИ МЕМБРАННОГО БЕЛКА-ПЕРЕВЕРТЫША LacY

А.С. Козлова¹, Н.И. Акберова¹, М.В. Богданов^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²Медицинская школа МакГоверна, Хьюстон, США

Пермеаза лактозы (LacY) *E. coli* принадлежит к новому семейству белков-перевертышей, кувыркающихся (“flip-flopping”) в мембране, несмотря на достаточно высокую энергию гидрофобного барьера. N-терминальные пучок спиралей трансмембранных доменов (TMD) LacY (далее N6 и N6 для нативной и перевернутой ориентации, соответственно) обратимо переворачивается туда–сюда в интактных клетках и липосомах при изменении липидного состава или при обратимом фосфорилировании экстрамембранных доменов. TMD7 выходит из мембраны и работает как механический шарнир, и N6 переворачивается по отношению к плоскости бисюля и С-концевому пучку из пяти TMD (C5). Применение метода рентгеновской кристаллографии недоступно для определения динамической организации мембранных белков, поэтому целью данной работы является компьютерное моделирование сборки транспортера LacY с использованием метода белок-белкового докинга, т.к. N6 and C6 находят друг друга при экспрессии по отдельности, связываются и восстанавливают функциональный транспортер. Структура LacY взята из PDB (2v8n), цепь А разделили на 2 части: N6 (TMD1-TMD6, 1-186) и C5 (TMD8-TMD12, 254-417). Был проведен докинг C5 к N6 с помощью PatchDock. Структура недостающих доменов предсказана в Robetta. Модели сгруппированы на основе взаимодействующих между N6 и C5 аминокислот, наиболее вероятные структуры определены методом сходимости по RMSD. Были обнаружены структуры LacY с тремя ориентациями: 66% их них были с N6 N-концом и C5 С-концом в цитоплазме клетки (нативная), 24% – с N6 N-концом в периплазме (снаружи клетки) и C5 С-концом в цитоплазме (инвертированная) и 10% имели промежуточную ориентацию с C5-доменом, располагающимся в мембране. Предсказанные структуры полностью согласуются с длиной и локализацией нарушенных TMD и EMD, картированных на структуру LacY из липосом в экспериментах по силовой спектроскопии одиночных молекул с помощью АСМ (AFM-SMFS). *Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета, программы НАТО «Наука ради мира и безопасности» SPS 985291 и гранта РНФ RCF 20-14-00166.*

ОПТИМИЗАЦИЯ СТРАТЕГИИ СБОРА И АНАЛИЗА ПРОТЕОМНОГО СОСТАВА КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКОГО

А.С. Козырь¹, А.М. Рябоконе^{1,3}, Н.В. Захарова¹, М.И. Индейкина¹, А.Г. Бржозовский⁵, А.Е. Бугрова¹, В.В. Бармин⁴, О.В. Пикин⁴, Е.Н. Николаев^{5,2}, А.С. Кононихин^{1,5}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; ²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН; ³МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁴Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена; ⁵Сколковский институт науки и техники, Москва

Конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ) является перспективным объектом для клинического мониторинга, поскольку содержит тысячи растворенных соединений, включая липиды, метаболиты, белки и пептиды, отображающие (пато)физиологические изменения в организме, в частности, в дыхательной системе. Тем не менее, низкая концентрация компонентов КВВ требует применения особых подходов при подготовке проб для дальнейшего анализа. В рамках данной работы предложена модернизация процедуры сбора КВВ, существенно увеличивающая количество белковых идентификаций при дальнейшем анализе образцов здоровых волонтеров и пациентов с раком лёгкого (РЛ) методами масс-спектрометрии (МС) высокого разрешения. В частности, для десорбции белков была предложена дополнительная обработка стенок собирающего КВВ конденсатора (RTube) органическим растворителем (метанолом). В результате применения этой процедуры число обнаруженных белков в 20-ти индивидуальных образцах пациентов с РЛ удалось увеличить в среднем с $55,7 \pm 28,5$ (\pm SD) до $85,1 \pm 24,6$, а число идентифицированных триптических пептидов с 285 ± 190 до 500 ± 174 . В целом было идентифицировано 115 белков, 32 из которых чаще идентифицировались в КВВ без дополнительного метанольного смыва, тогда как 70 белков чаще встречались в метанольных смывах. Кроме того, применение метанольного смыва в процессе пробоподготовки способствовало увеличению выявляемости известных белковых маркеров РЛ: выявляемость S100-A9 увеличилась с 17-ти до 18-ти образцов, а дермидина – с 16-ти до 20-ти. Таким образом, модернизированный подход позволил выявить онкомаркер(ы) в каждом образце КВВ пациентов с РЛ. Для улучшения специфичности маркеров с помощью комплементарного метода iTRAQ были валидированы изменения между группой РЛ и контрольной группой (соответствующего возраста, пола, а также с пограничными условиями – курильщики, ХОБЛ). Полученные результаты указывают на существенную сорбцию белков КВВ на стенках собирающего устройства, что может приводить к занижению белковых идентификаций. Предложенный подход для десорбции белков может быть эффективным для разных типов собирающих устройств и может быть принят во внимание при разработке стандартизированных протоколов сбора КВВ для дальнейшего протеомного анализа. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ No. 18-29-09158 МК.

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕНЫ TYR230ALA НА АКТИВНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ ДВУХДОМЕННОЙ ЛАККАЗЫ STREPTOMYCES GRISEOFLOAVUS

И.А. Коляденко, С.В. Тищенко, А.Г. Габдулхаков *Институт белка РАН, Пущино*

Лакказы (п-дифенол:кислородоксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) медьсодержащий фермент, катализирующий реакцию окисления различных соединений, с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды. В природе встречаются трехдоменные (3D) лакказы, и двухдоменные (2D) лакказы. Первые характерны для грибов, растений, насекомых и бактерий, в то время как 2D лакказы найдены только в некоторых видах бактерий. Лакказы обладают широкой субстратной специфичностью. Они способны окислять фенолы, метокси-замещенные фенолы, аминифенолы, диамины, сахара, ненасыщенные жирные кислоты и различные неорганические соединения. Активный центр всех лакказ представлен 4 ионами меди. T1 – ион меди (T1), вблизи которого происходит окисление субстрата, и T2/T3 – медный кластер (TNC), в котором молекулярный кислород восстанавливается до воды. На основе проведенного нами анализа пространственных структур 2D лакказ, мы идентифицировали высококонсервативный аминокислотный остаток (а.к остаток) тирозин в 230 положении (Tyr230), по нумерации *Streptomyces griseoflavus* (PDB id 5LHL). Боковая группа данного а.к остатка находится на расстоянии $\sim 5\text{\AA}$ от T1 центра, и может участвовать в координировании некоторых субстратов в субстрат - связывающем кармане 2D – лакказ. Методом Quick-change мутагенеза получена генетическая конструкция, несущая ген 2D лакказы *Streptomyces griseoflavus* с заменой Tyr230Ala. Для данной мутантной формы получен штамм-суперпродукцент *Escherichia coli*, отработаны условия выделения целевого белка. Определены константы каталитической активности с использованием в качестве субстратов ABTS, K4[Fe(CN)6] и 2,6-ДМФ. Показано, что замена Tyr230Ala привела к увеличению эффективности катализа (Kcat/Km) фермента при окислении ABTS и 2,6-ДМФ, однако негативно повлияла на скорость окисления K4[Fe(CN)6]. Наряду с влиянием на каталитическую активность, замена привела к существенному снижению термостабильности фермента. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90121.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ТАЙМЕРА mRubyFT ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

И.О. Матюта¹, Ф.А. Гайворонский¹, А.Ю. Николаева^{1,2}, О.М. Субач², Ф.В. Субач², К.М. Бойко¹ *1*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; *2*НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Открытие флуоресцентных белков (ФБ) предоставило возможность визуализации процессов, происходящих внутри клетки, как на уровне их пространственной локализации, так и во временной развертке. ФБ являются идеально приспособленными маркерами для анализа локализации клеток, клеточных органелл и белков по флуоресцентному сигналу. Одной из важных задач биологии является исследование и контроль регуляции цикла клеточного деления, необходимого для нормального развития в процессе эмбриогенеза. Существующие на сегодня Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) системы для визуализации клеточных фаз имеют один важный недостаток – они не предоставляют информации о длительности нахождения клетки в той или иной фазе или точного времени о вхождении в ту или иную фазу цикла. В этой связи перспективным является использование т.н. флуоресцентных таймеров для визуализации клеточного цикла – особых

ФБ, меняющих спектр флуоресценции со временем. К этому классу объектов относится клеточный таймер mRuby, меняющий в процессе созревания спектр флуоресценции с красного на синий. В настоящей работе мы получили кристаллическую структуру синей формы генетически-кодированного клеточного таймера mRuby с разрешением 1.8Å и провели ее детальный анализ. Данная работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20135).

ВЛИЯНИЕ ФОСФОРИЛОВАНИЯ НА СТРУКТУРУ ГЛЮКАНОЗИЛТРАНСГЛИКОЗИЛАЗЫ Bgl2 КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Н.А. Моторин¹, В.В. Рекстина¹, Р.Х. Зиганшин², А.К. Шайтан¹, Т.С. Калебина¹ ¹Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Bgl2 – одна из основных мажорных глюканозилтрансгликозилаз клеточной стенки (КС) дрожжей ответственна за правильное формирование её структуры и динамичные изменения в процессе роста их клеток и ответе на стресс. Глюканозилтрансгликозилазы в КС находятся в тесном контакте со своим субстратом-глюканом на границе дрожжевой клетки и нестабильной внешней среды. До сих пор неясно, каков механизм регуляции функционирования глюканозилтрансгликозилаз в целом и Bgl2 в частности, в то же время их бесконтрольная активность опасна для клеток. Мы предположили, что наиболее привлекательным объяснением может быть механизм с участием посттрансляционных модификаций. Например, фосфорилирование, вследствие которого может приводить изменение конформации глюканозилтрансгликозилазы Bgl2, включая область её активного центра. Данных о фосфорилировании молекулы Bgl2 в литературе представлено мало.

В процессе работы были получены данные о наличии трёх пулов Bgl2: молекул без фосфорилирования (Bgl2^P), молекул с фосфорилированием по Thr⁸⁴ (Bgl2^P) и с множественным фосфорилированием (Bgl2^{Pn}, где n от 2 до 11). Молекулы последнего могут содержать различные комбинации фосфорилированных аминокислотных остатков. Выдвинута гипотеза, согласно которой Bgl2^P и Bgl2^{Pn}, в отличие от вариантов молекул с множественным фосфорилированием Bgl2^{Pn}, сохраняет структуру активного центра и стабильность, при этом единичное фосфорилирование способствует стабильности белка. Для проверки были получены расчёты траекторий методом молекулярной динамики.

При сравнительном анализе значений радиусов гирации и RMSD (англ. Root Mean Square Deviation) были установлены отличия в стабильности Bgl2^{Pn} от Bgl2^P и Bgl2^P. В ходе моделирования некоторые варианты Bgl2^{Pn}, в отличие от Bgl2^P и Bgl2^P, значительно изменяли свою конформацию, теряли симметрию, демонстрировали устойчиво высокое значение RMSF (англ. Root Mean Square Fluctuation), область их активного центра деформировалась. Результаты моделирования подтверждают высказанную гипотезу. Обсуждаются принципиальные различия во внутримолекулярной подвижности и динамике конформационных переходов глюканозилтрансгликозилазы Bgl2 с различной степенью фосфорилирования.

Работа поддержана грантом РФФИ 20-04-01144 А.

Х РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ» Химия и биология ферментов

ИЗУЧЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В ИЗ *SERRATIA PROTEAMACULANS* МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ И MM-GBSA

А.Г. Андрианова¹, Д.Е. Петренко², В.И. Тимофеев^{1,2,3}, Д.М. Карлинский¹, Д.А. Шаров¹, А.Г. Михайлова¹, Т.В. Ракитина¹ ¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²НИЦ «Курчатовский институт»; ³Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва

Олигопептидазы В (ОрВ) представляют собой трипсиноподобные сериновые пептидазы (КФ 3.4.21.83), найденные в бактериях и паразитических простейших и являющиеся потенциальными фармакологическими мишенями. ОрВ относятся к факторам патогенеза паразитарных и некоторых бактериальных инфекций. В острых фазах заболевания эти ферменты попадают в кровь больных и гидролизуют физиологически-важные пептиды, включая предсердный натрийуретический фактор, вызывая нарушения в системе кровотока. Предполагают, что ОрВ участвуют в защите бактерий от антимикробных пептидов, обогащенных основными аминокислотными остатками. ОрВ гидролизуют пептидные связи, образованные карбоксильными группами положительно-заряженных аминокислотных остатков; наличие положительно-заряженного остатка в предшествующей позиции увеличивает эффективность гидролиза. Известно, что R в P2 положении субстрата предпочтительнее, чем K, но природа вторичной субстратной специфичности ОрВ остаётся неизвестной.

В данной работе были смоделированы комплексы ОрВ из *Serratia proteamaculans* (PSP) дикого типа, а также мутантных ферментов с изменённой активностью или вторичной субстратной специфичностью, с пептидными субстратами GRRG и GKRG, содержащими R в P1 положении и R/K в P2 положении. Полученные комплексы были исследованы методом молекулярной динамики (МД). Анализ полученных МД траекторий позволил сравнить конформационную динамику комплексов и возникающие в них межмолекулярные контакты. Метод MM-GBSA, основанный на комбинации молекулярной механики и решения обобщенного уравнения Борна, был использован для определения свободной энергии связывания (ΔG) пептидных субстратов. Полученные величины ΔG были сопоставлены с эффективностями гидролиза (k_{cat}/K_m), экспериментально измеренными для соответствующих фермент-субстратных пар. Было выявлено, что увеличение ΔG связывания пептида в активном центре фермента, как правило, коррелирует с повышенной эффективностью катализа, что указывает на применимость метода MM-GBSA для прогнозирования каталитической эффективности бактериальных ОрВ в отношении различных субстратов, изучения роли отдельных аминокислотных остатков, а также поиска низкомолекулярных ингибиторов. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект No 21-74-20154).

РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

Химия и биология ферментов

Устные доклады

УНИВЕРСАЛЬНАЯ МОНОВАКЦИНА НА ОСНОВЕ СЕРИНОВОЙ IgA1 ПРОТЕАЗЫ МЕНИНГОКОККА

Ю.А. Прокопенко, О.В. Котельникова, Д.М. Карлинский, А.О. Залевский, Л.С. Жигис, Л.Д. Румш, А.А. Зинченко, И.В. Смирнов

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

В рамках исследования по разработке универсальной вакцины против менингита, вызываемого различными серогруппами менингококка, нами исследуются белки на основе IgA1 протеазы *Neisseria meningitidis* серогруппы В. Ранее было показано, что секреторная IgA1 протеаза (IgA1pr) *N. meningitidis* серогруппы А [Ягудаева и др., 2010], рекомбинантная IgA1pr *N. meningitidis* серогруппы В и некоторые ее фрагменты [Серова и др., 2011; Котельникова и др., 2014, 2016; Зинченко и др., 2015, 2018,] проявляют высокую иммуногенную и протективную активность при заражении животных менингококками трех основных эпидемических серогрупп А, В и С. Был проведен расчёт расположения Т-эпитопов и линейных В-эпитопов, построены пространственные модели IgA1 протеазы *N. meningitidis* серогруппы В штамма H44/76 и ряда ранее созданных укороченных белков на её основе, с последующим расчётом расположения конформационных В-эпитопов. Анализ совокупного расположения линейных и конформационных эпитопов указал на участки первичной структуры зрелого фермента, перспективные с точки зрения создания на их основе рабочего вещества вакцины. Были спроектированы и синтезированы новые белки – комбинированные молекулы, состоящие из соединенных между собой фрагментов различных участков зрелого фермента, которые по результатам экспериментальной проверки показали высокие протективные свойства против *N. meningitidis* серогрупп А, В и С, а также некоторых штаммов *Streptococcus pneumoniae* [Kotelnikova et al., 2019]. Основываясь на результате исследования зрелого фермента методом BLAST и некоторых экспериментальных данных, высказано предположение об универсальности данной вакцины и возможности её использования не только против болезней, вызываемых *N. meningitidis*, но также и бактериями *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* и *S. pneumoniae*. На основе имеющегося опыта по созданию ДНК/белковых вакцин [Durova et al., 2009], нами были наработаны и получены соответствующие белковые и ДНК молекулы для создания на их основе липосомной ДНК/белковой вакцины против вышеупомянутых патогенов.

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Н.С. Шипков¹, Н.И. Дергоусова¹, Т.В. Тихонова¹, Д.Ю. Сорокин², В.О. Попов¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха и ²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Сероокисляющая галоалкалофильная бактерия *Thioalkalivibrio paradoxus* способна к росту на тиоцианате (SCN⁻) в качестве единственного источника энергии и азота. Медь–содержащий фермент тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) отвечает за первую стадию окисления тиоцианата с образованием цианата и молекулярной серы и переносом двух электронов на акцептор. Активный центр TcDH содержит набор из 10 консервативных аминокислотных остатков, обеспечивающих поддержание структуры трехядерного медного кластера и каталитические свойства TcDH. Было высказано предположение, что характерный шаблон из 10 каталитически важных аминокислот, является маркером принадлежности белка к семейству тиоцианатдегидрогеназ. Для подтверждения этого предположения были выделены и охарактеризованы гомологи TcDH из галофильной бактерии *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1 (TtTcDH) и термофильной бактерии *Hydrogenophilales bacterium* SM250 (HbTcDH), со степенью гомологии 33 и 65%, соответственно. Оба гомолога содержат аминокислотные остатки, соответствующие предположенному шаблону. TtTcDH, выделенный из периплазматической фракции бактерии *T. thiocyanaticus*, выращенной на минеральной среде в присутствии тиоцианата, содержал 2.5–3 иона меди на молекулу белка и обладал тиоцианатдегидрогеназной активностью. Для рекомбинантного HbTcDH, экспрессированного в штамме *E. coli* Origami DE3, после насыщения ионами Cu²⁺ также обнаружена тиоцианатдегидрогеназная активность. Таким образом подтверждено предположение, что характерный шаблон из 10 каталитически важных аминокислот, обнаруженный у тиоцианатдегидрогеназ из бактерий рода *Thioalkalivibrio*, является маркером принадлежности белка к семейству тиоцианатдегидрогеназ. Дополнительно проанализированы свойства и особенности структуры TcDH из разных источников, связанные с адаптацией их к условиям обитания соответствующих бактерий.

ШИРОКАЯ СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ У ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТ-ЗАВИСИМЫХ ТРАНСАМИНАЗ IV ТИПА УКЛАДКИ

Е.Ю. Безсуднова¹, К.М. Бойко¹, М.Г. Хренова², А.Ю. Николаева³, Т.В. Ракитина⁴, В.О. Попов¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова; ³НИЦ «Курчатовский институт»;

⁴Институт биоорганической химии им. М.М. Шелякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Трансаминазы – природные биокатализаторы переноса аминокислотной группы – являются высоко стереоселективными ферментами. Это качество сочетается со способностью трансаминаз аминировать самые разные по составу кетосоединения, что делает их привлекательными объектами как для биотехнологии, так и в фундаментальных исследованиях. Специфичность к разным субстратам достигается при высокой структурной гомологии функциональных димеров трансаминаз, что позволяет исследовать на их примере взаимосвязь последовательность–структура–функция. По типу пространственной укладки домена, связывающего кофактор пиридоксаль-5'-фосфат (PLP), трансаминазы делятся на два суперсемейства: I типа укладки PLP-связывающего домена и IV типа укладки PLP-связывающего домена. Мы поговорим о трансаминазах IV типа укладки, ко-

торые отличаются способностью катализировать редкое в природе (R)-селективное присоединение аминокислоты. Такая специфичность определяется организацией активного центра этих ферментов. Здесь стоит отметить, что трансминазы IV типа укладкой включают как (R)-селективные трансминазы D-аминокислот и (R)-аминов, так и (S)-селективные трансминазы природных разветвленных L-аминокислот, то есть IV тип укладки PLP-связывающего домена достаточно универсален и не накладывает ограничений на стереоселективность фермента. При этом среди трансминаз встречаются ферменты с широкой субстратной специфичностью, способные деаминировать как L-аминокислоты, так и (R)-первичные амины. Кроме того, есть мнение, что активность с первичными аминами есть промискуитетная активность любых трансминаз, то есть неспецифическая активность, реализующаяся в активном центре, специализированном для превращения D- или L-аминокислот. Другими словами, промискуитетная активность – это своего рода эволюционный потенциал, заложенный в ферменте, и в трансминазах этот потенциал может реализоваться в специализации к аминам. Как широкая субстратная специфичность, так и промискуитетная активность реализуются в рамках трехмерной структуры фермента и возможны благодаря взаимодействию остатков, формирующих активный центр. *Работа проведена при поддержке гранта РФФ №19-14-00164.*

РАЗНООБРАЗИЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ СЕМЕЙСТВА X У ПРОКАРИОТ

М.А. Простова¹, С.С. Рязанский¹, Е.С. Шилкин¹, Д.М. Есюнина¹, А.А. Комар², А.В. Макарова¹, А.В. Кульбачинский¹

¹Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ²Center for Gene Regulation in Health and Disease and Department of Biological, Geological and Environmental Sciences, Cleveland State University, USA

ДНК-полимеразы семейства X широко распространены во всех царствах, но хорошо исследованы только у эукариот, где они задействованы в процессах репарации ДНК. На сегодняшний день изучены полимеразы X-семейства всего четырех видов бактерий, а полимеразы архей совсем не исследованы. По сравнению с эукариотическими полимеразми, полимеразы X-семейства прокариот содержат дополнительный домен РНР (от polymerase and histidine phosphatase), который обладает 3'-5' экзонуклеазной, 3'-фосфатазной и AP-эндонуклеазной активностями и может участвовать в репарации ДНК. Мы провели биоинформатический анализ последовательностей полимераз X в геномных базах данных и обнаружили, что около трети всех полимераз X прокариот содержат замены в каталитической триаде полимеразного домена, несовместимые с полимеразной активностью. Эти замены часто сопровождаются делециями в полимеразном домене, а также делециями и заменами в нуклеотид-связывающем домене. Обнаруженные изменения были подтверждены секвенированием нуклеотидной последовательности полимераз нескольких бактерий из нашей коллекции. Несмотря на вероятную потерю ДНК-полимеразной активности, неканонические полимеразы содержат полноценный домен РНР, который сохраняет все остатки нуклеазного каталитического центра. Практически все обнаруженные нами неканонические полимеразы формируют единую кладу на филогенетическом дереве, что указывает на их единое происхождение. При этом описанная кладка включает разнообразные филумы бактерий, которые удалены друг от друга на дереве, построенном по последовательностям 16S рНК, что свидетельствует о горизонтальном переносе генов неканонических полимераз между филумами. Мы исследовали *in vitro* неканонические полимеразы X-семейства двух видов бактерий рода *Deinococcus* и показали, что, действительно, эти полимеразы не обладают полимеразной активностью, но обладают активностями, локализованными в домене РНР. Можно предположить, что, хотя полимеразный домен утратил свою основную функцию, вероятно, он нужен для связывания ДНК-субстратов и правильного позиционирования домена РНР в процессе реакции. Насколько нам известно, описанная группа полимераз X является первым примером ДНК-полимераз, эволюционно утративших полимеразную активность ради другой функции.

Работа поддержана грантом РФФ 17-14-01393.

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАЦИИ АПУРИНОВЫХ/АПИРИМИДИНОВЫХ САЙТОВ В ДНК, СОДЕРЖАЩИХ ОБЪЕМНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ – ПРОИЗВОДНЫЕ БЕНЗ[А]ПИРЕНА

Н.И. Речкунова, Н.А. Лебедева, Е.А. Мальцева, П.В. Жданова, В.В. Коваль, О.И. Лаврик

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

В результате комбинированного действия реакционноспособных метаболитов бенз[а]пирена (BP) и окислительного стресса в ДНК могут возникать кластерные повреждения, содержащие одновременно объемные химические аддукты и апуриновые/апиридиновые сайты (AP-сайты), исправляемые по механизму эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН) и оснований (ЭРО) соответственно. При репарации таких повреждений требуется точная регуляция последовательности исправления отдельных повреждений во избежание формирования двухцепочечных разрывов, которые более токсичны для клетки, чем разрывы в одной цепи ДНК. Наиболее благоприятный сценарий в исправлении такого типа повреждений – упреждающее удаление AP-сайта системой ЭРО, поскольку скорость репарации повреждений по этому механизму значительно выше, чем в системе ЭРН. Исследовано влияние конформации производных BP, присоединенных к экзоциклической аминокислоте гуанина (BPDE-dG), а также взаимного положения повреждений, на активность ферментов ЭРО – AP-эндонуклеазы (APE1) и ДНК-полимераз β (Pol β) и λ (Pol λ). Мы обнаружили, что APE1 гидролизует AP-сайты, расположенные напротив BPDE-dG или смещенные в 5'-направлении цепи, с гораздо большей эффективностью, чем AP сайты, смещенные в 3'-направлении. Для всех структур, кроме ДНК с AP-сайтом, смещенным на 3 нуклеотида в 3'-направлении, гидролиз был более эффективным в случае trans-BPDE-dG. Моделирование по методу молекулярной динамики показало, что в комплексе APE1 с такой ДНК остаток trans-BPDE-dG нарушает геометрию активного центра фермента в большей степени, чем cis-изомер. Эффективность и точность репарационного синтеза, катализируемого Pol β и λ , в образующихся после гидролиза AP-сайта брешах также зависели от конформации BPDE-dG и его положения относительно бреши. Показано, что Pol λ селективно включает комплементарный dCTP только напротив cis-BPDE-dG, тогда как Pol β встраивает как правильный, так и ошибочные нуклеотиды напротив обоих изомеров. Анализ молекулярной динамики ДНК-белковых комплексов позволил выявить структурные особенности комплекса Pol λ с ДНК, содержащей однонуклеотидную брешь напротив cis-BPDE-dG, обеспечивающие селективность фермента в отношении этого конформера. *Работа поддержана грантом РФФ 21-64-00017.*

ВЛИЯНИЕ ОКСАЛОАЦЕТАТА НА СТРУКТУРУ ГЛИЦЕРОФOSFATДЕГИДРОГЕНАЗЫ, МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Н.А. Колотьева, Ф.Н. Гильмиярова, О.А. Гусякова

Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, Самара

Изучение малых молекул (соединений с молекулярной массой от 40 до 1000 Да) на сегодняшний день представляется актуальной задачей. Имея совсем небольшую молекулярную массу, они оказывают множественные влияния не только на метаболизм в целом, но и регулируют белок-белковые взаимодействия. Исследование посвящено изучению влияния оксалоацетата на конформационную структуру глицерофосфатдегидрогеназы в температурном градиенте с последующим построением математической модели. Методом дифференциальной сканирующей флуориметрии на приборе Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Германия) изучали конформационную стабильность каталитического белка глицерофосфатдегидрогеназы под влиянием оксалоацетата. Исследовали соотношение флуоресценций (350/330 нм) глицерофосфатдегидрогеназы в присутствии лиганда в концентрациях 0,5 – 16 мкМ в температурном градиенте 20–95°C. Строили линейные регрессионные модели для физиологического температурного диапазона и нелинейные (полином третьей степени) — для температурного диапазона, соответствующему плавлению белка. Независимой переменной была температура, переменной – соотношение флуоресценций. С помощью сравнения параметров полученных регрессионных моделей оценивали влияние различных концентраций оксалоацетата на термостабильность глицерофосфатдегидрогеназы. При физиологическом диапазоне температур 20–40°C установлены более низкие, чем в контроле соотношения флуоресценций и скорости их роста при концентрации оксалоацетата 0,5–8 мкМ ($p < 0,001$). Выявлены более высокие средние соотношения флуоресценций и скорости их роста при концентрации оксалоацетата 16 мкМ ($p < 0,001$). Проведенный эксперимент демонстрирует изменение общей амплитуды сигнала флуоресценции в процессе нагревания фермента. Влияние биологически активных соединений на соотношение флуоресценций различается в области низких концентраций (0,5 и 1 мкМ) и высоких (16 мкМ). Оксалоацетат в конечной концентрации 0,5–1 мкМ способствует повышению термодинамической стабильности глицерофосфатдегидрогеназы, а концентрация 16 мкМ вызывает снижение ее термостабильности. Документирование и интерпретация взаимодействий между метаболитами и белками будут важны для оценки здоровья человека, помогая исследователям понять молекулярную основу нормы и патологических состояний.

НОВЫЙ КЛАСС БАКТЕРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ-АРГОНАВТОВ, ИСПОЛЬЗУЮЩИХ РНК-ГИДЫ ДЛЯ РАЗРЕЗАНИЯ ДНК-МИШЕНЕЙ

А.А. Агапов, М.Д. Лаврова, А.В. Олина, А.В. Кульбачинский, Д.М. Есюнина

Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Белки-Аргонавты широко распространены среди эукариот, где играют ключевую роль в РНК-интерференции. В клетках эукариот Аргонавты обеспечивают специфичность узнавания РНК-мишеней при интерференции, используя комплементарные РНК-гиды длиной около 20-30 нуклеотидов. Биоинформатический анализ геномных данных показывает наличие большого разнообразия белков семейства Аргонавтов у бактерий и архей. Согласно предсказаниям, часть прокариотических Аргонавтов обладает нуклеазной активностью, но большинство не способны к разрезанию мишени. На сегодня детально исследовано всего несколько Аргонавтов прокариот, причем большинство из них связывают ДНК-гиды и ДНК-мишени. Недавно были описаны отдельные представители бактериальных Аргонавтов, способные связывать РНК-гиды и с их помощью узнавать и разрезать как ДНК, так и РНК. Мы обнаружили группу активных белков-Аргонавтов бактерий, которые обладают строгой специфичностью к РНК-гидам и ДНК-мишеням. В отличие от большинства исследованных Аргонавтов, эта группа белков способна использовать в качестве гидовых молекул РНК длиной несколько десятков нуклеотидов и предпочитает нефосфорилированные по 5'-концу гиды. Обнаруженные особенности указывают на существование пока неизвестного пути биогенеза гидовых РНК, используемых Аргонавтами в клетках бактерий. В одном опероне с генами некоторых из исследуемых нами белков закодирована консервативная РНКаза, которая может быть вовлечена в процесс биогенеза гидовых молекул. В то время как функции эукариотических белков-Аргонавтов хорошо известны, роль их гомологов в бактериях только начинает активно изучаться. Мы показали, что экспрессия РНК-зависимого Аргонавта с ДНКазной активностью в клетках *E. coli* снижает чувствительность к антибиотику ципрофлоксацину, ингибирующего топоизомеразу II. Это может указывать на роль бактериальных белков-Аргонавтов в процессинге ДНК и организации нуклеоида. Обнаружение группы ДНКаз, программируемых короткими РНК-гидами, то есть похожих по специфичности на белок Cas9, может быть перспективным для разработки подходов к направленному изменению геномов и транскриптомов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-74-10127. А.А. Агапов поддержан Skoltech Systems Biology Program.

ТРАНСАМИНАЗА ИЗ *HALISCOMENOBACTER HYDROSSIS*: ПРИЧИНЫ И СМЫСЛ ПЕРЕСТРОЙКИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ПРИ ДИССОЦИАЦИИ КОФАКТОРА ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТА.

А.К. Бакунова¹, К.М. Бойко¹, А.Ю. Николаева², Т.В. Ракитина², В.О. Попов^{1,2}, Е.Ю. Безсуднова¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН»; ²НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) зависимые трансминазы (ТА) – ключевые ферменты метаболизма аминокислот во всех организмах: ТА катализируют обратимый стереоселективный перенос аминокислоты/амина на кетокислоту/кетон с образованием новой аминокислоты/амина и новой кетокислоты/кетона. В биотехнологии ТА востребованы в процессах стереоселективного аминирования органических соединений. Основными характеристиками ферментов являются их субстратная специфичность, скорость реакции и стабильность. Стабильность ТА, кроме общей для ферментов устойчивости белкового каркаса и целостности активного центра, характеризуется стабильностью холоформы – ковалентного соединения кофактора PLP с молекулой ТА. Диссоциация кофактора – это один из путей деградации ТА, который приводит к инактивации

ции фермента, изменениям в трехмерной структуре и далее к агрегации. Охарактеризованная нами ТА из *Haliscomenobacter hydrossis* (Halhu) принадлежит к суперсемейству трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена. Halhu отличается высокой скоростью деаминарования разнообразных D-аминокислот и (R)-стереселективным аминированием широкого спектра кетокислот, энантиомерный избыток D-продукта составляет более 99.3%. Мы проанализировали стабильность холо- и апоформы Halhu и получили трехмерную структуру обеих форм методом рентгеноструктурного анализа. В структуре апоформы Halhu наблюдаются значительные перестройки α -спиралей и петель, формирующих активный центр. Учитывая, что ТА Halhu не инактивируется при диссоциации кофактора и восстанавливает активность при добавлении избытка PLP, мы предполагаем, что полученная неканоническая структура апоформы является следствием реализации механизма, с помощью которого фермент обходит путь деградации, запускаемой диссоциацией кофактора.

Работа поддержана грантом РФФ № 19-14-00164.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ HPF1 НА ПОЛИ(АДФ-РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В КОНТЕКСТЕ НУКЛЕОСОМ

Т.А. Кургина^{1,2}, Н.А. Моор¹, М.М. Кутузов¹, К.Н. Науменко¹, О.И. Лаврик^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

АДФ-рибозилирование – это эволюционно консервативная посттрансляционная модификация (ПТМ), участвующая в различных биологических процессах, включая ответ на повреждение ДНК, модуляцию хроматина, репликацию ДНК, транскрипцию, иммунный ответ и др. Среди четырех представителей семейства поли (АДФ-рибоза) полимераз, способных синтезировать ПАР, в ядре локализуются белки PARP1 и PARP2. Недавно был открыт белковый фактор HPF1, модулирующий активность PARP1 и PARP2. Было показано, что HPF1 (Histone PARylation factor 1) связывается с каталитическим доменом PARP1 и PARP2, образуя объединенный активный центр, который позволяет переключить субстратную специфичность PARP1/PARP2 в реакции поли(АДФ-рибозил)ирования (ПАРилирования) с “классических” для этой реакции остатков глутамата, аспартата или лизина на серин [Gibbs-Seymour, 2016; Suskiewicz, 2020]. Такое изменение специфичности делает возможным ПАРилирование гистонов [Gibbs-Seymour, 2016]. В то же время, такой совместный активный центр способствует укорочению синтезируемого ПАР за счёт экранирования аминокислот PARP1/2, обеспечивающих элонгацию синтеза [Suskiewicz, 2020]. Помимо влияния на субстратную специфичность и длину ПАР, для PARP1 было показано увеличение гидролазной активности в присутствии HPF1 [Bilokapic, 2020]. В свете интригующих данных, имеющих в настоящий момент относительно влияния HPF1 на активность PARP1, в настоящем исследовании мы провели сравнительную характеристику эффектов различных концентраций HPF1 на PARP1 и PARP2 в синтезе ПАР, катализируемого этими ферментами в присутствии нуклеосомной ДНК и нуклеосом, а также сравнили влияние HPF1 на рибозилирование гистонов. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что PARP2 в сравнении с PARP1 является предпочтительным партнёром HPF1. Полученные данные открывают новые черты механизма ПАРилирования PARP1/PARP2 и гистонов в присутствии фактора HPF1 в контексте нуклеосом. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-34-90095.*

НОВЫЙ МЕДЬ-СОДЕРЖАЩИЙ ФЕРМЕНТ ТИОЦИАНАТДЕСУЛЬFUРАЗА – ОТ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ

Л.А. Варфоломеева¹, К.М. Поляков², С.И. Цаллагов¹, И.Г. Шабалин³, М.Г. Хренова^{1,4}, К.М. Бойко¹, Т.В. Ракитина⁵, В.Р. Хаген⁶, Т.В. Тихонова¹, В.О. Попов^{1,5}

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ³Факультет молекулярной физиологии и биологической физики, Университет Вирджиния, Шарлоттсвилль, США; ⁴Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁵НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ⁶Факультет биотехнологии, Делфтский технический университет, Делфт, Нидерланды

Медь – один из наиболее распространенных и важных переходных металлов в живых организмах. Медь входит в состав простетических групп/кофакторов белков и ферментов, связанных с такими жизненно важными функциями как дыхание, защита от окислительного стресса, метаболизм железа, биосинтез гормонов и нейротрансмиттеров и т.д. В настоящее время в белках выделяют шесть типов медных центров, которые классифицируются, основываясь на типе лигандов, входящих в координационную сферу иона. Новый медь-содержащий фермент тиоцианатдесульфуреза (тиоцианатдегидрогеназа, TCDH), выделенный из галоалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus*, катализирует реакцию окислительного разложения тиоцианата с образованием цианата, молекулярной серы и двух электронов. TCDH является гомодимером, субъединица которого представляет собой 7-лопастный бета-пропеллер. В активном центре фермента содержится трехъядерный медный кластер, имеющий уникальную структуру, не соответствующую ни одному ранее описанному типу. На основании структурных данных локализованы аминокислотные остатки, ключевые для структурной организации активного центра и катализа, в том числе остатки, координирующие ионы меди каталитического кластера. Методом ЭПР охарактеризовано электронное состояние медного кластера в свободном состоянии и в процессе реакции. С использованием объединенного метода молекулярной и квантовой механики сформулирован молекулярный механизм каталитической стадии реакции. Для подтверждения роли остатков активного центра в предложенном механизме действия был проведен точечный мутагенез с последующей структурной и функциональной характеристикой полученных мутантных форм.

ЛАНОСТЕРОЛ 14-АЛЬФА ДЕМЕТИЛАЗА ЧЕЛОВЕКА (CYP51A1) КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ФЛАВОНОИДОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Л.А. Калужский¹, П.В. Ершов¹, Е.О. Яблоков¹, Т.В. Шкель², И.П. Грабовец², Ю.В. Мезенцев¹, О.В. Гнеденко¹, С.А. Усанов², П.С. Шабуя², С.А. Фатыхова², А.М. Попов³, А.А. Артюков³, О.Н. Стышова³, А.А. Гилеп², Н.В. Струшкевич⁴, А.С. Иванов¹

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва; ²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; ³Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток; ⁴Сколковский институт науки и технологий, Москва

Холестерин является одним из метаболических факторов рака. Ланостерол 14-альфа-деметилаза (цитохром P450 (51), CYP51A1) катализирует один из ключевых этапов биосинтеза холестерина. CYP51A1 человека в последнее время активно изучается в качестве потенциальной мишени для противораковых препаратов, направленных на снижение уровня холестерина. Мы показали, что природный флавоноид, 7,3'-дисульфат лютеолина, способен ингибировать активность CYP51A1 человека *in vitro*. Также было обнаружено, что природные флавоноиды: байкалеин и лютеолин – обладающие противоопухолевой активностью и низкой токсичностью, способны взаимодействовать с CYP51A1 человека. Значения равновесных констант диссоциации комплексов оценивали с использованием оптического биосенсора поверхностного плазмонного резонанса и спектрального титрования. Неожиданно оказалось, что в анализах ферментативной активности значимый ингибирующий эффект на активность CYP51A1 человека был показан только для водорастворимого производного лютеолина, 7,3'-дисульфат лютеолина. На основании молекулярного докинга связывание 7,3'-дисульфата лютеолина предполагает блокирование канала доступа субстрата к гему активного центра фермента. Однако, нельзя исключить существование альтернативного сайта связывания ингибитора в проксимальной зоне поверхности белка, где происходит связывание редокс-партнёра. Таким образом было показано, что флавоноиды могут подавлять активность CYP51A1 человека, и этот класс соединений имеет смысл исследовать более подробно на предмет их потенциала как противоопухолевых средств и средств, направленных на снижение эндогенного холестерина.

Анализ поверхностного плазмонного резонанса был выполнен при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00014) и проводился на оборудовании ЦКП «Протеом человека» Института биомедицинской химии, поддержанного Минобрнауки, договор № 075-15 -2019-1502 от 5 сентября 2019 года. Анализ каталитической активности был выполнен при поддержке ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия», (задание 2.3.1.1). Спектральное титрование и молекулярный докинг были выполнены в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 – 2030 годы).

ГИДРОЛИЗ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ СЫВОРОТОЧНЫМИ АБЗИМАМИ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

Д.А. Паршукова^{1,3}, А.А. Кузницына⁴, А.К. Сурин⁴, Е.А. Ермаков², В.Н. Бунева², Л.П. Смирнова¹

¹НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН, Томск; ²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ³Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Томск; ⁴Институт белка РАН, Лаборатория биоинформатических и протеомных исследований, Пушкино

В настоящее время активно развивается направление исследования роли каталитических антител в патогенезе различных заболеваний. Так при шизофрении выявлены абзимы с нуклеазной, каталазной и оксидоредуктазными активностями. Исследования протеолиза нейроспецифических белков сывороточными антителами, которые могли бы установить молекулярные особенности нарушения нейронных взаимодействий, лежащих в основе шизофрении, обладают высокой степенью актуальности. В данной работе изучена каталитическая активность IgG при шизофрении в отношении основного белка миеллина (ОБМ) и субъединиц NR1 и NR2 NMDA рецептора. Сывороточные IgG были очищены методом аффинной хроматографии на колонке с Protein-G Sepharose. Принадлежность изучаемой активности непосредственно IgG была подтверждена электрофоретической гомогенностью; высокоэффективной гель-фильтрацией при pH 2,6; определением активности «in situ». Гидролиз человеческого ОБМ оценивался методом электрофореза в ПААГ в единицах удельной активности (мг ОБМ/мг IgG/ч). Для оценки протеолиза zNMDAR использовали рекомбинантные белки, содержащие фрагменты внеклеточных доменов субъединиц NR1 и NR2 NMDA рецептора. Аминокислотная последовательность продуктов протеолиза оценивалась с помощью масс-спектрометрии (Orbitrap Elite), обработка результатов в программном пакете PEAKS Studio-7.5. Скрининг активности ОБМ-гидролизующих IgG выявил высокую протеолитическую активность у пациентов с шизофренией, возрастающую при дефицитарной шизофрении. Протеолитическая активность IgG пациентов с шизофренией в стадии обострения (1,026 [0,205; 3,342] мг ОБМ/мг IgG/ч) значительно выше чем у пациентов в ремиссии (0,656 [0,279; 0,873] мг ОБМ/мг IgG/ч.) и здоровых лиц (0,000 [0,00; 0,367] мг ОБМ/мг IgG/ч). Впервые показано, что сывороточные IgG больных шизофренией гидролизуют NR1 и NR2 субъединицы NMDA рецептора в эксперименте *in vitro*. Масс-спектрометрический анализ продуктов протеолиза выявил 29 специфических пептида zNMDAR1 субъединицы. Учитывая высокую патогенетическую значимость повреждения миеллина и нарушения работы NMDA рецепторов при шизофрении, протеолитические абзимы могут способствовать установлению новых молекулярных механизмов развития заболевания.

Работа поддержана грантом РНФ №18-15-00053П.

НОВОЕ ПОДСЕМЕЙСТВО АТФ-ЗАВИСИМЫХ Lon-ПРОТЕАЗ. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ДОМЕНОВ LonVA-ПРОТЕАЗЫ *BACILLUS SUBTILIS*

А.Г. Андрианова, А.М. Куджаев, О.В. Карцева, И.В. Смирнов, Т.В. Ротанова

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

АТФ-зависимые Lon-протеазы – высокоселективные гомоолигомерные ферменты, относящиеся к AAA+-суперсемейству и представленные во всех царствах живой природы. Они являются важнейшей частью системы контроля качества протеома. Их субстраты – мутантные, поврежденные и короткоживущие регуляторные белки. Субъединицы Lon-протеаз включают центральный АТФ-азный модуль – характеристическое ядро всех AAA+-белков, С-концевой протеазный домен (серин-лизиновая пептидгидролаза), а также экстрадомен, либо локализованный в N-концевой области фермента, либо встроенный в его АТФ-азный модуль. До недавнего времени в семействе Lon-протеаз выделяли подсемейства А, В и С, разделение которых основывается на различиях окружения каталитически активных остатков пептидазного центра, а также архитектуры АТФ-азных модулей. Известно, что LonA-протеазы обнаруживаются в прокариотах и эукариотах, LonB – только в археях, а LonC – в бактериях. Однако, в последние годы по классификации MEROPS в семейство LonB был включен ряд ферментов неархейного происхождения, обнаруженных в бактериях отдела фирмикут. Анализ первичных структур показал, что новая группа ферментов имеет гибридную природу: их АТФ-азный модуль подобен такому же модулю LonB-протеаз, а протеазный домен – соответствующему домену LonA-протеаз. Таким образом, сформировалось новое подсемейство LonVA-протеаз. В клетках *E. coli* клонирован ген LonVA-протеазы *B. subtilis* (BsLonVA) и выделен новый фермент. Ограниченным протеолизом химоатрипсином показано, что в субъединице фермента формируются устойчивые домены. Проведено клонирование АТФ-азного модуля и протеазного (Р) домена BsLonVA-протеазы. Разработаны методики выделения и очистки изолированных фрагментов фермента. Показано, что индивидуальный AAA+-модуль, формирующий в растворе смесь от моно- до тримеров, практически утрачивает способность связывать и гидролизовать АТФ. В то же время Р-домен, представленный исключительно димерами и не проявляющий активности по гидролизу белковых мишеней, сохраняет свойство расщеплять низкомолекулярные субстраты. Изолированный Р-домен стабилен, автолизу не подвергается. Проведен сравнительный анализ структурно-функциональных характеристик BsLonVA и LonA-протеазы *E. coli* и их изолированных фрагментов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00646.

ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОЛИЗА ОЛИГОГЛУТАМИНОВЫХ СУБСТРАТОВ ПРОТЕАСОМНОЙ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ

А.В. Бачева, Н.Н. Готманова

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

Деградация белков в живых организмах является важным аспектом нормальной жизнедеятельности любых клеток. В клетках эукариот протеолиз осуществляется в основном с помощью убиквитин-протеасомной системы, а также в лизосомах. Считается, что неправильно фолдированные и мутантные белки гидролизуются протеасомой, но в случае целого ряда так называемых протеопатий протеасома проявляет низкую протеолитическую активность по отношению к ключевым мутантным белкам, ответственным за эти заболевания. Активация аутофагии при этом либо не происходит, либо она недостаточно эффективна. Одним из таких заболеваний является болезнь Хантингтона, наследственное аутосомно-доминантное, прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, приводящим к гибели нейронов стриатума. Это заболевание вызывается увеличением числа повторов кодона CAG в гене, кодирующем белок хантингтин (350 кДа), что приводит к синтезу мутантного, склонного к агрегации белка с длинным полиглютаминовым трактом вблизи его N-конца. До сих пор неизвестно, какая из возможных форм протеасомы с наибольшей эффективностью способна гидролизовать полиглютаминовые фрагменты. В нашей работе изучался гидролиз пептидных субстратов, содержащих 5 и 10 остатков глутамина и FRET-пару Dabcyl-EDANS. 20S протеасома, выделенная из головного мозга мышей содержит в основном конститутивные каталитические субъединицы, в то время как протеасома, выделенная из селезенки – преимущественно иммунные каталитические субъединицы. Нами обнаружено, что при длительной инкубации олигоглютамин-содержащих субстратов с протеасомой, гидролиз конститутивной протеасомой протекал эффективнее, чем иммунопротеасомой. Было изучено влияние нескольких ингибиторов протеасомы на процесс гидролиза. Также проведен докинг субстрата Dabcyl-KQ5GD-EDANS во все шесть типов каталитических субъединиц протеасомы. *Работа выполнена при поддержке РФФИ проект № 19-04-01261.*

ЭКОЛОГО-ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ ПЕПТИДАЗ МИЦЕЛИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

Я.Е. Дунаевский, М.А. Белозерский

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

Внеклеточные пептидазы грибов ответственны за превращение сложного органического материала в более простые формы. С физиологической точки зрения они обеспечивают ресурсы производителя ферментов, с прикладной – важны в качестве генетических маркеров при решении вопросов систематики, сортовой принадлежности, фитоиммунитета, а также как многообещающие медицинские препараты. Эволюционные и экологические силы стараются минимизировать затраченную цену и максимально увеличить преимущества от продукции внеклеточных ферментов, тем самым представляя важный регулятор их продукции и активности. Способность гриба регулировать экспрессию генов, кодирующих внеклеточные ферменты, снижает потенциальную цену их продукции. Это достигается за счет субстратной индукции, зависящей от двух условий: ограниченности доступных низкомолекулярных источников и присутствия в среде годного субстрата. Чувствительность к присутствию различных концентраций пищевого субстрата позволяет грибам отвечать динамично на изменяющуюся его доступность. Сохранение ресурсов обеспечивается также путем ограничения продукции ферментов через еще один регуля-

торный механизм, — катаболитную репрессию. Высокие концентрации конечных продуктов деятельности пептидаз пептиды и аминокислоты ингибируют ферментативную активность либо через репрессию транскрипции гена фермента, либо через конкурентное ингибирование самого фермента. Таким образом, экономический аспект продукции секретируемых ферментов поддерживается сигнальными путями, которые связывают экспрессию ферментов с доступностью субстрата, тогда как их качество можно улучшить, синтезируя различные формы фермента, манипулируя способностью ферментов к диффузии и подавляя или используя в своих целях конкуренцию за реакционные продукты. Как до, так и после экспрессии функция и судьба внеклеточных ферментов находятся под контролем экологических факторов. Физико-химические свойства окружения, пищевая доступность и конкурентные взаимоотношения оказывают сильное селективное давление, влияющее на соотношение цена/качество ферментативной продукции. Регуляция продукции секретируемых ферментов на популяционном и биоценозном уровнях подчеркивает роль внеклеточных ферментов в интеграции функций микробного сообщества.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00852.

ЭНДО- α -1,4-L-ФУКАНАЗЫ МОРСКОЙ БАКТЕРИИ *WENYINGZHUANGIA FUCANILYTICA* CZ1127

А.О. Зуева, А.С. Сильченко, А.Б. Расин, С.П. Ермакова

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

Фукоиданы представляют собой обширный класс биополимеров, обладающих множеством биологических активностей: противоопухолевой, иммуномодулирующей, противовирусной и др. [1]. Полимерные цепи фукоиданов построены в основном из остатков α -L-фукозы. Их структурное разнообразие обусловлено различной степенью сульфатирования и расположением сульфатных групп при остатках фукозы, наличием ответвлений и других моносахаридных остатков [2], в связи с чем возникают трудности в установлении взаимосвязи между структурными особенностями фукоиданов и проявляемой ими биологической активностью. Фукоиданазы – ферменты, способные избирательно катализировать гидролиз O-гликозидных связей в молекулах фукоиданов. Их использование для установления структуры фукоиданов имеет ряд преимуществ перед традиционными химическими методами исследования строения полисахаридов. Продуцентами фукоиданаз могут являться морские бактерии, в геномах которых встречаются целые фукоидан-деградирующие локусы, включающие сразу несколько генов, кодирующих фукоиданазы. Необходимость такого количества фукоиданаз, вероятно, обусловлена широким структурным разнообразием фукоиданов. В рамках изучения функциональной активности ферментов фукоидан-деградирующего кластера морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127 нами были обнаружены четыре фукоиданазы. Для данных ферментов была изучена субстратная специфичность и определены субсайты связывания субстрата. Полученные данные позволяют использовать исследованные фукоиданазы для изучения структур фукоиданов и являются шагом на пути к установлению полного пути ферментативного гидролиза молекул данных полисахаридов.

Исследования выполнены за счет гранта Российского научного фонда (№ 20-74-00035).

1. Senthikumar, K. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer / K. Senthikumar et al. // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2013. – V.60. – P. 366-374;
2. Усов, А. И. Фукоиданы — сульфатированные полисахариды бурых водорослей / А. И. Усов и др. // *Успехи химии*. – 2009. – №78. – С. 846-862.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ ХОЛОФЕРМЕНТА И АПОФЕРМЕНТА ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ С НЕСТЕРОИДНЫМИ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

А.В. Кривошей^{1,2}, В.И. Бархатов^{1,2}, А.А. Ефремов², П.В. Вржещ^{1,2}

¹Международный учебно-научный биотехнологический центр и ²Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Простагландины являются регуляторами важнейших физиологических процессов в организме человека, в частности, медиаторами воспаления. Ключевую роль в синтезе простагландинов из арахидоновой кислоты играет фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS), катализирующий две последовательные реакции – циклооксигеназную и пероксидазную. Кроме субстратов реакций, с циклооксигеназным активным центром также связываются ингибиторы фермента (нестероидные противовоспалительные препараты, НПВП), а с пероксидазным – кофактор гем (Fe-протопорфирин IX), строго необходимый для проявления обеих каталитических активностей PGHS. В литературе установлено, что удаление гема из активного центра понижает сродство фермента к различным НПВП (аспирин, напроксен, индометацин, диклофенак), но механизм влияния наличия гема на взаимодействие PGHS с ингибиторами изучен недостаточно. Исследование кинетики связывания фермента с ингибитором индометацином показало, что механизм взаимодействия PGHS с индометацином состоит из быстрой и медленной стадий, при этом наличие гема не влияет на значение равновесной константы ингибирования для быстрой стадии ($K_i=27.7$ мкМ), но влияет на значения констант скорости для медленной стадии ($k_+=1.83$ с⁻¹, $k_-=1.71 \cdot 10^{-3}$ с⁻¹ для холофермента, $k_+=1.27$ с⁻¹, $k_-=4.51 \cdot 10^{-3}$ с⁻¹ для апофермента). Также было исследовано влияние присутствия гема на взаимодействие PGHS с другими НПВП (толметин, кетопрофен, фенпрофен, карпрофен, флурбипрофен). Во всех случаях холофермент связывается с ингибиторами существенно лучше, чем апофермент. Это подтверждает наличие аллостерических взаимодействий между сайтом связывания гема и циклооксигеназным активным центром PGHS. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-01150а с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета, и оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.*

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АРОМАТАЗЫ

А.В. Кузиков^{1,2}, Т.А. Филиппова^{1,2}, Р.А. Масамрех^{1,2}, В.В. Шумянцева^{1,2}

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва

Цитохромы P450 – гем-тиолатные монооксигеназы, участвующие в метаболизме ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов, и эндогенных соединений. Цитохромы P450, катализирующие ключевые стадии биосинтеза стероидных гормонов, являются молекулярными мишенями препаратов для лечения гормон-зависимых опухолей. Ароматаза (цитохром P450 19A1, CYP19A1) – ключевой фермент биосинтеза эстрогенов (эстрона и β -эстрадиола) из андрогенов (андростендиона и тестостерона). Ингибиторы ароматазы применяются для лечения эстроген-зависимого рака молочной железы. Нами разработан оригинальный подход к определению активности ароматазы, иммобилизованной на печатных графитовых электродах, модифицированных дидодецилдиметиламмония бромидом. Иницирование каталитической реакции в такой системе осуществляется за счет электрохимического восстановления иона железа гема фермента, при этом отсутствует необходимость реконструирования электрон-транспортной цепи с использованием редокс-партнеров. Продукты ферментативной реакции подвергаются электрохимическому окислению на поверхности немодифицированного графитового электрода при потенциале 497 ± 14 мВ (относительно Ag/AgCl) для эстрона и 483 ± 17 мВ (относительно Ag/AgCl) для β -эстрадиола, что лежит в основе их количественного определения. Предел определяемых концентраций был установлен как 11 нМ и 3,4 нМ для эстрона и β -эстрадиола, соответственно. Значения максимальных скоростей реакций, катализируемых ароматазой в электрохимической системе, были определены как $0,86 \pm 0,12$ с⁻¹ и $0,17 \pm 0,02$ с⁻¹, констант Михаэлиса – $4,2 \pm 1,5$ мкМ и $3,8 \pm 1,3$ мкМ по отношению к андростендиону и тестостерону, соответственно. Мы показали возможность применения разработанной электрохимической системы для исследования ингибиторной активности и механизмов действия по отношению к ароматазе противоопухолевых соединений для лечения рака молочной железы. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы).

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНИЦИАЦИИ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ В НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ ДНК

А.А. Кузнецова¹, О.С. Федорова^{1,2}, Н.А. Кузнецов^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины; ²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск

С помощью биоинформационного анализа показано, что в геноме человека могут встречаться неканонические структуры, отличные от В-формы ДНК, например, G-квадруплексы. Наиболее часто они встречаются в теломерных участках хромосом. Кроме того, более 40% генов человека содержат вблизи промоторных областей последовательности, которые могут образовывать структуры G-квадруплексов. Существуют и другие неканонические структуры ДНК, содержащие выпетливания, шпильки или «пузыри», которые могут играть функционально важную роль в ходе транскрипции, репликации или рекомбинации. Известно, что окислительная модификация нуклеиновых кислот может протекать как по гетероциклическим основаниям, так и по остатку рибозы. Последствия окислительной дегградации ДНК зависят от типа повреждения и его репарационной устойчивости. Среди гетероциклических оснований гуанин является самой восприимчивой мишенью при окислении, поэтому богатые гуанином участки ДНК являются своеобразными «горячими точками окисления». Среди часто встречающихся продуктов окисления можно выделить 7,8-дигидро-8-оксогуанин, тимингликоль и AP-сайты, которые удаляются из ДНК по пути эксцизионной репарации оснований. Следует отметить, что особенности процесса репарации ДНК в неканонических структурах до сих пор плохо изучены. В данной работе был проведен сравнительный анализ эффективности удаления поврежденных нуклеотидов из различных G-квадруплексов и структур, содержащих выпетливания, под действием ДНК-гликозилаз человека OGG1, NEIL1, NTH1 и прокариотических гликозилаз Fpg и Nei. Все протестированные ферменты были способны расщеплять структуры ДНК, содержащие повреждения в участке выпетливания, с достаточно высокой эффективностью по сравнению с каноническими дуплексами ДНК-субстратами. Таким образом, процесс эксцизионной репарации оснований может быть эффективно инициирован даже в частично одноцепочечных участках ДНК, образующихся в качестве промежуточных структур в ходе клеточных процессов. В тоже время расщепление поврежденных квадруплексов наблюдали только для членов структурного семейства H2tH (Fpg, Nei, NEIL1), что указывает на возможность участия этих ферментов в регуляции процессов, контролируемых образованием квадруплексных структур в геномной ДНК.

Работа выполнена при поддержке грантом РФФИ № 19-04-00012.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИСОЕДИНЕНИЯ НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТОВ И СКОРОСТЬ ЭЛОНГАЦИИ ПРАЙМЕРА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛТРАНСФЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА TdT

А.А. Кузнецова, И.В. Алексеева, О.А. Кладова, О.С. Федорова, Н.А. Кузнецов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (TdT) принадлежит семейству X ДНК-полимераз, которое у человека включает еще три фермента: Pol β , Pol μ , Pol λ . Все четыре представителя ДНК-полимераз семейства X у человека вовлечены в репарацию и восстановление целостности ДНК: Pol β играет ключевую роль в процессе эксцизионной репарации оснований, Pol μ и Pol λ вовлечены в процесс негомологичного соединения концов ДНК, а TdT отвечает за присоединение небольшого числа «случайных» нуклеотидов к неспаренным участкам ДНК со свободной 3'-ОН группой в процессах перестройки генов, в ходе так называемой V(D)J-рекомбинации. Необходимо отметить, что структура каталитического домена у всех ферментов имеет общую архитектуру. Все ДНК-полимеразы используют в качестве кофактора каталитической реакции ион двухвалентного металла. Однако в отличие от матрица-зависимых «gap-filling» ДНК-полимераз Pol β , Pol μ , Pol λ , фермент

TdT катализирует добавление нуклеотидов независимым от матрицы способом. Он преимущественно связывается с одноцепочечной ДНК и не приспособлен к копированию матричной цепи. Кроме того, TdT может включать в растущую цепь как дезоксирибо- так и рибонуклеозидтрифосфаты, а также модифицированные по фосфатной группе, остатку рибозы и азотистому основанию производные. В настоящее время изучение механизма действия матрица-независимых дезоксирибонуклеотидилтрансфераз связано не только с целью улучшения понимания процессов рекомбинации и репарации ДНК, но и с целью практического применения этих ферментов для направленного эффективного *in vitro* синтеза протяженных олигонуклеотидов, которые не могут быть синтезированы классическим химическим способом с использованием фосфитаминов. В ходе данной работы с использованием очищенного генно-инженерного препарата TdT установлено, что эффективность присоединения природных нуклеозидтрифосфатов и скорость элонгации праймера зависят как от структуры азотистого основания, так и от иона-кофактора. Установлено, что в присутствии природного кофактора Mg^{2+} эффективность присоединения нуклеотидов уменьшается в ряду $dGTP > dATP \approx dTTP > dCTP$. Показано, что ионы металлов Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} оказывают существенное влияние на скорость присоединения природных нуклеотидов.

Работа выполнена при поддержке грантом РНФ № 21-64-00017.

THE EFFICIENCY OF XPD-p44 INTERACTION WITH THE DAMAGED DNA DURING NER IS DETERMINED BY THE LESION STRUCTURE (ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ XPD-p44с ПОВРЕЖДЕННОЙ ДНК В ПРОЦЕССЕ ЭРН ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ СТРУКТУРОЙ ПОВРЕЖДЕНИЯ)

Irina Petrusheva¹, Natalia Naumenko¹, Jochen Kuper², Rashid Anarbaev¹, Jeannette Kappenberger², Caroline Kisker², Olga Lavrik¹

¹Laboratory of Bioorganic Chemistry of Enzymes, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia, ²Rudolf Virchow Center for Integrative and Translational Bioimaging, University of Wuerzburg, Germany

The successful elimination of bulky DNA damages via the nucleotide excision repair (NER) system is largely determined by the damage recognition step. This step consists of primary recognition and verification of the damage. The TFIIH helicase XPD plays a key role in the verification step during NER. To date, the mechanism of damage verification is not sufficiently understood and requires further detailed research. This study is a systematic investigation of the interaction of ctXPD (*Chaetomium thermophilum*) as well as ctXPD-ctp44 with model DNAs, which contain structurally different bulky lesions with previously estimated NER repair efficiencies. We have used ATPase and DNA binding studies to assess the interaction of ctXPD with damaged DNA. The result of the analysis of ctXPD-ctp44 binding to DNA containing fluorescent and photoactivatable lesions demonstrates the relationship between the affinity of XPD for DNAs containing bulky damages and the ability of the NER system to eliminate the damage. Photo-cross-linking experiments using DNA probes containing reparable and non-reparable photo activated lesions to ctXPD revealed differences in the efficiency of interaction of these DNAs with ctXPD in the presence and absence of ATP and ctp44. The results obtained indicate the ability of ctXPD-ctp44 to specifically interact with damage with the formation of covalent adducts and reveal the important role that the ctp44 subunit plays in the process of damage verification by the NER system.

ПРОМОТОРНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ХОЛОФЕРМЕНТОВ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS С СИГМА А И СИГМА В-СУБЪЕДИНИЦАМИ

И.В. Петушков¹, С.С. Рязанский¹, З. Моришо², К.Л. Бродолин², А.В. Кульбачинский¹

¹Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ²Институт изучения инфекционных заболеваний в Монпелье Национального центра научных исследований, Монпелье, Франция

Бактерия *Mycobacterium tuberculosis* имеет ряд особенностей аппарата транскрипции, которые могут обуславливать высокую патогенность и устойчивость этого возбудителя к внешним воздействиям. Помимо главной сигмаА-субъединицы, эта бактерия имеет 12 альтернативных сигма-субъединиц, при этом сигмаВ-субъединица очень близка по последовательности и специфичности к главной. Другой особенностью является наличие транскрипционного фактора RbpA, участвующего в связывании РНК-полимеразы с промотором. Целью нашей работы является установления различий в промоторной специфичности между холоферментами с сигмаА и сигмаВ-субъединицами и оценка влияния фактора RbpA на специфичность узнавания промоторов. Нами был получен набор ДНК-аптамеров к холоферментам с каждой сигма-субъединицей в присутствии и в отсутствие фактора RbpA. Большая часть одноцепочечных аптамеров имеет характерный мотив YAYA(A/M)T, где Y – остаток Т или С, М – остаток А или С. Этот мотив напоминает -10-элемент промотора. Примечательно, что аптамеры к холоферменту с сигмаВ-субъединицей имеют более строгий вид мотива ТАТААТ, и часто дополнены TG-элементом и остатком G в дискриминаторе. Наличие фактора RbpA при отборе не влияет на вид консенсуса -10-подобного элемента в случае холофермента с сигмаА-субъединицей, но влияет в случае сигмаВ-субъединицы, а также уменьшает долю аптамеров с TG-элементом. Полученные аптамеры имеют высокую аффинность к соответствующим холоферментам РНК-полимеразы и связываются с ними с константами диссоциации в районе 1-50 нМ. Добавление RbpA практически не влияет на аффинность аптамеров к холоферменту с сигмаА-субъединицей и значительно увеличивает их сродство к холоферменту с сигмаВ-субъединицей, а также нивелирует разницу между аптамерами с TG-элементом и без него. Таким образом, мы выявили, что холофермент с сигмаВ-субъединицей лучше связывает более близкие к консенсусу последовательности расширенного -10-элемента и более требователен к наличию фактора RbpA. Это, возможно, отражается на узнавании промоторов в клетке и может влиять на регуляцию транскрипции с участием данной сигма-субъединицы.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РНФ 17-14-01393.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГОМОЛОГИИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ IgA1 ПРОТЕАЗ ИЗ *NEISSERIA MENINGITIDIS*, *NEISSERIA GONORRHOEAЕ* И *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

Д.М. Карлинский, Ю.А. Прокопенко, А.А. Зинченко

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

Менингококковый менингит – смертельно опасное заболевание, вызывающее поражение оболочек головного и спинного мозга. На данный момент не существует моноконпонентной вакцины, которая обеспечивала бы защиту от всех серогрупп менингококка (бактерии *Neisseria meningitidis*). Одним из перспективных направлений является разработка вакцины на основе IgA1 протеазы – одного из факторов вирулентности этого патогена. В данной работе было проведено сравнение аминокислотных последовательностей IgA1 протеаз штаммов *N. meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Haemophilus influenzae*. В результате анализа гомологии первичных структур IgA1 протеаз 1061 штамма *N. meningitidis* были обнаружены участки с высокой степенью сходства (более 87%). Полипептиды из этих участков были выбраны в качестве кандидатных для создания белковой вакцины. Для анализа потенциальной полиреактивности создаваемой вакцины был проведен поиск гомологичных последовательностей IgA1 протеаз в штаммах *Neisseria gonorrhoeae* и *Haemophilus influenzae*. Было установлено, что в геномах всех 602 рассмотренных штаммов *Neisseria gonorrhoeae* и в 137 из 521 рассмотренных штаммов *Haemophilus influenzae* обнаруживаются участки последовательности IgA1 протеазы, обладающие высокой степенью гомологии (более 85%) с кандидатными пептидами вакцины. Это позволяет рассматривать данные микроорганизмы в качестве потенциальных объектов действия разрабатываемой моноконпонентной вакцины.

ОТКРЫТИЕ ФУКОИДАН ЭНДО-40-СУЛЬФАТАЗЫ: МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ, СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ПОТЕНЦИАЛ ПРИМЕНЕНИЯ

А.С. Сильченко, А.Б. Расин, А.О. Зуева, Н.К. Рубцов, С.П. Ермакова

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

Фукоиданы относятся к классу сульфатированных фукозосодержащих полисахаридов, продуцируемых бурными водорослями. Эти полисахариды привлекают большое внимание исследователей благодаря их разнообразным биологическим свойствам. В связи с их сложным строением выявление элементов структур, ответственных за проявляемые биологические свойства, затруднено. Фукоидансульфатазы могут стать эффективными инструментами для исследования взаимосвязи между сульфатированием фукоиданов и их биологическим действием. Однако, данные ферменты практически не изучены. В настоящее время аминокислотные последовательности и детальная специфичность определены только для двух фукоидан экзо-сульфатаз SWF1 и SWF4 из морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica*. Эти ферменты катализируют отщепление сульфатных групп от концевого остатка L-фукопиранозы в фукоолигосахаридах и не катализируют десульфатирование остатков L-фукозы внутри полимерной цепи фукоиданов. Существует только одно свидетельство о существовании сульфатаз способных десульфатировать фукоиданы: частично очищенный препарат эндо-сульфатазы из морского моллюска *Pecten maximus* катализировал отщепление 20-сульфатных групп от полимерной цепи фукоидана из *Ascophyllum nodosum*. К сожалению, информации, об аминокислотной последовательности этого фермента в настоящее время нет. Таким образом, аминокислотные последовательности, специфичности и механизм действия фукоидан эндо-сульфатаз остаются неизвестными. В рамках исследования функциональной активности ферментов фукоидан-деградирующего кластера *W. fucanilytica* CZ1127T нами обнаружена сульфатаза (SWF5), которая катализирует отщепление сульфатных групп от полимерных цепей фукоиданов. С использованием фукоиданов и фукоолигосахаридов различной структуры в тандеме со спектроскопией ЯМР установлена детальная специфичность SWF5. Фермент классифицирован нами как сульфатированный α -(1→3;1→4)-L-фукан эндо-40-сульфатаза. Сульфатаза SWF5 была использована для получения 40-десульфатированных производных фукоидана FeF из *Fucus evanesens*. Сравнительное изучение *in vitro* противораковой активности FeF и его 40-десульфатированного производного позволило оценить вклад 40-сульфатирования в проявляемый FeF противораковый эффект.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№20-74-00035).

ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗА С ДВОЙНОЙ КОФАКТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ ИЗ *PANTOEA ANANATIS*

В.С. Скрипникова, М.С. Харченко, М.Н. Бабаева, Ю.Г. Ростова, Н.П. Закагаева

АО «НИИ Аджиномото-Генетика», Москва

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ) катализирует обратимое восстановительное аминирование α -кетоглутарата до L-глутамата. В соответствии со специфичностью в отношении кофактора микробные ГДГ классифицируются как: 1) NADP-зависимые (EC 1.4.1.4), участвующие в синтезе глутамата у *E. coli*, *Salmonella*, *Bacillus* и др.; 2) NAD-зависимые (EC 1.4.1.2), катализирующие деградацию глутамата у *Clostridium*, *Rhodospirillum*; и 3) ГДГ с двойной кофакторной специфичностью (EC 1.4.1.3), более характерные для эукариот, а также обнаруженные у *Mycoplasma*. В работе была исследована ГДГ из штамма *Pantoea ananatis* (ГДГ-Pan), ближайшим гомологом которой является не охарактеризованная ГДГ из *Burkholderia thailandensis*. В экспериментах с грубыми клеточными экстрактами нами было показано, что ГДГ-Pan обладает двойной кофакторной специфичностью. Для очистки и изучения свойств фермента были получены штаммы *E. coli* со сверхэкспрессией гена, кодирующего ГДГ-Pan, маркированную N-концевым полигистидиновым «хвостом» (НТ-ГДГ-Pan). Измерение активности ГДГ в клеточных экстрактах полученного и родительского штаммов показало различие активностей, что предполагает влияние гистидинового тега на свойства ГДГ-Pan. Действительно, анализ 3D структур различных ГДГ указывает на участие N- и C-концов белка в формировании активных центров, участвующих в связывании субстрата и кофакторов. Поэтому, для наработки и очистки ГДГ-Pan был сконструирован штамм *E. coli*, способный к сверхпродукции ГДГ, содержащей N-концевой полигистидиновый «хвост» и сайт узнавания для TEV-протеазы, необходимый для его последующего удаления. Белок НТ-TEV-ГДГ-Pan был очищен методом металл-аффинной хроматографии, и методом электрофореза в ПААГ была показана высокая степень гомогенности белка и соответствие экспериментального значения молекулярной массы субъединицы рас-

четному значению. ГДГ активность очищенного белка в присутствии кофакторов NADPH и NADH составляла, соответственно, 8.62 ± 1.03 и 1.44 ± 0.17 $\mu\text{mol}/\text{mg min}$. Полученные данные указывают на функциональность выделенного белка и его двойную кофакторную специфичность. Получение нативной ГДГ-Rap и последующая биохимическая характеристика фермента являются основными задачами дальнейших исследований.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУБЪЕДИНИЦЫ ЭПСИЛОН БАКТЕРИАЛЬНОЙ АТФ-СИНТАЗЫ F-ТИПА

А.В. Литвин¹, Б.А. Фенюк^{1,2} ¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Роторная АТФ-синтаза F-типа (F-АТФаза) — один из ключевых ферментов метаболизма. АТФ-синтазы представляют собой мультисубъединичные комплексы и сопрягают трансмембранный перенос ионов водорода (или натрия) и реакцию синтеза/гидролиза АТФ. Для биоинформатического изучения разнообразия генов АТФ-синтазы и поиска корреляций между первичной структурой фермента и его функциональными особенностями в нашей лаборатории был выбран набор геномов прокариот из базы данных кластеров ортологических генов (COG, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog>). База данных COG построена на геномах 711 организмов, относительно равномерно покрывающих все филогенетическое разнообразие прокариот (83 архей и 628 бактерий). Субъединица ϵ бактериальной F-АТФ-синтазы представляет собой небольшой белок из двух доменов – N-концевой бета-бочки, играющей структурную роль, и подвижного α -спирального C-концевого домена, способного изменять конформацию в зависимости от условий. N-концевой домен необходим для сопряжения протонного транспорта, а C-концевой домен способен селективно ингибировать АТФазную активность фермента. У некоторых бактерий субъединица ϵ сама способна связывать АТФ; при этом стабилизируется конформация, не оказывающая ингибиторного действия на АТФазную активность. В данной работе был проведен биоинформатический анализ многообразия вариантов субъединицы ϵ бактериальных F-АТФ-синтаз и поиск корреляций между первичной структурой ее регуляторного домена и физиологическими особенностями бактерий.

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА АКТИВНОСТЬ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

К.С. Эльбекьян¹, Ф.А. Биджиева¹, Л.С. Унанян², А.Т. Макичян², Л.А. Аракелян² ¹Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь; ²Лаборатория структурной биоинформатики РАН, Армения

В данной работе используя методы хемоинформатики и компьютерного анализа, изучалось взаимодействие мелатонина с сукцинатдегидрогеназой. Трехмерная модель мелатонина была взята из базы данных DrugBank с идентификационным номером AN: DB01065. В качестве мишени сукцинатдегидрогеназы была использована трехмерная модель биомакромолекулы мономерной формы, взятой из базы данных RCSB с идентификационным номером PDB ID: 1NEK. Выбор данной мишени обусловлено высоким разрешением трехмерной структуры модели молекулы в 2.60 Å. Для докинга анализа были использованы программные пакеты AutoDock Vina и AutoDock Tools. Достоверность результатов докинга обеспечивалась 5-кратной повторяемостью 20 начальных конформаций для каждого соединения, с объемом виртуального бокса, не превышающий 27000 Å. Значение континуума исчислений при докинге было взято 500. Известно, что структура сукцинатдегидрогеназы включает четыре цепи. Ключевую роль в процессе метаболизма играет субъединица SDHA, где формируется высококонсервативный каталитический FAD домен, обеспечивающий перенос электронов на Fe-S белки. Полученные нами результаты докинга анализа свидетельствуют, что мелатонин связывается в каталитическом центре SDHA домена. Кластерный анализ полученных мест связывания мелатонина с SDHA свидетельствуют, что все конформеры образуют единый кластер, с отклонением ≤ 0.4 Å относительно друг друга. В результате докинга анализа получены пространственно-энергетические параметры комплексообразования. Рассчитанная свободная энергия Гиббса для комплекса мелатонин-сукцинатдегидрогеназа равна 7.5 ± 0.37 ккал/моль при среднеквадратическом отклонении ≤ 2 Å. На основе энергии рассчитана константа комплексообразования равная 2.9×10^{-5} . Нами была построена конформационная карта взаимодействия. В результате были получены аминокислотные остатки, вовлеченные в процесс комплексообразования. Установлено, что взаимодействие мелатонина с сукцинатдегидрогеназой может привести к блокированию каталитического домена SDHA субъединицы фермента. Пространственное расположение и обнаруженные типы связей при комплексообразовании мелатонина с FAD могут быть конкурентны относительно нативного лиганда, проявляя возможное ингибирующее действие.

Конкурс молодых ученых

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ И РЕФОЛДИНГ БЕЛКОВ ОПРЕДЕЛЯЮТСЯ ДВУМЯ ГРУППАМИ АТФ-ЗАВИСИМЫХ ШАПЕРОНОВ

Е.Ю. Гнучих, О.Е. Мелькина, Г.Б. Завильгельский

НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика, Курчатовский геномный центр, Москва

Для поддержания в клетках нативной конформации макромолекул расходуется значительное количество энергии (АТФ→АДФ), что позволяет бактериям выживать в условиях стрессов. Рефолдинг термоинактивированных белков-ферментов *in vivo* проходит в присутствии шаперонов. Термостабильность ферментов определяют непосредственно в бактериальной клетке *in vivo* или с использованием очищенных препаратов *in vitro*. При этом в клетке термоинактивация и рефолдинг происходят одновременно, что характерно для термодинамически неравновесных систем. Следовательно, необходимо отделять процесс истинной термоинактивации фермента от одновременно осуществляемого рефолдинга, проводимого АТФ-

зависимыми шаперонами. Для этой цели в данной работе используется протонофор карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразон (СССР), снижающий концентрацию АТФ в клетке. Рефолдинг термоинактивированной люциферазы *Photobacterium luminescens* в *Escherichia coli* зависит от присутствия шаперонного комплекса DnaKJE. Эффективность рефолдинга в *Bacillus subtilis* не зависит от DnaK. При добавлении разобщителя СССР к суспензии клеток *B. subtilis* 168 и *E. coli* MG1655 рефолдинг инактивированных люцифераз полностью исчезает. Добавление СССР к клеточной суспензии *B. subtilis* и *E. coli* ускоряет процесс термоинактивации люцифераз и равняется скорости термоинактивации очищенных ферментов *in vitro*. Термостабильность люциферазы *P. luminescens* (при 43,5°C) *in vivo* в *E. coli* MG1655 примерно в 12 раз выше термостабильности препарата люциферазы *in vitro*. Термостабильность люциферазы *P. luminescens in vivo* в *B. subtilis* 168 примерно в 24 раза выше термостабильности люциферазы *in vitro*. Следовательно, термостабильность фермента в грамположительных бактериях примерно в два раза выше таковой в грамотрицательных бактериях. Авторы предполагают наличие двух групп АТФ-зависимых шаперонов в бактериальных клетках. 1-я группа проводит рефолдинг термоинактивированных белков как при высокой, так и при оптимальной для проявления ферментативной активности температурах. 2-я группа не может проводить рефолдинг при более низкой температуре, но способна поддерживать равновесную стабилизацию белка при высокой.

ОСОБЕННОСТИ УЗНАВАНИЯ ПОВРЕЖДЕННЫХ НУКЛЕОТИДОВ ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ ENDOQ ИЗ *PYROCOCCUS FURIOSUS*

А.Т. Давлетгильдеева^{1,2}, М.К. Сапарбаев³, А.А. Ищенко³, О.С. Федорова^{1,2}, Н.А. Кузнецов^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Новосибирский государственный университет; ³Институт Густава Росси, CNRS UMR8200, Вильжуиф, Франция

Одними из ключевых участников системы эксцизионной репарации оснований (BER) ДНК являются апурино-вые/апиридинозные (AP) эндонуклеазы. Эти ферменты также принимают участие в инцизионной репарации нуклеотидов (NIR) ДНК, катализируя гидролиз ДНК с 5'-стороны от некоторых поврежденных нуклеотидов. Необходимо отметить, что известные в настоящее время AP-эндонуклеазы, как правило, принадлежат одному из двух структурных семейств (ExoIII и EndoIV, соответственно) и все живые организмы содержат ферменты данного класса. Среди архей на данный момент охарактеризовано несколько представителей из обоих структурных семейств AP-эндонуклеаз. Однако в ходе дальнейших исследований в *Pyrococcus furiosus* был обнаружен новый фермент, способный гидролизовать ДНК, содержащую как AP-сайты, так и дезаминированные азотистые основания гипоксантина и урацил. EndoQ не обладает структурным родством с известными AP-эндонуклеазами, принадлежащими семействам ExoIII и EndoIV, однако эти ферменты имеют значительное сходство субстратной специфичности. Кроме того, совокупность литературных данных позволяет предположить, что все эти ферменты имеют сходные каталитические механизмы. Таким образом, EndoQ может представлять собой новый класс мультифункциональных AP-эндонуклеаз, и его потенциальная роль в протекании BER и NIR в археях, содержащих этот фермент, представляет большой интерес для исследователей. Поэтому целью данного исследования являлось проведение анализа субстратной специфичности и исследование особенностей узнавания различных повреждений ДНК ферментом EndoQ из *P. furiosus*. В рамках представленной работы был проведен анализ каталитической активности фермента по отношению к таким субстратам, как AP-сайт, урацил, гипоксантин, альфа-аномер аденозина и другие. Было изучено влияние концентрации двухзарядных ионов металлов на активность фермента и влияние нуклеотида, расположенного в комплементарной цепи напротив повреждения. Предварительный кинетический анализ конформационных превращений фермент-субстратных комплексов позволил оценить особенности узнавания различных ДНК-субстратов и определить каталитическую активность EndoQ по отношению к повреждениям ДНК, удаляемым в процессах BER и NIR у архей.

Работа выполнялась при поддержке гранта РФФИ для аспирантов № 20-34-90008.

РАЦИОНАЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ АКТИВНОГО ЦЕНТРА РИБОКИНАЗЫ ИЗ *THERMUS SP. 2.9* ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КАСКАДНОГО СИНТЕЗА РИБОЗИДОВ И АРАБИНОЗИДОВ

Е.А. Заяц, М.А. Костромина, И.В. Фатеев, Ю.А. Абрамчик, Р.С. Есипов

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

Применение каскадов ферментов нуклеинового обмена является перспективным подходом к получению модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов, в том числе и важных лекарственных средств с противовирусным и антираковым действием. Зачастую данные соединения представляют собой производные веществ, не являющихся природными субстратами для ферментов, составляющих каскады нуклеозидного и нуклеотидного синтеза. В связи с этим, расширение субстратной специфичности ферментов является актуальной задачей. Данное исследование посвящено увеличению удельной активности термостабильной рибокиназы из *Thermus sp. 2.9* (TspRK) в отношении как природного субстрата рибозы, так и неприродного – арабинозы. Производными последнего субстрата – арабинозидами являются важные лекарственные средства, такие как флударабин, неларабин, цитарабин и видарабин. Мы осуществили выравнивание аминокислотных последовательностей между TspRK и рядом более активных рибокиназ, благодаря чему удалось выявить аминокислоты активного центра, которые консервативны у высокоактивных рибокиназ, но отличаются у TspRK. На основании этого, мы предложили три мутации: T245I, N272H и T279V. В результате, две из трех мутаций привели к увеличению удельной активности TspRK в отношении природного субстрата рибозы: T245I в 3.8 раза и N272H в 2.5 раз. Проведенное нами пространственное выравнивание кристаллических структур TspRK (PDB 6ZNX) и комплекса рибокиназы из *E. coli* с рибозой (PDB 1RKD) позволило обнаружить вероятности стерического конфликта между 2'-гидроксильной группой арабинозы и тремя гидрофобными аминокислотами TspRK. С целью разрешения данного стерического конфликта, мы осуществили три мутации: A92G, I94V и I104V. В результате, первые две мутации привели к увеличению активности TspRK в отношении арабинозы в 3.6 и 2.7 раз соответственно. В дальнейшем планируется использование полученных препаратов мутантных ферментов в каскадном синтезе рибозидов и арабинозидов.

РАЗРАБОТКА И ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММ-ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА В *PICHIA PASTORIS*

К.Э. Князева¹, С.Ю. Филькин¹, Н.В. Чертова¹, С.С. Зацепин¹, М.А. Эльдаров², А.В. Липкин¹, А.Н. Федоров¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха и ²Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Химозин является секреторной аспаргатовой эндопептидазой, специфичной к κ -казеину молока, широко применяемой в пищевой промышленности в сыроделии. В настоящее время значительная доля промышленного производства химозина – это рекомбинантные формы, продуцируемые в штамм-продуцентах *Aspergillus niger* и *Kluyveromyces lactis*. Создание штамм-продуцентов рекомбинантного химозина на основе экспрессионной платформы *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) является одной из важных прикладных задач является одной из важных прикладной биотехнологии, а изучение факторов, влияющих на уровень экспрессии белков является важной задачей фундаментальной биотехнологии. Были созданы плазмиды pPIC α -Chym1, pVR2-mfa-GAP-Chym1 для экспрессии рекомбинантного прохимозина под индуцибельным АОХ1-промотором и конститутивным промотором GAP. Также была получена плаزمида pPIC9-HAC1 для экспрессии фактора транскрипции HAC1 под конститутивным промотором GAP. Экспрессия транскрипционного фактора HAC1 позволяет уменьшить уровень неправильного фолдинга белков при оверэкспрессии в *Komagataella phaffii* за счет регуляции экспрессии шаперонов. Получены эффективные рекомбинантные штаммы метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii*, продуцирующие функционально-активный химозин из *Bos taurus*. Отработаны масштабируемые методы культивирования штаммов продуцентов, а также выделения, очистки и активации рекомбинантного прохимозина. При культивации в ферментере штамм-продуцентов на основе pVR2-mfa-GAP-Chym1 в течение 72 ч был достигнут уровень в 12,5 IMCU/мл. Коэкспрессия транскрипционного фактора HAC1 позволила увеличить активность культуральной жидкости на 40%. Для рекомбинантного химозина протестирован метод получения, активации и очистки до концентрации 4мг/мл (1000 IMCU/мл) с выходом 68%. В результате проведенной работы разработаны масштабируемые технологии получения и очистки рекомбинантного химозина для использования в пищевом производстве. *Результаты получены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по соглашению от 31.05.2018 г. № 14.607.21.0207 (УИН RFMEFI60718X0207), ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы».*

СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ pH-ЗАВИСИМУЮ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПАПАИН-ПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ

А.И. Петушкова^{1,2}, А.О. Залевский^{1,3}, Н.В. Гороховец¹, Л.В. Савватеева¹, А.В. Головин^{1,2,3}, Е.Ю. Зерний^{1,4}, А.А. Замятнин (мл.)^{1,2,4}

¹Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва; ²Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», Сочи; ³Факультет биоинженерии и биоинформатики и ⁴НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Папаин-подобные цистеиновые протеиназы (ППЦП) – протеиназы, которые были найдены во всех группах живых организмов, кроме грибов. Изначально ППЦП считались протеиназами исключительно эндосомально-лизосомального компартмента, где они деградируют неправильно свернутые, мутантные и более не нужные белки и пептиды. Однако, за последние 20 лет было открыто множество функций, которые ППЦП реализуют в цитозоле, ядре и внеклеточном пространстве. Наиболее изученным примером являются цистеиновые катепсины в микроокружении опухоли, где они деградируют межклеточный матрикс, увеличивая подвижность опухолевых клеток и способствуя ангиогенезу. Способность осуществлять различные функции в среде с кислым и нейтральным pH, может объясняться тонкой регуляцией специфичности ППЦП. Для того, чтобы изучить специфичность данной группы протеиназ, нами была выбрана ППЦП пшеницы – тритикаин- α . Ранее мы показали, что в P2 положении субстрата тритикаин- α специфичен к гидрофобному аминокислотному остатку, а в P1 – к положительно-заряженному, причем специфичность к P1 возрастает при увеличении pH. Для выявления причины такой специфичности нами была определена структура тритикаина- α методом рентгеноструктурного анализа, и мы провели молекулярный докинг пептида Ac-QLLR-NME в полученную структуру. Мы обнаружили отрицательно-заряженные аминокислотные остатки в сайте связывания S1, которые могут образовывать электростатические взаимодействия с P1 положением субстрата. Эти аминокислотные остатки вариативны среди ППЦП, несмотря на консервативность окружающих их аминокислот. Для проверки вклада этих аминокислот в специфичность тритикаина- α мы сделали мутанты протеиназ и измерили их активность при разных pH. Также, мы измерили активность цистеиновых катепсинов (L, V, S, H, K и O) человека. В результате проведенного исследования мы подтвердили, что аминокислотные остатки в S1 сайте связывания ППЦП влияют на pH-зависимую специфичность данной группы ферментов. Эти данные могут способствовать созданию более специфичных ингибиторов для ППЦП, которые, в частности, могут быть использованы в терапии рака.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ ИНГИБИТОРНОГО АНАЛИЗА

А.Ю. Соловьева¹, М.Г. Хренова¹, Т.В. Тихонова¹, В.О. Попов^{1,2}

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

Одним из подходов к изучению механизмов реакций в ферментативной кинетике является ингибиторный анализ. В качестве ингибиторов используют аналоги субстратов или продуктов ферментативной реакции, аналоги предполагаемого переходного состояния реакции или лиганды, специфически взаимодействующие с остатками активного центра или кофакторами. Комплексный подход, сочетающий ингибиторный анализ с определением пространственной структуры образующихся комплексов методом рентгеноструктурного анализа (РСА), позволяет дополнительно исследовать структуру активного цен-

тра фермента. Особенно важно это в том случае, когда не удается получить структуру комплексов фермента с субстратом или продуктом реакции. Подобная стратегия была использована нами для исследования механизма реакции медь-содержащего фермента – тиоцианатдегидрогеназы (TcDH), которая катализирует одностадийное разложение тиоцианата до цианата и элементной серы. Для верификации предложенного ранее механизма действия [1] был проведен ингибиторный анализ катализируемой TcDH реакции окисления тиоцианата. Наиболее эффективными конкурентными ингибиторами оказались продукт реакции – цианат ($IC_{50}=0,7$ мМ) и цианид ($IC_{50}=0,003$ мМ), образующий координационные связи с ионами меди активного центра. Однако получить структуру бинарных комплексов TcDH с этими ингибиторами не удалось, поскольку в процессе кристаллизации TcDH теряет ингибитор вместе с одним из ионов меди активного центра. Дополнительный скрининг полидентатных лигандов, способных связываться в активном центре TcDH и стабилизировать медь-содержащий каталитический кластер, позволил найти еще два эффективных ингибитора TcDH: амитрол (3-амино-1,2,4-триазол, IC_{50} 0,029 мМ) и тиомочевина (IC_{50} 1 мМ). Интересно, что мочевина – аналог тиомочевины с заменой S на O – не является ингибитором TcDH. Сравнительный анализ связывания этих двух молекул с ионами меди в воде и в активном центре TcDH с помощью гибридного метода квантовой и молекулярной механики (QM/MM) показал, что оба соединения одинаково связываются с молекулами воды. Однако в активном центре TcDH атом серы тиомочевины образует более прочные координационные связи с ионами меди активного центра, чем кислород.

[1] Tikhonova et al. (2020) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117:5280

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗ 1, 2 И 3 С ИНТЕРМЕДИАТАМИ НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЙ BER В НУКЛЕОСОМНОМ КОНТЕКСТЕ

А.А. Украинцев¹, Е.А. Белоусова¹, М.М. Кутузов¹, О.И. Лаврик^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Исследование процессов репарации ДНК активно развивается во всём мире. Эксцизионная репарация оснований (BER – base excision repair) направлена на исправление негромоздких повреждений, в результате BER повреждённое нуклеотидное звено замещается на неповреждённое в ходе ряда последовательных событий. Хотя основные белки-участники BER известны, обнаруживаются новые белки, выполняющие различные функции. На сегодняшний день установлено, что ДНК-зависимые белки семейства PARP участвуют в регуляции процесса BER. Эти белки катализируют реакцию PAR-илирования, и присоединение PAR является посттрансляционной модификацией, регулирующей многие аспекты биологии клетки человека. Исследование механизма BER ведётся с середины прошлого века и, на сегодняшний день, большинство результатов получены с использованием свободных ДНК-субстратов. В клетке ДНК компактизована в белок-нуклеиновый комплекс – хроматин, с минимальной структурной единицей – нуклеосомой. Работа посвящена изучению взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP – PARP1, PARP2 и PARP3, с интермединтами ДНК начальных стадий процесса BER в контексте нуклеосомы. Измерено сродство белков PARP1, 2, 3 к нуклеосомам, содержащим в своем составе нативную ДНК, ДНК с АП-сайтом или однонуклеотидной брешью (Gap). Оценена лиазная активность коровых гистонов при расщеплении АП-сайта. Исследована топология комплексов нуклеосома-PARP1, 2, 3 методом футпринтинга. Ключевые слова: PARP1, PARP2, PARP3, BER, нуклеосома. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00674.*

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ АКТИВАЦИЮ ПАПАИН-ПОДОБНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ

О.Е. Чепикова¹, Л.В. Савватеева², В.Д. Маслова^{1,3}, М.В. Серебрякова³, Н.В. Гороховец², В.А. Макаров²,
Е.В. Хайдуков^{2,4}, А.В. Головин^{1,3}, Е.Ю. Зерний³, А.А. Замятнин мл.^{1,2,3}

¹Научно-технологический университет «Сириус», Сочи; ²Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва; ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁴ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва

Папаин-подобные цистеиновые протеиназы (ППЦП) можно обнаружить в разнообразных живых организмах. К настоящему времени стало понятно, что эти протеиназы выполняют целый ряд важных функций. Обычно эти ферменты состоят из сигнального (лидерного) пептида, продомена и каталитического домена, содержащего каталитическую триаду из аминокислотных остатков цистеина, гистидина и аспарагина. ППЦП транслируются в виде неактивного зимогена, затем в результате автокаталитического расщепления, при котором их продомен отщепляется от каталитического, образуется зрелый активный фермент. Считается, что активация этих протеиназ представляет собой рН-зависимый многоступенчатый процесс. В настоящем исследовании изучались молекулярные механизмы, регулирующие автокаталитическую активацию ППЦП на примере протеиназы человека катепсина L. Проведенные структурный и биохимический анализы наряду с молекулярным моделированием показали возможность образования комплекса молекулами профермента. Стабилизация такого комплекса определяется электростатическими взаимодействиями. При понижении рН структурные перестройки приводят к многоступенчатому гидролизу, приводящему к отщеплению продомена от каталитического домена и образованию зрелого активного фермента. Полученные результаты расширяют общее понимание функционирования ППЦП в живых организмах, а также могут быть использованы при разработке продуктов на основе ППЦП для фармацевтики и биотехнологии.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 21-75-30020).

РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ» Лекарственные средства на основе белков и пептидов Устные доклады

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ: МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ БОРЬБЫ С АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Т.В. Овчинникова, С.В. Баландин, И.А. Болосов, П.А. Миронов, М.Ю. Мышкин, О.В. Резникова, В.Н. Сафронова,
С.В. Суханов, С.В. Сычев, З.О. Шенкарев, П.В. Пантелеев

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

Антимикробные пептиды (АМП) – эволюционно древние факторы системы врождённого иммунитета многоклеточных организмов, играющие ключевую роль в их защите от инфекции. АМП проявляют активность в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов и способны взаимно дополнять и усиливать друг друга. Для АМП характерна широкая вариативность механизмов действия, включающих не только нарушение барьерной функции мембраны бактериальных клеток, но и специфическое ингибирование процессов метаболизма за счет взаимодействия с молекулярными мишенями внутри клетки. Поиск и исследование свойств АМП, выполняющих функции защитных факторов живых организмов, позволяет лучше понять закономерности функционирования системы врождённого иммунитета, а также отобрать природные пептиды и сконструировать их искусственные аналоги в качестве кандидатных соединений для создания новых противоионфекционных лекарственных средств. В докладе приводятся результаты структурно-функциональных исследований ряда АМП беспозвоночных животных, в том числе новых пептидов морских полихет и их аналогов – асеницинов из *Arenicola marina*, капителлина из *Capitella teleta*, никомацинов из *Nicomache minor* и др. Проведен сравнительный анализ структурных характеристик и биологической активности ряда АМП млекопитающих, в том числе кателицидинов козы *Capra hircus* и кашалота *Physeter catodon*. Определена антимикробная активность исследуемых АМП в условиях *in vitro* и *in vivo*, в том числе в отношении антибиотикорезистентных микроорганизмов, включая клинически значимые бактерии – продуценты металло-β-лактамаз (МβЛ). Изучены основные механизмы действия АМП и проанализированы причины их селективности при взаимодействии с микробной мембраной. Исследована корреляция между олигомеризацией АМП в мембране и их антимикробной активностью. Проведена оценка влияния АМП на процессы формирования биоплёнок, а также их воздействия на сформированные биоплёнки. Проведен анализ индукции резистентности к исследуемым АМП. Показано, что благодаря своим структурно-функциональным характеристикам АМП могут стать прототипами новых антибиотиков широкого спектра действия, способных решить проблему антибиотикорезистентности.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ–БРИКС (№ 18-54-80026) и РФФ (№ 19-74-30014).

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ, СОЗДАННЫХ НА ОСНОВЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ЖИВОТНЫХ, ДЛЯ ТЕРАПИИ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

О.В. Шамова, А.С. Комлев, М.М. Хайдукова, М.С. Сухарева, Е.В. Владимирова, Е.А. Протасов, Т.А. Филатенкова,
М.С. Жаркова, И.Е. Елисеев, А.Н. Чернов, Д.С. Орлов

Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Институт экспериментальной медицины,
Санкт-Петербург

В последние годы резистентность патогенных микроорганизмов к применяемым в медицине антибиотикам стремительно растет, что приводит к повышению смертности пациентов, длительное время проходящих лечение в стационарах. В качестве принципиально новых антибиотиков в настоящее время рассматриваются аналоги природных антимикробных пептидов (АМП) системы врожденного иммунитета - вследствие затрудненного формирования резистентности микроорганизмов к этим соединениям и отсутствия негативного влияния на иммунную систему, свойственного некоторым конвенциональным антибиотикам. Целью исследования являлась разработка прототипов новых антибиотиков на основе синтетических аналогов природных АМП для терапии нозокомиальных инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями. Химически синтезированы аналоги природных АМП животных (пролин-богатые пептиды астациндин 2 и астациндин PcAst-1b/c, кателицидин buCATNL4D, аналоги бактенецина 3.4, бета-шпилечных пептидов асеницина 1 и протегрин 1), исследована их антимикробная активность в отношении мультиантибиотикорезистентных госпитальных штаммов бактерий. Показано, что большинство исследованных пептидов проявляет высокую антимикробную активность в отношении полирезистентных, карбапенем-устойчивых штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*, выделенных из смывов при проведении бронхоальвеолярного лаважа пациентов, госпитализированных для лечения COVID-19 (минимальные ингибирующие концентрации (МИК) находились в диапазоне 0,1–2 мкМ), а также клинических изолятов бактерий, полученных из инфицированных ран пациентов (*K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*), МИК 0,1–16 мкМ. Наиболее активными оказались бета-шпилечные АМП. Оптимальными свойствами обладали аналоги бактенецина, отличающиеся отсутствием цитотоксической активности в отношении клеток человека *in vitro*. Таким образом, получены новые данные, подтверждающие перспективность разработки новых эффективных антибиотиков на основе синтетических аналогов пептидов системы врожденного иммунитета для борьбы с тяжелыми госпитальными инфекциями, вызываемыми антибиотикоустойчивыми бактериями. В докладе будут приведены данные об известных АМП, проходящих клинические и предклинические испытания. Проект финансирован Минобрнауки РФ, Соглашение № 075-15-2020-902.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАМЫКАНИЯ S-S СВЯЗИ В СИНТЕЗЕ АНАЛОГОВ НЕЙРОГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНОВ

Д.В. Авдеев, М.В. Овчинников, У.С. Дудкина, А.А. Азьмуко, М.Е. Палькеева, А.С. Молокоедов, М.В. Сидорова
НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва

В данной работе проведена сравнительная оценка замыкания S-S связи в таких аналогах нейрогипофизарных гормонов как Десмопрессин, Атозибан и Терлипрессин. Десмопрессин («Пресайнекс») является агонистом второго типа вазопрессинового рецептора (V2) и применяется для лечения несахарного диабета и первичного ночного энуреза. Терлипрессин («Реместип») – агонист вазопрессинового рецептора – применяется для лечения кровотечений пищевода и варикоза. Атозибан («Трактоцил») – единственный клинически используемый антагонист окситоциновых рецепторов – является незаменимым лекарством для предотвращения преждевременных родов. Широкое использование данных пептидов в клинической практике обуславливает необходимость детального изучения их синтеза для дальнейшей разработки крупномасштабной промышленной методики. Известны различные методы промышленного получения Атозибана и, судя по литературным данным, предпочтение отдается синтезу в растворе. Промышленное же получение Терлипрессина и Десмопрессина проводится как с использованием твёрдofазного синтеза (ТФС), так и синтеза в растворе. Так как данные пептиды являются циклическими дисульфидами, основополагающей стадией в их синтезе является замыкание S-S мостика. В данной работе нами был проведён синтез этих пептидов полностью на полимерном носителе, включая стадию циклизации, что помогло нам обойти проблему высоких разбавлений, наблюдающихся при окислении в растворе, и сократить образование побочных продуктов, а также упростить процедуру выделения целевых соединений. Так как данные пептиды не содержат в своей структуре остатков триптофана в качестве окислителя мы выбрали J2, поскольку он хорошо растворим в органических растворителях, обеспечивая хорошую сольватацию пептилолимера, и при его использовании наблюдается прямая конверсия цистеин-защищённого пептида в циклический дисульфид. Неочищенные продукты ТФС, полученные по разработанной нами методике, содержали не менее 85–90% целевых циклических пептидов и минимальное количество побочных продуктов. Работа выполнена при финансовой поддержке ЗАО «Обнинская химико-фармацевтическая компания».

ВНЕКЛЕТочНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДОСТАВКИ БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА ВНУТРИ КЛЕТКИ-МИШЕНИ

Я.А. Ломакин, Л.А. Овчинникова

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

Направленная доставка белковых терапевтических препаратов в клетки и ткани-мишени является фундаментальной задачей современной медицины. Повышение специфичности этого процесса увеличит эффективность разрабатываемых лекарств. Одним из перспективных инструментов доставки терапевтических белковых агентов являются внеклеточные везикулы (ВВ), представляющие собой двухслойные липидные частицы. ВВ секретируются почти всеми типами клеток и обладают важными преимуществами: биосовместимостью, стабильностью и возможностью проникать через гематоэнцефалический барьер. Ранее было показано, что сверхэкспрессия белка G вируса везикулярного стоматита (VSV-G) способствует образованию ВВ клеткой-производителем. За счет VSV-G ВВ отпочковываются от клетки-производителя, этот же гликопротеин обеспечивает их связывание с мембраной клетки-мишени. В представленной работе помимо VSV-G для наиболее эффективной загрузки ВВ использованы самособирающиеся белковые наноконтейнеры, специфически нагруженные белковым препаратом. Нами оптимизирован белковый состав наноконтейнера для уменьшения токсичности ВВ и увеличения их емкости. Показана возможность таргетированной доставки содержимого ВВ к макрофагам и дендритным клеткам. В перспективе подобные таргетные препараты на основе ВВ можно использовать для нужд генотерапии, лечения пациентов с аутоиммунными, вирусными и онкологическими заболеваниями. Исследования были проведены в рамках проекта РНФ 17-74-30019 «Структурные и кинетические особенности презентации антигенов как ключ к пониманию механизмов индукции аутоиммунных патологий и лимфомогенеза».

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ АНТИТЕЛ ОКСИАМИНОВЫМИ РЕАГЕНТАМИ

В.А. Брылёв¹, В.А. Мисюрин², К.А. Сапожникова¹, С.Д. Орешков¹, Е.П. Ганжула¹, А.С. Михайлова¹,
Е.Г. Мелешкина¹, В.А. Коршун¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва

Получен ряд новых производных оксиаминов для модификации карбонил-содержащих биомолекул. На примере окисления антител по углеводной части показано взаимодействие оксиаминовых красителей с карбонильными группами антитела. Полученные конъюгаты охарактеризованы спектрофотометрически и рассчитано соотношение краситель–антитело, которое составляло от 6 до 10 молекул модифицирующего флуорофора на одну молекулу белка [1]. Вариация нагрузки на антитело может контролироваться условиями проведения реакции конъюгации. Также был получен разветвляющийся оксиаминовый реагент, позволяющий увеличивать полезную нагрузку на антитело. При получении конъюгатов антител с противоопухолевыми антибиотиками необходимо производить введение полезной нагрузки через отщепляемый линкер. Наиболее удобным в синтезе и изученным с точки зрения фармакологических свойств является катепсиновый линкер, отщепляемый под действием протеаз. На данный момент описаны его два производных, которые не позволяют селективно вводить полезную нагрузку в состав антитела. Нами был разработан упрощенный метод синтеза катепсинового линкера и ряда его новых производных, в том числе оксиаминовое. Работа поддержана грантом РНФ 20-15-00361.

[1] К.А. Sapozhnikova et al. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021, in press.

РОЛЬ ЛИПИДНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ И ЛИПОПЕПТИДОВ

О.С. Остроумова, А.А. Захарова, С.С. Ефимова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

По данным ВОЗ рост смертности от инфекционных заболеваний на фоне распространения устойчивых к антибиотикам патогенных микроорганизмов является одним из глобальных вызовов XXI века. В этой связи, особую значимость приобретает разработка инновационных антимикробных препаратов, характеризующихся более медленным развитием устойчивости у микроорганизмов по сравнению с «классическими» антибиотиками. Подобным преимуществом обладают антимикробные соединения, механизм действия которых связан с образованием пор в мембранах клеток возбудителей. Эффективность их клинического применения, также как возможность развития резистентности к подобным препаратам, зависят от решения целого ряда фундаментальных задач, к которым, в первую очередь, относится выяснение молекулярных механизмов их взаимодействия с мембранами. Целью работы было выяснение значимости изменения физических характеристик липидного бислоя, в частности, трансмембранного распределения электрического потенциала и латерального давления, в регуляции порообразующей способности антимикробных пептидов и липопептидов. В качестве основных объектов исследования выступили цекаропин А и полимиксин Б. Обнаружено, что граничный потенциал мембраны играет критическую роль в регуляции порообразующей активности тестируемых агентов. Увеличение плотности отрицательного заряда бислоя сопровождается ростом числа как цекаропиновых, так и полимиксиновых пор, что связано с усилением сорбции катионов пептидов и липопептидов на мембране. Снижение дипольной компоненты за счет введения в мембрану малых полярных молекул приводит к падению и росту тока, индуцированного цекаропином А и полимиксином Б соответственно. Эффект определяется модификацией диполь-дипольных и заряд-дипольных взаимодействий при погружении антибиотиков в мембрану. Встраивание в бислой модификаторов или липидов, склонных к образованию инвертированных гексагональных фаз, приводит к потенцированию и ингибированию каналаобразующей способности цекаропина А и полимиксина Б соответственно. Влияние микроокружения сводится к изменению энергии открытого состояния каналов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (№ 19-14-00110).

НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ГИПОФИЗА СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НЕЙРОТОКСИКАНТА И СВЕТОВОГО ДЕСИНХРОНОЗА

Е.Г. Батоцыренова^{1,2}, В.А. Кашуро^{2,3}

¹Научно-клинический центр токсикологии им. С.Н. Голикова ФМБА России; ²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, ³НИИ гигиены, профпатологии, гигиены и экологии человека ФМБА России, Санкт-Петербург

Активность мозга млекопитающих ритмична во времени в диапазоне от миллисекунд до 1 дня. Многочисленные центральные структуры показывают суточные колебания электрической активности, высвобождения нейромедиаторов и экспрессии генов. Основной циркадный пейсмейкер млекопитающих расположен в супрахиазматических ядрах гипоталамуса. Нарушение периодичности поступления светового сигнала в течение длительного времени приводит к развитию психических нарушений. Тяжелые отравления веществами депримирующего действия характеризуются выраженным угнетением функций ЦНС. В настоящее время большое внимание уделяется изучению препаратов, представляющих собой экстракты из разных тканей организма. Они состоят из комплексов пептидов различной молекулярной массы. Эти регуляторные пептиды выполняют важные модулирующие и интегративные задачи, особенно их эффект возрастает при воздействии на организм негативных факторов. Эксперимент был проведен на беспородных белых крысах-самцах, весом 200-220 г. Крысы из экспериментальной группы были отравлены полулетальной дозой тиопентала натрия. Выжившие животные были разделены на три группы: первая находилась при обычном освещении (12/12), вторая находилась в условиях постоянного освещения, третья – в условиях постоянной темноты. Через 1 месяц пребывания животных в условиях измененного светового режима определяли концентрации нейротрофических факторов в плазме крови иммуноферментным методом наборами фирмы Cloud-Slope Corp. (США). Через 1 месяц после острого отравления тиопенталом натрия в условиях изменения светового режима были выражены процессы нейродеструкции. Применение пептидного экстракта из гипофиза Северного оленя снизило концентрацию основного белка миелина на 32,5% в группе постоянное освещение, при постоянной темноте – на 26,6% по сравнению с контролем. В группе постоянная темнота концентрация нейротрофического фактора BDNF в плазме крови достоверно повысилась на 50,2% при использовании пептидного экстракта гипофиза по сравнению с интактной группой. Использование пептидов из гипофиза Северного оленя при длительном изменении светового режима после острого отравления тиопенталом натрия способствует активации процессов нейрогенерации, мембранопротекции нейронов в результате полученного повреждения и адаптации к условиям светового десинхроноза.

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА НА КИСЛОТНО-ОСНОВНОЕ СОСТОЯНИЕ ПРИ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ В УСЛОВИЯХ СВЕТОВОГО ДЕСИНХРОНОЗА

В.А. Кашуро^{1,2}, Е.Г. Батоцыренова¹, Т.Г. Невзорова³

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет; ²Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена; ³Национальный государственный университет физической культуры, спорта и здоровья им. П.Ф. Лесгафта, Санкт-Петербург

Показатели кислотно-основного равновесия – важнейшие интегральные показатели, оценивающие состояния гомеостаза. Одним из факторов, влияющих на гомеостаз организма, является нарушение режима освещения. Развитие данного вида десинхроноза приводит к нарушению когнитивных и операторских функций, снижению физической работоспособности. В последнее десятилетие активно прорабатываются хронобиологические проблемы, связанные с профессиональной деятельностью.

стью людей в условиях арктического дня или ночи и возможности их коррекции. Эксперимент выполнен на самцах крыс линии «Вистар» в условиях дозированной физической нагрузки (ежедневный бег на тредбане в течение 15 мин). После 21 дня тренировок в естественных световых условиях животные были разделены на группы, находившиеся при обычном освещении (12/12), постоянном освещении и при постоянной темноте. Крысы, находившиеся в условиях изменения светового режима, получали фармакологическую коррекцию дельта-сон индуцирующим пептидом подъязычно в дозе 150 мкг/кг (ДСИП) однократно в течение 7 суток, при этом тренировки на тредбане продолжались. Показатели КОС определяли в крови экспериментальных животных на анализаторе Rapidlab 1265 через 21 день тренировок и после изменения светового режима. В результате проведенного исследования выявлено, что рН крови экспериментальных животных, находившихся в условиях измененного светового режима, сдвигается в щелочную сторону ($pH=7,5\pm 0,01$), в отличие от рН крови контрольных животных. Парциальное давление CO_2 в крови животных, находившихся в условиях изменения светового режима, снижается на 10% по сравнению с показателями интактных животных, и в среднем на 13% по сравнению с показателями контрольных животных. Фармакологическая коррекция ДСИП приводила к достоверному сдвигу рН в кислую сторону, достоверному увеличению pCO_2 , достоверному увеличению актуального бикарбоната по сравнению с группой обычное освещение. Также наблюдались статистически значимые изменения показателей кислородтранспортной функции крови, регистрируемые сразу после бега. Парциальное давление кислорода достоверно снижалось на 9,7% по сравнению с группой обычное освещение. В результате проведенного исследования выявлен положительный эффект ДСИП на показатели кислотно-основного равновесия в группе постоянная темнота.

ПРЯМОЕ И ОТСТАВЛЕННОЕ ВО ВРЕМЕНИ ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ НЕЙРОРЕЦЕПТОРНЫХ СИСТЕМ КЛЕТОК МОЗГА (В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ПАТОЛОГИИ)

Т.В. Вьюнова, Л.А. Андреева, К.В. Шевченко, Н.Ф. Мясоедов

Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Предложен комплексный подход к исследованию молекулярных аспектов биологического действия нейропептидов. Метод охватывает следующие ключевые моменты: анализ и характеристику мест специфических взаимодействий пептидов на плазматических мембранах клеток-мишеней, влияние исследуемых пептидов как аллостерических модуляторов на функциональную активность ряда «классических» нейрорецепторов, а также анализ отставленных во времени эффектов влияния пептидов на нейрорецепторные системы клеток-мишеней (на изменения аффинности и плотности рецепторов) в норме и в условиях патологии. Были исследованы эффекты следующих пептидов: АКТГ(6-9)PGR, АКТГ(4-7)PGR, АКТГ(7-10)PGR, 5охо-Pro-Arg-Pro, PGPL. В качестве модели патологии использовали эмоциональное соматосенсорное угнетение – иммобилизацию подопытных животных в сочетании с резким непродолжительным акустическим воздействием. Параллельно было проведено исследование влияния указанных пептидов на эмоциональное состояние, когнитивные функции и болевую чувствительность животных в норме и на фоне стресса, а также проведен анализ глобальных изменений транскриптома гиппокампа крыс в ответ на стресс и/или введение нейропептидов. Показано, что само по себе, стрессогенное воздействие приводит к снижению числа доступных мест специфического связывания ГАМК (радиолиганда [3H]GABA) на соответствующих данному лиганду низкоаффинных сайтах (на 30% от контроля), при этом аффинность рецепторов не изменяется. Введение исследованных пептидов, в большинстве случаев, тоже приводит к снижению числа доступных сайтов связывания ГАМК. Эффекты введения пептидов на фоне стресса в значительной степени обусловлены структурой пептида – так, например, пептид АКТГ(4-7)PGR нивелирует указанный выше эффект в отношении связывания ГАМК, пептид АКТГ(6-9)PGR не влияет на действие стресса, а сочетанный эффект от действия стресса и введения пептида АКТГ(7-10)PGR носит новый характер, отличный от индивидуальных эффектов стресса либо пептида.

Работа проведена при поддержке гранта РФФИ-КОМФИ № 17-00-00104 и программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии”.

Стендовые доклады

КОНЬЮГАТЫ АГЛИКОНА ТЕЙКОПЛАНИНА С ПРОИЗВОДНЫМИ ПЕРИЛЕНА

Д.А. Верютин^{1,2,3}, В.А. Алферова^{1,2}, М.В. Шувалов^{1,3}, А.А. Чистов^{2,4}, Г.В. Проскурин², Т.Д. Никитин^{2,3}, В.А. Коршун^{1,2}

¹НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ³МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет; ⁴НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

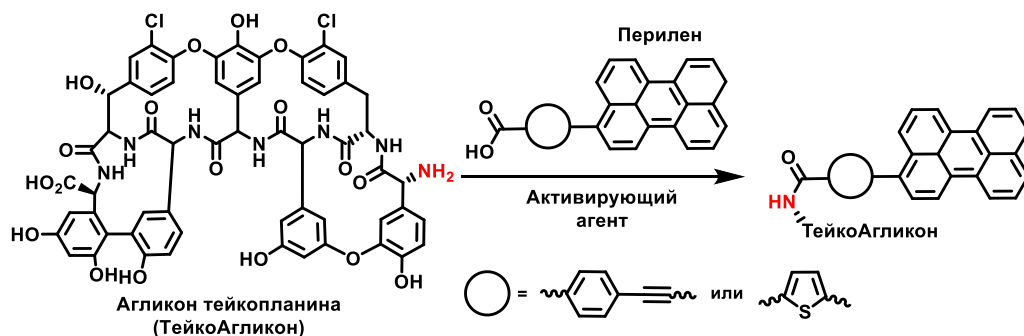
Эпидемия COVID-19 убедительно показала, что мы не имеем достаточного количества надежных методов для борьбы с вирусами, в частности, эффективных лекарств, поэтому очень важен поиск новых соединений с противовирусными свойствами.

В нашем коллективе было показано, что производные перилена с полярным фрагментом проявляют противовирусные свойства за счет ингибирования слияния вириона с клеткой.¹ Также было установлено, что полярный фрагмент можно варьировать без потери активности периленовых производных против вирусов.

Известно, что модифицированный гидрофобными функциями агликон антибиотика тейкопланина проявляет высокую активность в отношении некоторых вирусов, в частности, ВИЧ² и гриппа³. Как и производные перилена, агликон тейкопланина ингибирует слияние вируса с клеткой. Поэтому мы решили получить серию конъюгатов агликона тейкопланина с периле-

ном, чтобы выяснить, будет ли способен агликон выступить как полярный заместитель и увеличить активность и биодоступность малорастворимого в полярной среде периленового скаффолда.

Конъюгацию мы проводили при помощи ацилирования аминогруппы N-конца агликона периленсодержащими активированными эфирами с варьирующимися линкерами между периленом и карбоксильной группой.



Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ «Вирусы» № 20-04-60499.

- (1) Speerstra, S. et al. *Antivir. Res.* 2018, 149, 164–173.
- (2) Balzarini, J. et al. *J. Med. Chem.* 2003, 46 (13), 2755–2764.
- (3) Berezcki, I. et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, 94, 73–86.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ВЫДЕЛЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ ИЗ КОЖНОГО СЕКРЕТА БЕСЧЕШУЙЧАТОГО ВИДА РЫБ

Е.В. Грехнёва¹, Н.Л. Меркулова¹, С.В. Чуйкова², В.Н. Малышев²

¹Курский государственный университет; ²ООО «Акватехнологии», Курск

В последнее время значительно повысилась роль полипептидных препаратов в медицинской практике. Отечественные полипептидные препараты (тималин, кортексин, актовегин и др.) в течение многих лет успешно используются, в том числе в условиях стационарного лечения. Основными типами заболеваний, при которых используются и активно изучаются такие препараты, являются метаболические и онкологические. Описаны нейротрофический, антиконвульсантный, иммунорегуляторный и нейропротекторный эффекты указанных средств, их антистрессорное, антиоксидантное, метаболическое и регенеративное действие. Ранее уже была показана возможность использования альтернативных источников сырья, а именно эпидермальной слизи клариевого сома, для получения полипептидных препаратов, обладающих новыми свойствами [1]. В данной работе осуществлялась попытка оптимизировать процесс выделения фракции низкомолекулярных пептидов из кожного секрета клария угревидного (*Clarias gariepinus*). В качестве экстрагента использовали водный раствор уксусной кислоты для осаждения полисахаридов, содержащий в низкой концентрации соль двухвалентного металла для осаждения мажорных высокомолекулярных белков. В нашей работе использовались хлориды и ацетаты Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺. Процесс вели при +4 0С с диспергированием системы методом ультразвуковой кавитации, либо перемешиванием на магнитной мешалке. Одно- или двухстадийная очистка экстракта подходящим сорбентом позволила выделить чистую пептидную фракцию в виде порошка белого цвета без запаха. Сравнительный анализ образцов, выделенных с использованием экстрагентов различного состава, проводился методами качественного (ИК-спектр: амид А – ок. 3300, амид В – ок.3100, амид I –1652; амид II – 1551 см-1; ВЭЖХ МС/МС) и количественного (метод Фолина-Чокальтеу: A=0,85÷1,09 при λ=750nm) анализа. Показано, что использование в составе экстрагента хлористого кальция обеспечивает выделение наиболее «чистого», свободного от полисахаридов и мажорных белков пептидного пула, обладающего наиболее богатым и разнообразным набором аминокислотных последовательностей.

1. Меркулова Н.Л., Грехнева Е.В., Чуйкова С.В., Малышев В.Н. Хромато-масс-спектрометрическое исследование пептидов кожного секрета безчешуйчатого вида рыб // *Актуальные вопросы биологической физики и химии* Том 5, № 3 2020, С. 461-467

ПЕПТИДЫ, МОДЕЛИРУЮЩИЕ КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР ACE2, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮТ С РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИМ ДОМЕНОМ ВИРУСА SARS-CoV-2

У.С. Дудкина¹, Д.В. Авдеев¹, Р.Ш. Бибилашвили¹, М.Е. Палькеева¹, М.В. Овчинников¹, А.С. Молокоедов¹, М.В. Сидорова¹, Л.И. Козловская^{2,3}, А.М. Егоров^{2,4}, А.А. Ишмухаметов^{2,3}, Е.В. Парфенова¹

¹НМИЦ кардиологии; ²Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН; ³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;

⁴МГУ им. М.В. Ломоносова

Главной точкой проникновения вируса SARS-CoV-2 внутрь клетки человека является трансмембранный белок-рецептор – ангиотензин-превращающий фермент 2 типа (ACE2). Нарушение взаимодействия рецептор-связывающего домена (RBD) белка шипа (S) SARS-CoV-2 (и родственных ему вирусов) с ACE2 с помощью дизайнерских пептидных препаратов является одной из стратегий ингибирования проникновения вируса в клетки человека. На основании структуры комплекса RBD белка S SARS-CoV-2 с ACE2 осуществлен компьютерный дизайн химерных молекул, состоящих из двух 22-23-

членных пептидов, связанных друг с другом S-S связями. Пептиды-предшественники h1 и h2, использованные для конструирования химерных молекул, имитировали последовательности спиралей $\alpha 1$ и $\alpha 2$ ACE2 соответственно, включая большую часть аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с RBD. Полипептиды, включая описанный ранее контрольный spike-binding peptide 1 (SBP1) [1], были синтезированы твердофазным методом. Химерные молекулы X1 и X2, отличавшиеся локализацией дисульфидной связи, получены из h1 и h2 направленным замыканием S-S мостиков с использованием S-Pys производных. Все соединения очищены ВЭЖХ до 95-97% и охарактеризованы данными ВЭЖХ и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Оценка связывания пептидов с RBD SARS-CoV-2 проводилась с помощью микротермофореза с рекомбинантными доменами, соответствующими исходному китайскому изоляту и британскому мутантному варианту. Связывание с исходным RBD было выявлено у трёх синтезированных пептидов: линейного h2 и обоих химерных вариантов. Химерные пептиды также связывались с мутантным RBD с микромолярными константами.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №20-04-60110)

1. Zhang, G., Pomplun, S., Loftis, A.R., Tan, X., Loas, A., Pentelute, B.L. (2020) *bioRxiv*, p. 2020.2003.2019.999318. DOI: 10.1101/2020.03.19.999318.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭПИДЕРМАЛЬНОЙ СЛИЗИ *CLARIAS GARIEPINUS* КАК НОВОГО ИСТОЧНИКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ ОРИЕНТИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Н.Л. Меркулова¹, Е.В. Грехнева¹, С.В. Чуйкова²

¹Курский государственный университет; ²ООО «Акватехнологии», Курск

Эпидермальная слизь рыб считается важным иммунологическим фактором. Кожные секреты содержат в том числе и широкий спектр полипептидов с антимикробными свойствами. Установлено, что антимикробные пептиды (АМП) секретируются кожей рыб и защищают рыбу от широкого спектра бактериальных, грибковых, вирусных и других патогенных инфекций. АМП слизи эпидермиса рыб показывают широкий спектр активности и на порядок эффективнее их аналогов, выделенных из земноводных, по отношению к различным патогенам рыб и человека. В настоящее время предпринимаются многочисленные попытки определить биоактивные компоненты слизи кожи рыб для получения новых противомикробных агентов, которые могут быть источником потенциальных природных антибиотиков для фармацевтического применения. Объектом данного исследования являлся кожный секрет клария угревидного (*Clarias gariepinus*). Полученный пептидно-белковый экстракт слизи клария угревидного показал умеренную антимикробную активность по отношению к *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Pr. vulgaris*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Candida*. Состав пептидно-белкового экстракта оценивали методом хромато-масс-спектрометрии. Было установлено, что экстракт содержит несколько тысяч пептидов различной гидрофобности в широком массовом диапазоне от 0.3 до 10 кДа. Исследованы возможности хроматографического разделения экстракта. Предварительная идентификация компонентов экстракта на базе МС/МС спектров выполнена с помощью программного обеспечения Proteome Discoverer 1.4. (Thermo Scientific) с использованием базы данных аминокислотных последовательностей UniProt. Показано, что пептиды экстракта относятся к различным классам белков протеома *Clarias gariepinus*: бета-актины, семейство цитохрома, белки теплового шока, миостатин, НАДН-дегидрогеназный комплекс и др. Представляется перспективным ограничить поиски компонентов с антибактериальной активностью среди пептидов с небольшой молекулярной массой, выделение которых решено проводить методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.

РАЗРАБОТКА ОПТИМИЗИРОВАННОЙ СХЕМЫ СИНТЕЗА АТОЗИБАНА В РАСТВОРЕ

В.Н. Осипов, А.Н. Балаев, А.В. Громыко, К.А. Охманович

АО «Фарм-Синтез», Москва

Атозибан – синтетический нонапептид являющийся на уровне рецепторов конкурентным антагонистом природного пептида окситоцина. В настоящее время является одним из наиболее эффективных токолитиков для предупреждения спонтанных преждевременных родов. Связываясь с рецепторами окситоцина, атозибан снижает частоту маточных сокращений и тонус миометрия, приводя к подавлению сокращаемости матки. Преимущество его применения заключается в отсутствии побочного влияния на сердечно-сосудистую систему. Субстанция атозибана не производится в Российской Федерации, поэтому использование этого препарата целиком зависит от его поставок иностранными производителями. Целью работы являлась разработка эффективного, легко масштабируемого и относительно дешевого способа производства атозибана. В результате проведенных исследований, поставленную задачу удалось решить с использованием классических методов пептидного синтеза в растворе и с применением на последней стадии одновременного снятия защитных Асп-групп и окислительной циклизации йодом в водно-метанольном растворе. Разработанная оптимальная схема синтеза включает 17 стадий и основана на применении относительно недорогих реактивов. В качестве исходных соединений частично используются полупродукты действующего производства на АО «Фарм-синтез» пептидных препаратов октреотида и бусерелина, что дополнительно снижает себестоимость процесса. Отработанная схема позволяет легко масштабировать процесс получения субстанции и обеспечивает нужную чистоту конечной субстанции (с использованием окончательной очистки при помощи препаративной ВЭЖХ).

БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ТЕРАПИИ HER2-АССОЦИИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕЙ

А.А. Панина¹, В.С.Рыбченко^{1,2}, В.А. Топорова¹, Д.С. Балабашин¹, В.В. Аргентова², Т.К.Алиев², О.Н. Солопова³, П.Г. Свешников³, М.П. Кирпичников^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова;

³Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

Создание и исследование новых средств, способных избирательно и эффективно уничтожать опухолевые клетки, сверхэкспрессирующие рецептор эпидермального фактора роста HER2, представляет актуальную задачу. За последнее время возрос интерес к использованию интерферонов типа I в терапии онкологических заболеваний. Цитокиновая терапия направлена на активацию клеток иммунной системы для борьбы с опухолями. Однако применение цитокинов в терапии сдерживается побочными эффектами, тяжесть которых варьирует в зависимости от дозы и типа используемого цитокина. Поэтому изучается возможность уменьшения системного действия интерферонов, применяемых в терапии опухолей. Цель нашей работы состояла в создании на основе полученного ранее рекомбинантного нейтрализующего антитела к ИФН β и антитела трастузумаб, специфичного к HER2, биспецифических антител, а также в изучении их биохимических и иммунохимических свойств. Нами разработаны как полноразмерные антитела в формате CrossMab с мутациями knob и hole в СН3-домене Н-цепей, так и антитела в формате Fab-scFv. Эти антитела могут быть использованы для создания иммуноцитоклинового комплекса биспецифического антитела к HER2 и рекомбинантного ИФН β . Применение такого комплекса позволит избежать системного действия цитокина при терапии онкозаболеваний. Иммунохимическими методами показано, что эти белки связывают ИФН β , а также связывают HER2 в лизатах опухолевых клеток и в виде рекомбинантного внеклеточного домена. Биспецифический характер связывания полученных антител подтверждали с помощью сэндвич-ИФА. Биологическую активность образцов антител оценивали в опытах по нейтрализации антипролиферативного действия ИФН β . Таким образом, показано, что полученные биспецифические антитела могут использоваться в качестве компонента иммуноцитоклинового комплекса для доставки ИФН β к клеткам HER2-ассоциированных опухолей, что позволит избежать побочных эффектов, вызванных введением ИФН β в виде монопрепарата. Работа выполнялась при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Согл. № 14.604.21.0189, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0189). Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

СОЗДАНИЕ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА ЛАНТИБИОТИКОВ В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *PICHIA PASTORIS*

С.О. Пипия¹, Ю.А. Мокрушина^{1,2}, С.С. Терехов^{1,2}, И.В. Смирнов^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Ежегодно растет уровень новых случаев инфекций с множественной лекарственной устойчивостью. Таким образом, открытие новых антибиотиков становится первоочередной задачей биомедицины. Лантибиотики представляют собой рибосомально синтезированные и посттрансляционно модифицированные пептиды, которые несут неканонические тноэфирные аминокислоты лантионин и метиллантионин. Лантибиотики опосредуют свою антибактериальную активность, блокируя синтез клеточной стенки или формируя поры в бактериальной мембране. Однако их клиническое применение ограничено из-за низкой стабильности и растворимости, недостаточного уровня продукции и узких спектров активности. Тем не менее, генетически закодированная архитектура лантибиотиков позволяет создавать разнообразие пептидов, которые можно модифицировать с помощью механизма биосинтеза лантибиотиков, для получения более совершенного противомикробного препарата. Данная работа посвящена разработке гетерологической системы экспрессии лантибиотиков. Биосинтетический кластер, состоящий из последовательности пре-пептида лантибиотика, метилтрансферазы и лантибиотической синтазы (LanKC), был перенесен в метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*. Для оценки субстратной специфичности фермента LanKC коровая последовательность лантипептида была заменена на панель природных лантибиотиков, имеющих различные структуры. По наличию антимикробной активности в очищенных препаратах рекомбинантных лантибиотиков были сделаны выводы о внесении модификаций в их аминокислотные последовательности и толерантности фермента LanKC относительно коровой части модифицируемого пептида. Рекомбинантные лантибиотики проявляли выраженную антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий, в том числе патогенного штамма *S. aureus* MRSA. Разработанная дрожжевая система получения лантибиотиков в сочетании с технологиями редактирования генов и высокопроизводительными методами скрининга является перспективным инструментом для поиска противомикробных агентов нового поколения. Работа поддержана грантом РФФИ 18-29-08054.

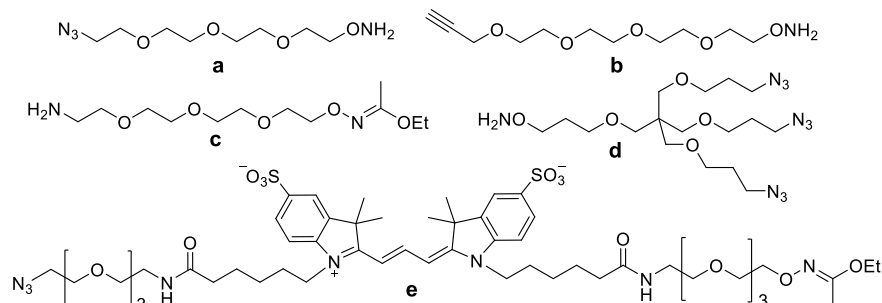
БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЛИНКЕРЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИЛАМИНА ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ

К.А. Сапожникова^a, Е.Г. Мелешкина^{ab}, В.А. Брылёв^a, В.А. Коршун^a

^aИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ^bРоссийский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

O-Замещенные гидроксилламины находят применение для синтеза биоконъюгатов благодаря быстро и количественно протекающей реакции с карбонильной группой альдегидов и кетонов в водной среде и при физиологических значениях pH с образованием достаточно устойчивых оксимов [1]. Реакция конденсации полностью удовлетворяет критериям т.н. «клик-химии» и является удобным методом модификации биомолекул и биологически активных соединений. Среди N-защитных групп для синтеза O-замещенных гидроксилламинов представляет интерес этоксиэтилиденная группа, устойчивая в щелочной и нейтральной среде, но легко удаляемая при подкислении [2]. С использованием этой защитной группы нами получены бифункциональные реагенты на основе тетраэтиленгликоля (а-с), содержащие свободный или защищенный оксиамин. Из

тетра-*O*-(3-гидроксипропил)пентаэритрита [3] получен полифункциональный реагент (d). Разработан синтез бифункциональных линкерных молекул, содержащих в своем составе флуоресцентный цианиновый краситель, например (e).



Подобные реагенты представляют интерес в первую очередь для получения конъюгатов лекарство-антитело (antibody–drug conjugates, ADC) [4] с контролируемой стехиометрией и несущих более одной молекулы фармакофора. Разветвленные линкеры перспективны для увеличения нагрузки терапевтических молекул на полноразмерный иммуноглобулин в ADC [5]. Присоединение оксиаминов осуществляется по окисленным периодатом углеводным остаткам иммуноглобулинов, что позволяет сохранить аффинность к антигену и улучшить гомогенность конъюгатов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (проект 20-15-00361); К.А.С. благодарит за поддержку РФФИ (проект 20-34-90125 «Аспиранты»); синтез исходных соединений на основе пентаэритрита).

1. D.K. Kölmel and E.T. Kool *Chem. Rev.* 2017 117 10358–10376.
2. M.A. Khomutov et al. *Amino Acids* 2010 38 509–517.
3. A.I. Ponomarenko et al. *Tetrahedron* 2016 72 2386–2391.
4. K.C. Nicolaou and S. Rigol *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019 58 11206–11241.
5. Y. Anami et al. *Org. Biomol. Chem.* 2017 15 5635–5642.

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ МУЛЬТИСЛОЙНЫЕ КАПСУЛЫ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Л.А. Курбанова¹, Д.Б. Трушина², А.В. Яголович¹, М.Э. Гаспарян¹, А.М. Гилева¹, Е.А. Марквичева¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва

Полиэлектролитные мультислойные капсулы (ПМК) на основе сульфата декстрана (DS) и поли-L-аргинина (PArg) представляют большой интерес в качестве носителей лекарств в терапии опухоли. Мутантный вариант TRAIL DR5-B противоопухолевого цитокина TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), селективно взаимодействует с рецептором смерти опухолевых клеток DR5 и запускает в них апоптоз, что делает его перспективным лигандом для активной адресной доставки противоопухолевых лекарств. Целью работы было получение адсорбционно-связанного комплекса ПМК/TRAIL DR5-B и исследование его цитотоксичности в 2D (монослойная культура клеток) и 3D (опухолевые сфериды) моделях *in vitro*. ПМК были получены методом послойной адсорбции полиэлектролитов (layer-by-layer LBL) с образованием трех бислоев комплекса (PArg/DS)₃. Цитотоксичность ПМК/ TRAIL DR5-B была изучена на линии HCT116 (TRAIL-чувствительная колоректальная карцинома человека), клетках MCF-7 (TRAIL-устойчивая аденокарцинома молочной железы человека) и нормальных фибробластах человека Vj5-та с помощью МТТ-теста. Для всех трех клеточных линий ПМК, не модифицированные TRAIL DR5-B, были нетоксичны (IC₅₀>1000 нг/мл). Обнаружено, что для клеток Vj5-та свободный TRAIL DR5-B и ПМК, модифицированные им, не были токсичны как в 2D, так и в 3D модели *in vitro*. Выявленные противоопухолевые эффекты ПМК/TRAIL DR5-B и свободного TRAIL DR5-B были показаны на клетках MCF-7 и HCT116. Отмечена четкая динамика понижения значений IC₅₀ с увеличением времени инкубации этих клеток с ПМК/TRAIL DR5-B. Так, в случае 2D модели для клеток HCT116 значения IC₅₀ были 1600, 1070 и 607 нг/мл через 24, 48 и 72 ч, соответственно. В 3D модели соответствующие значения IC₅₀ составляли 1113, 170 и 160 нг/мл. Таким образом, продемонстрировано, что капсулы, модифицированные TRAIL DR5-B, можно загрузить противораковым лекарством и предложить в качестве перспективной системы для его таргетной доставки в опухолевые клетки.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В ТКАНЯХ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

Г. Бабаева^{1,2}, Е.В. Лукашева¹, А.Н. Лукашев³, В.С. Покровский^{1,2}, С.Ш. Каршиева²

¹Российский университет дружбы народов; ²НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ; ³Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Москва

L-лизин- α -оксидаза (КФ 1.4.3.14, ЛО) проявляет противовирусные, антибактериальные и противоопухолевые свойства, что было показано как на моделях опухолей мышей, так и на ксенотрансплантатах человеческих опухолевых моделей. Механизм этих эффектов связан с истощением содержания L-лизина в организме и накоплением продуктов лизиноксидазной реакции, одним из которых является H_2O_2 . Определение фармакокинетических (ФК) параметров в крови при внутривенном (в/в) введении важно не только как обязательный фрагмент доклинического исследования, но и для разработки эффективной схемы введения. Целью работы было определение ФК параметров ЛО при однократном внутривенном введении мышам в различных дозах.

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда, а ферментативную активность ЛО – спектрофотометрически с помощью пероксидазы и о-дианизидина. Использованы мыши самцы Balb/c. В хвостовую вену вводили раствор ЛО (90 Е/мл), а затем определяли в образцах плазмы ферментативную активность и содержание ЛО иммуноферментным анализом (ИФА). Содержание ЛО в тканях определяли только ИФА.

Изменение концентрации ЛО в плазме крови после в/в введения, определенное ИФА, практически совпало со снижением ферментативной активности, поэтому можно сделать вывод, что метод ИФА позволяет определить не только наличие ЛО как белка, но функционально активный фермент. После в/в введения в равных дозах 1,0–3,0 мг/кг снижение концентрации фермента носит ярко выраженный двухфазный характер, а ФК профиль – нелинейный. ЛО обнаруживали в крови до 24 ч даже при введении минимальной дозы 1,0 мг/кг. ФК параметры ЛО: Cl – 0,05–0,1 мл/мин; K_{el} – 0,0074–0,0103 мин⁻¹, $t_{1/2}$ – 1,05–1,55 ч. ЛО быстро появлялась в тканях: печени, сердце, почках, селезенке и головном мозге в порядке убывания распределенных количеств и сохранялась в течение 48 ч. В печени ЛО продолжала накапливаться дольше – до 9 ч и имела значительное распределение в печени – $AUC_{(0-t)}$ 41,14 мкг/мл \times час.

Полученные результаты открывают перспективу дальнейших исследований ЛО в качестве противоракового агента. Установленные ФК параметры ЛО находятся в том же диапазоне что и аналогичные показатели других противоопухолевых ферментов L-аспарагиназы из *E. Coli* и метионин-гамма-лиазы из *P. putida* и *C. tetani*.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА СИНЕРГИИ ИНГИБИТОРА СПЛАЙСИНГА И ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ПРЕПАРАТА НА МОДЕЛИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

В.С. Бойченко^{1,2}, П.В. Шнайдер^{1,3}, К.С. Ануфриева³, Г.П. Арапиди^{3,4}, В.О. Шендер^{3,4}

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ⁴Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

Одной из причин неэффективного лечения ряда онкологических заболеваний является формирование резистентности опухоли к применяемым препаратам. Рак яичников является шестым по распространенности онкологическим заболеванием у женщин, а бессимптомное течение на ранних этапах делают его одним из самых опасных. В связи с этим разработка новых подходов к лечению аденокарциномы яичника является актуальной задачей. Ранее нами было показано, что предварительная обработка низкими дозами ингибитора сплайсинга пладиснолид Б (PI-B, 1.5 нМ) повышала чувствительность опухолевых клеток к цисплатину [1]. Данная работа посвящена изучению механизма синергии этих соединений. Анализ протеомных профилей клеток SKOV3, обработанных комбинацией препаратов или монопрепаратами показал, что в ответ на цисплатин повышается представленность белков репарации ДНК и регуляции клеточного цикла, когда как предварительное добавление PI-B оказывает противоположный эффект. Это может быть обусловлено наличием у сплайсинговых факторов неканонических функций, таких как поддержание стабильности генома и участие в репарации ДНК. Для проверки гипотезы было проведено иммунофлуоресцентное исследование на маркеры ДНК-повреждений (gH2AX) и репликативного стресса (S33-RPA). Клетки SKOV3 при предварительной инкубации с PI-B и последующей обработке цисплатином имели меньшее количество фокусов gH2AX и демонстрировали более слабый сигнал фосфорилирования RPA по сравнению с клетками, обработанными только цисплатином. Гетерогенность окрашивания вероятно связана с фазами клеточного цикла, а различия в интенсивности окрашивания могут быть обусловлены нарушением мечения разрывов ДНК или репликативным стрессом. Действительно, предварительная обработка PI-B препятствует аресту клеток SKOV3 в S-фазе, который должен вызвать цисплатин. Таким образом, обнаруженный синергетический эффект мог бы позволить снизить терапевтические дозы препаратов.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-75-10123

1. Anufrieva KS et al. Therapy-Induced Stress Response Is Associated with Downregulation of Pre-mRNA Splicing in Cancer Cells. // *Genome Medicine*. 2018. No10. P.49.

НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КАТЕПСИНОВОГО ЛИНКЕРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЪЮГАТОВ АНТИТЕЛ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

В.А. Брылёв¹, А.С. Михайлова^{1,2}, С.Д. Орешков^{1,3}, Е.П. Ганжула^{1,4}, К.А. Сапожникова¹, В.А. Мисюрин⁵, В.А. Коршун¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²НИУ «Высшая школа экономики»;

³МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет; ⁴Российский университет дружбы народов; ⁵НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва

На данный момент существует ряд методов лечения онкологических заболеваний. К ним относятся хирургические, химио- и иммунотерапевтические методы, а также лучевая терапия. Разработка и внедрение в терапевтическую практику конъюгатов противоопухолевых агентов с антителами представляет собой комбинацию химиотерапии и иммунотерапии. Данный способ лечения основан на адресной доставке высокотоксичных противоопухолевых соединений с помощью специально подобранных антител. Такие конъюгаты обладают высокой специфичностью к определенным антигенам, присутствующим на поверхности мембраны только раковых клеток. Задача ковалентного связывания полезной нагрузки (лекарственного препарата) с молекулой антитела является крайне важной. Способ связывания, выбор сайта связывания, особенности структуры линкера во многом определяют успешность создания эффективного конъюгата антитела с противораковой молекулой. Фармакологические свойства, стабильность, эффективность высвобождения могут регулироваться вариацией линкерного фрагмента, поэтому разработка и синтез новых производных уже известных линкеров крайне актуальна при создании конъюгатов антител с противораковыми соединениями. Нами были синтезированы реакционноспособные производные катепсинового линкера, который занимает лидирующую позицию и наиболее распространен среди одобренных к применению препаратов на основе конъюгатов антител. Полученные производные представляют собой азиды, алкины, а также защищенные оксиамины. Линкерная часть содержит как умеренно липофильные короткие спейсеры, так и длинные гидрофильные спейсеры на основе тетраэтиленгликоля. Азидо- и алкиновые производные катепсинового линкера позволяют проводить конъюгацию с антителами с помощью медь-катализируемой реакции азид-алкинового циклоприсоединения, либо в безмедном варианте азид-алкинового циклоприсоединения. Оксиаминовые производные катепсинового линкера позволяют вводить полезную нагрузку в состав антитела по предварительно окисленному сайту гликозилирования. Данный метод обладает преимуществом, так как место модификации антитела значительно удалено от антиген-связывающей области.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект 20-15-00361).

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ОПУХОЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ЭПИТОПА НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b НА ПОВЕРХНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКА

Л.Ф. Булатова¹, А.А. Тимонина¹, А.Б. Анапина¹, Д.Д. Решетникова¹, Д.В. Савенкова¹, А.К. Нургалиева¹, В.С. Скрипова¹, М.В. Богданов², Р.Г. Киямова¹

¹Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии, НИЛ «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²Кафедра биохимии и молекулярной биологии, Научно-медицинский центр Техасского университета в Хьюстоне, Медицинская школа МакГоверна, Хьюстон, США

Мембранные белки являются уникальными мишенями для противоопухолевой терапии моноклональными антителами. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b участвует в поддержании фосфатного гомеостаза в организме человека и экспрессируется на поверхности опухолевых клеток в 90% случаев карциномы яичника. В настоящее время ряд моноклональных антител, направленных против эпитопа NaPi2b, расположенного в районе большого внеклеточного домена транспортера успешно проходят клинические испытания для лечения рака яичника. NaPi2b является интегральным мембранным белком с 8 трансмембранными доменами, большим экстремембранным (внеклеточным) доменом 4 (ЭМД4), N – и C – концевыми доменами, расположенными в цитоплазме. Опухоль-специфический эпитоп располагается в уникальной области ЭМД4 NaPi2b, а его доступность, как мы предполагаем, обусловлена дисульфидными связями между цистеинами в положениях 303, 322, 328 и 350, а также гликозилированием остатков аспарагина предположительно в положениях 295, 308, 313, 321, 335 и 340. Для изучения распознавания эпитопа в районе ЭМД4 NaPi2b моноклональными антителами L2 (20/3) мы заменили каждый из 4 цистеинов и 6 аспарагинов на аланин с помощью сайт-направленного мутагенеза. Распознавание эпитопа мутантных форм NaPi2b мы изучали с помощью вестерн-блота, цитометрии и конфокальной микроскопии. Было выявлено, что каждый из 4 цистеинов в области ЭМД4 NaPi2b критически важен для распознавания эпитопа, а мутация аспарагина в положении 308 существенно увеличивает доступность эпитопа для моноклональных антител L2(20/3). При этом, полное дегликозилирование с помощью обработки лизатов опухолевых клеток, экспрессирующих NaPi2b, гликозидазами приводит к полному отсутствию распознавания эпитопа в Вестерн-блот анализе. Этот факт может свидетельствовать о важности гликозилирования в поддержании конформации экстремембранного домена NaPi2b. Полученные данные приближают нас к пониманию механизмов образования опухолю-специфических эпитопов мембранных белков и открывают широкие перспективы для разработки новых, более специфичных противоопухолевых препаратов.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета, а также при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-14-00166.

АНТИМИКРОБНЫЙ ПЕПТИД АЛАМЕТИЦИН: МЕХАНИЗМ ПОРООБРАЗОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

М.Х. Дуржинская¹, Д.А. Аливердиева², Д.В. Мамаев³

¹НИИ глазных болезней, Москва; ²Прикаспийский институт биологических ресурсов ДФИЦ РАН, Махачкала; ³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Антибиотики-пороформеры – группа антибактериальных, противогрибковых и противовирусных препаратов, обладающих уникальной особенностью: по сравнению с традиционными антибиотиками к ним практически не вырабатывается резистентность.

стентность патогенных штаммов микроорганизмов. Согласно данным FDA, в практической медицине применяют 10 антибиотиков-пороформеров, отличающихся различной молекулярной структурой, но объединенных общим физико-химическим эффектом. Способность пептидов вызывать пермеабиллизацию микробных клеточных мембран делает их идеальными кандидатами для комбинированной терапии с традиционными антибиотиками. Показано, что антимикробные пептиды класса пептаиболов, в том числе аламетицин, индуцируют апоптоз и аутофагию клеток гепатокарциномы человека и могут служить в качестве потенциальных супрессоров опухолевых клеток. Однако некоторая неспецифическая цитотоксичность этих пептидов ограничивает возможности их клинического применения. Для минимизации нежелательных побочных эффектов необходимо понимание молекулярного механизма действия пороформеров. Отдельный интерес представляет изучение их действия на митохондрии – важнейшие энергопроизводящие органеллы клетки. Исследованиями последних лет показана ведущая роль митохондрий в чувствительности к лекарствам, их ключевую роль в старении организма, процессах апоптоза, развитии нейродегенеративных и онкологических заболеваний, диабета, болезней сердечно-сосудистой системы, легких, кожи и многих других. В опытах на выделенных митохондриях печени крысы нами впервые получены данные, характеризующие первые этапы порообразования аламетицина в митохондриях печени крысы, генерирующих $\Delta\psi$. Показано, что стационарную калиевую проводимость, индуцированную во внутренней мембране митохондрий низкоолигомерной формой аламетицина, можно измерить на фоне проводимости его высокоолигомерных форм. Именно в опытах на митохондриях в присутствии $\Delta\psi$ при низких пептид/липидных соотношениях нам удалось визуализировать первые этапы порообразования аламетицина и оценить диаметр поры. Порядок реакции, лимитирующей низкоолигомерную проводимость, близкий к двум свидетельствовал, что пора, образованная аламетицином, в условиях наших опытов, вероятнее всего, содержала димеризованный пептид и липид, то есть являлась «тороидальной».

ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ БЛОКИРОВАНИЯ РЕЦЕПТОРА HER3 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И.Е. Елисеев^{1,2}, А.Д. Микушина¹, А.А. Вронская¹, О.В. Шамова²

¹Алфёровский университет; ²НЦМУ «Центр персонализированной медицины», Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

Четыре рецепторные тирозинкиназы ErbB1–4 служат интерфейсом для сложной сигнальной сети, регулирующей клеточную дифференцировку и пролиферацию. Нарушения в их сигнализации сопутствуют развитию опухолей, что делает данные рецепторы важными мишенями таргетной терапии. Два наиболее изученных рецептора семейства, EGFR и HER2, являются мишенями как ингибиторов тирозинкиназ, так и моноклональных антител к внеклеточному домену. Рецептор HER3 не обладает тирозинкиназной активностью и поэтому долгое время не ассоциировался с развитием опухолей. Однако его способность запускать сигнализацию при гетеродимеризации с HER2, а также важная роль в развитии резистентности к анти-EGFR и анти-HER2 терапии [1] делают его интересной терапевтической мишенью [2]. Для создания новых анти-HER3 препаратов нами в рамках совместного проекта с ЗАО «Биокад» получен и исследован ряд неклассических антител к внеклеточному домену HER3. Их вариабельные фрагменты состоят из единственного иммуноглобулинового домена и отличаются высокой стабильностью и простотой производства. Нами разработана эффективная система бактериальной экспрессии таких антител, показана их высокая термодинамическая и агрегационная стабильность, а также решены их кристаллические структуры. Два наиболее аффинных кандидата связывались с внеклеточным доменом HER3 с KD 1–15 нМ. При этом антитела распознавали разные эпитопы, что позволяло им связываться с рецептором одновременно. Связывание только одного из двух кандидатов блокировало присоединение естественного лиганда HER3. Обладая разным механизмом действия, оба кандидата эффективно подавляли пролиферацию как HER2– (линия MCF-7), так и HER2+ (линия SK-BR-3) клеток рака молочной железы. Данные молекулы могут быть использованы для конструирования бипаратопных и биспецифических терапевтических антител и иммуноконъюгатов.

Благодарности: работа И. Е. Елисеева поддержана стипендией Президента РФ для молодых ученых.

[1] Sergina N.V. et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 445, 437–441 (2007).

[2] Mishra R. et al. HER3 signaling and targeted therapy in cancer. *Oncology Reviews* 12, 355 (2018).

БОРСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ МЕТАЛЛО- β -ЛАКТАМАЗЫ NDM-1

А.В. Кривицкая

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Борьба с бактериальной резистентностью к β -лактамам антибиотикам является важной и актуальной задачей. Это связано с постоянным ростом резистентных бактериальных штаммов, что по мнению ВОЗ может привести к смертности более 10 млн человек в год к 2050 году. На данный момент β -лактамы антибиотики играют ведущую роль при лечении большинства инфекционных заболеваний. Преимущественно бактериальная резистентность связана с экспрессией разнообразных β -лактамаз, – ферментов, способных гидролизовать β -лактамы антибактериальные препараты. В данной работе рассмотрен бактериальный фермент металло- β -лактамаза NDM-1, который способен гидролизовать «антибиотики последней линии защиты» и не имеет клинически одобренного ингибитора. Повышенный интерес в области поиска ингибиторов NDM-1 представляют низкомолекулярные бороновые кислоты. Ввиду своей природы как кислот Льюиса, они способны реагировать с каталитическим гидроксид анионом и образовывать устойчивые тетраэдрические комплексы в активном центре фермента. Недавние исследования демонстрируют потенциальную ингибирующую активность бороновых кислот на основе бензо[*b*]тиофена. В работе рассмотрены пять молекулярных модельных комплексов этих ингибиторов с ферментом NDM-1.

Молекулярные модели построены на основе кристаллических структур NDM-1 металло- β -лактамазы в комплексе с борсодержащими ингибиторами PDB ID: 6Q30, 6BVV и 6Q2Y. Полученные молекулярные модели рассматривались в рамках

квантово-топологической теории атомов в молекулах. Были найдены линейные зависимости между квантово-химическими характеристиками систем и концентрациями полумаксимального ингибирования (IC50), которые использовались для предсказания IC50 новых ингибиторов с бензо[b]тиофена остовом. Проведено сравнение механизмов взаимодействия бороновых кислот и антибиотика имипенема с активным центром NDM-1, а также проанализирована электрофильность реакционных атомов бора в молекуле ингибитора (срл 5) и карбонильного углерода в молекуле имипенема в растворе и активном центре фермента. Проведен расчет энергетического профиля реакции нуклеофильной атаки для комплексов ингибитора и имипенема с ферментом методом молекулярной динамики с потенциалами комбинированного метода квантовой механики / молекулярной механики с применением техники зонтичной выборки с последующим анализом методом взвешенных гистограмм. Показано, что имипенем образует тетраэдрический интермедиат преодолевая энергетический барьер в 14 ккал/моль, в то время как ингибитор реагирует с нуклеофильной частицей безбарьерно.

СЕКРЕТОМЫ ОТ ПОГИБАЮЩИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СПОСОБСТВУЮТ ПОВЫШЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ РЕЦИПИЕНТНЫХ РЕЗИСТЕНТНЫХ КЛЕТОК

И.К. Мальянц^{1,2}, П.В. Шнайдер^{3,4}, О.М. Иванова⁴, К.С. Ануфриева¹, Г.П. Арапиди^{4,5}, В.О. Шендер^{4,5}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева; ³МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁴Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ⁵Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

Возникновение резистентности к химиопрепаратам лимитирует клиническую эффективность противоопухолевой терапии. Химиотерапия обладает неоднозначными свойствами и может способствовать распространению резистентных клеток в ходе прогрессирования онкологического заболевания. Сигнальные молекулы, продуцируемые погибающими под действием химиотерапии опухолевыми клетками, могут способствовать выживанию более резистентных клонов. В данной работе показано, что инкубирование химиорезистентных клеток рака молочной железы MDA-MB231 с секретами, полученными от погибающих чувствительных опухолевых клеток MDA-MB436, обладает большей эффективностью в формировании устойчивости к химиотерапии по сравнению с обратной схемой культивации (чувствительные клетки с секретами от погибающих устойчивых клеток). Для изучения механизма приобретения клетками устойчивости были проанализированы протеомные профили секретомов чувствительных и резистентных клеток до и после обработки цисплатином. Было показано, что в секретоме от погибающих чувствительных клеток повышалась представленность белков, связанных со сплайсингом мРНК. Белки сплайсосома преимущественно локализуются в ядре клетки, однако, в данном случае происходит активная секреция этих белков во внеклеточное пространство. Далее мы проанализировали изменения транскриптомного профиля резистентных клеток рака молочной железы, инкубированных с секретами от погибающих чувствительных клеток. Было показано, что секретомы от погибающих клеток стимулируют повышенную экспрессию генов, связанных с G2-чекпойнтом. Кроме того, секретомы погибающих клеток значительно изменяют программу сплайсинга генов, вовлечённых в пути, связанных с репарацией ДНК, p53-зависимыми сигнальными путями и mTORC1-опосредованным сигналингом.

Таким образом, мы предполагаем, что погибающие под действием химиотерапии чувствительные клетки рака молочной железы способны передавать резистентным клеткам белки сплайсосома, это приводит к изменению процесса альтернативного сплайсинга генов, вовлечённых в регуляцию клеточного цикла и репарацию ДНК и способствует повышению резистентности раковых клеток. *Работа поддержана грантом РНФ 19-75-10123 (LC-MS/MS анализ) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 075-15-2019-1669 (транскриптомный анализ).*

МОДЕЛЬ ПИРОФОСФАТ-РАСПОЗНАЮЩЕГО ФАРМАКОФОРА РАЗЛИЧНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

И.С. Панина^{1,2}, А.О. Чугунов^{1,2,3}, Н.А. Крылов^{1,2}, Р.Г. Ефремов^{1,2,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²НИУ «Высшая школа экономики»; ³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва

В условиях нарастающей глобальной проблемы устойчивости микроорганизмов к антибиотикам перспективными прототипами антибиотиков нового поколения становятся природные соединения, действующие на консервативные небелковые молекулы. Липид II — молекула-предшественник бактериальной клеточной стенки — является многообещающей фармацевтической мишенью для инновационных антибиотиков. Существует несколько классов природных бактериоцинов, механизм действия которых основан на ингибировании синтеза пептидогликанового слоя за счет формирования комплекса с пирофосфатной группой липида II. Для многих из них было показано, что основной мотив связывания консервативен и заключается, главным образом, в формировании межмолекулярных водородных связей NH-группами основной цепи пептидов. В настоящей работе с помощью моделирования методом молекулярной динамики (МД) изучено распознавание модельной молекулы-мишени, представляющей собой диметилпирофосфат, в водном растворе укороченными аналогами лантибиотиков: низином1-12, эпидермином1-12, галлидермином1-12 и лихеницидином. Показано, что аналоги лантибиотиков в водном растворе принимают 3-5 основных конформаций. С помощью разработанного нами метода, основанного на расчетах энергии взаимодействия заданного состояния пептида с пробной парой атомов кислорода, для каждой молекулы выявили лишь одну конформацию, подходящую для эффективного связывания мишени. Это состояние схоже среди всех изученных бактериоцинов и характеризуется наличием 4-5 сонаправленных NH-групп основной цепи кольцевого фрагмента пептида, а также заряженной аммониевой группой, образующими уникальную сеть водородных связей. В результате была предложена структура обобщенного для исследованных лантибиотиков «пирофосфат-связывающего фармакофора». Эти результаты в дальнейшем будут использованы для рационального дизайна пептидов с целью создания их фармацевтически применимых аналогов.

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ. Суперкомпьютерные расчеты выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-74-30014).

ИНГИБИТОРЫ ИНДОЛАМИН-2,3-ДИОКСИНАЗЫ И АРГИНАЗЫ УСИЛИВАЮТ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ИММУНИТЕТ, ВЫЗВАННЫЙ КЛЕТКАМИ, ПОГИБАЮЩИМИ ПО ПУТИ ИММУНОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

О.С. Троицкая², М.Е. Варламов^{1,2}, А.А. Нуштаева², В.А. Рихтер², О.А. Коваль^{1,2}

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, ²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Одним из успешных противоопухолевых подходов является стратегия, когда препарат вызывает иммуногенную гибель опухолевых клеток (ICD), и погибающие клетки активируют иммунную систему организма, формируя иммунный ответ против опухолевых антигенов, что ведет к уничтожению оставшихся опухолевых клеток. Однако супрессивное микроокружение опухоли может подавлять системный иммунный ответ, ослабляя противоопухолевые иммунные реакции. Важное значение в этом процессе играют ферменты деградации аминокислот – индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО) и аргиназа, которые способны усиливать иммунотолерантность опухолевого микроокружения к воздействию иммуностимулирующих препаратов. Мы предполагаем, что ингибиторы ИДО и аргиназы способны усиливать инфильтрацию опухолей цитотоксическими Т-лимфоцитами, что существенно для препаратов, вызывающих гибель клеток по пути ICD. Ранее нами было показано, что про-апоптотический пептид RL2 вызывает гибель опухолевых клеток с признаками ICD. В данной работе в качестве модели для оценки вакцинации была использована культура клеток рабдомиосаркомы мыши МХ-7, а в качестве ингибиторов ИДО и аргиназы – этилпируват, 1-МТ и АВН, соответственно. Клетки МХ-7, обработанные RL2, были трансплантированы мышам СЗН/Не с последующей трансплантацией живых клеток МХ-7 через 7 дней. После иммунизации мышам вводили ингибиторы ИДО и аргиназы. Эффект вакцинации оценивали по выживаемости и появлению опухолей в месте введения живых клеток. Было показано, что этилпируват увеличивал выживаемость животных, иммунизированных RL2-активированными клетками, по сравнению с мышами, не получавшими инъекции этилпирувата, от 67% до 83% и количество мышей без опухоли от 33% до 50%. 1-МТ и АВН также оказывали влияние на вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток. Перитонеальные макрофаги вакцинированных мышей проявляли способность к поглощению интактных клеток МХ-7, что говорит о развитии противоопухолевого иммунитета против данного типа клеток. Иммунизация животных RL2-обработанными клетками с признаками вторичного некроза была менее эффективной, чем клетками на ранних стадиях индукции апоптоза. Таким образом, мы показали, что ингибиторы ИДО и аргиназы способны усиливать противоопухолевый иммунитет, вызванный RL2-обработанными клетками. *Работа поддержана грантом РФФИ № 19-34-90134.*

МЕМБРАННАЯ АКТИВНОСТЬ ЛАНТИБИОТИКА НИЗИНА

Д.Н. Чернышова, С.С. Ефимова, О.С. Остроумова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

С целью выяснения молекулярных механизмов действия низина, продуцируемого *Lactococcus lactis*, настоящее исследование сфокусировано на активности лантибиотика в липидных бислоях, моделирующих мембраны митохондрий. Флуориметрическим методом проведено измерение утечки кальцеина из везикул, сформированных из диолеилфосфохолина (ДОФХ), эквимольной смеси ДОФХ/кардиолипина (ДОФХ/КЛ), и ДОФХ/КЛ/холестерина (ДОФХ/КЛ/ХОЛ) (50/30/20 мол%) липосом при добавке в систему 400 мкМ низина. Установлено, что утечка маркера из незаряженных ДОФХ везикул не превышает 15%. Введение в состав отрицательно заряженного КЛ сопровождается ростом высвобождения флуоресцентного маркера до 80% при введении низина. Включение ХОЛ в отрицательно заряженные бислои ингибирует активность лантибиотика (утечка красителя составляет 10%). Электрофизиологическим методом проведено измерение изменения граничного потенциала ДОФХ/КЛ-бислоев при адсорбции лантибиотика. Установлено, что низин не влияет на граничный потенциал мембран (изменение не превышает 5 мВ). Оценка дипольной компоненты граничного потенциала ДОФХ/КЛ мембран с помощью диполь чувствительной пробы di-8-ANNEPS показала, что низин не влияет на дипольный потенциал отрицательно заряженных мембран. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии эффекта лантибиотика на электрические свойства мембран. Использование модельных липидных бислоев, сформированных по методу Монтала и Мюллера [Montall and Mueller, PNAS, 1972], позволило исследовать способность низина формировать ион-проницаемые трансмембранные поры. Установлено, что в концентрации до 2 мМ низин не индуцирует появление ступенеобразных флуктуаций трансмембранного тока в незаряженных ДОФХ бислоях, а при дальнейшем повышении концентрации приводит к разрушению бислоя. В случае ДОФХ/КЛ- и ДОФХ/КЛ/ХОЛ-бислоев низин способен формировать поры разной проводимости при концентрации 10 мкМ и 15 мкМ, соответственно. Повышение концентрации пептида более 100 мкМ приводит к нарушению стабильности мембран и последующему их разрушению. Высокая порообразующая активность низина в мембранах, включающих кардиолипин, может объяснить его апоптотическое действие в отношении раковых клеток.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-14-00110.

ГЕНОМ. ПРОТЕОМ. МЕТАБОЛОМ

Устные доклады

ОМИКСНАЯ ЭРА: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА И СПОСОБЫ БОРЬБЫ С ИНФЕКЦИЕЙ

Ю.А. Беспятых, Д.В. Басманов, Е.А. Шитиков

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

На сегодняшний день туберкулез остается одной из актуальных проблем здравоохранения, несмотря на общую тенденцию к снижению заболеваемости. Всестороннее развитие омиксных технологий, а также их взаимная интеграция, позволили по-новому взглянуть на метаболизм клетки. Цель исследования состояла в использовании системного омиксного подхода для выявления особенностей *Mycobacterium tuberculosis*, поиска новых противотуберкулезных препаратов и методов типирования возбудителя. В исследование включено 50 штаммов *M. tuberculosis*, в том числе выделенные от одного пациента. Дополнительно использован модельный организм *Mycobacterium smegmatis*. Антибактериальную активность определяли для Оливомиина А, Митрамицина А и Хромомицина АЗ. Полногеномное секвенирование и транскриптомный анализ проводили на секвенаторе Illumina HiSeq 2500. Протеомное профилирование проведено с использованием масс-спектрометра Q-Exactive HF. Установлена ограниченная генетическая вариабельность представителей кластера Beijing B0/W148 (47±13 SNPs) и описано 59 кластер-специфических SNPs, которые, предположительно, ассоциированы с “успешностью”. Протеомный анализ выявил особенности генотипа Beijing в представленности белков липидного метаболизма и белках, участвующих в ответе клетки на гипоксию, что подтвердилось результатами транскриптомного анализа. Анализ штаммов от одного пациента выявил девять SNPs, возникших в процессе лечения. Обнаружить изменения в генах и белках, ответственных за вирулентность патогена и проницаемость клеточной стенки. В резистентных штаммах детектировано увеличение представленности белка Rv0469, ответственного за синтез миколовых кислот, который может являться мишенью для новых противотуберкулезных препаратов. Показано, что Оливомиин А обладает антимикобактериальной активностью. Представленные результаты свидетельствуют в пользу необходимости использования системного подхода для поиска новых мишеней действия препаратов. Детектированные особенности использованы для подбора зондов и разработки нового биосенсора для выявления и типирования возбудителя туберкулеза. Описание вирулентных особенностей *M. tuberculosis* на глобальном системном уровне, безусловно, будет способствовать разработке новых методов борьбы с инфекцией. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 20-75-10144.

КОМПЛЕКСНАЯ СТРАТЕГИЯ ГЛУБОКОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РАСТИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛОМА

Т.Е. Билова^{1,2}, К.М. Бурейко^{2,3}, Э.В. Кисель^{2,3}, М.А. Черевацкая¹, А. Ким², Н.В. Фролова¹, А.В. Соболева^{2,3}, М. Дорн², Г.Н. Смоликова¹, М. Матаморос⁴, В.А. Жуков⁵, О.Ю. Штарк⁵, Л.А. Вессйоханн², А.А. Фролов^{2,3}

¹Кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербургский государственный университет; ²Департамент биоорганической химии, Лейбниц-Институт биохимии растений; ³Кафедра биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет; ⁴Испанский национальный исследовательский совет, Департамент питания растений, Сарагосса, Испания; ⁵Лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий, Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

Метаболомика представляет область знаний, изучающую метаболом, т.е. совокупность метаболитов, являющихся участниками биохимических реакций. Поскольку метаболом фактически отражает “реализованный” геном биологического объекта, его анализ является важным компонентом исследований в области системной биологии. Однако метаболомика растений, как методологическая стратегия, отличается от других платформ функциональной геномики (транскриптомики, протеомики). Это связано с тем, что для растительных метаболитов характерно значительное разнообразие физико-химических свойств и физиологических концентраций в тканях. Эти особенности не позволяют выполнить одновременный анализ всех метаболитов растительного объекта с использованием лишь одной аналитической платформы. В связи с этим, метаболомика растений предусматривает использование комбинации нескольких аналитических стратегий в рамках одного исследования. В нашей работе была разработана стратегия широкомасштабного метаболомного анализа, позволяющая охватить большую часть растительного метаболома. Этот подход подразумевает согласованное использование методов газовой хромато-масс-спектрометрии для анализа первичных термостабильных метаболитов, ион-парной обращенно-фазовой и ультравысокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения для профайлинга полярных термолabileльных метаболитов, реактивных карбонильных соединений и вторичных метаболитов. В ходе статистической обработки данные разных аналитических платформ объединяются и ко-интерпретируются. Данная комплексная стратегия успешно применялась к изучению устойчивости к обезвоживанию семян гороха; метаболитических ответов семян в ответ на установление растений гороха симбиоза с клубеньковыми бактериями и арбускулярно-микоризными грибами; при старении клубеньков у растений гороха и фасоли. Работа выполнена с использованием оборудования РЦ «Развитие клеточных и молекулярных технологий» Научного парка СПбГУ при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением №075-15-2020-922 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

АНАЛИЗ ВКЛАДА ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ВАРИАбельНОСТЬ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН ЧЕЛОВЕКА

Э.В. Генерозов¹, Р.И. Султанов¹, А.В. Желанкин¹, И.И. Ахметов¹, Е.А. Лысенко², Е.М. Леднев², Д.В. Попов²

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Крупные скелетные мышцы человека достаточно вариabельны по показателям соотношения быстрых (IIX, IIA) и медленных (I) типов мышечных волокон. Так, в латеральной широкой мышце бедра это значение придерживается 50%, хотя границы вариabельности могут различаться от 5 до 90%. Было показано, что на 40–50% такая вариabельность обусловлена генетическими факторами, тогда как роль эпигенетической регуляции, в частности метилирования ДНК, в этом аспекте остается пока мало исследованной. Ранее нами было проведено полногеномное ассоциативное исследование показателей состава мышечных волокон в группе из 171 добровольцев с использованием данных иммуногистохимического анализа биопсий четырехглавой мышцы бедра. На текущем этапе было выполнено метиломное и транскрипционное исследование в биопсийном материале мышц в пределах подгруппы добровольцев с наиболее выраженными различиями в составе волокон. Показатели метилирования ДНК в мышечной ткани анализировали с использованием ДНК чипа Infinium MethylationEPIC BeadChip (>850000 CpG сайтов) для 48 участников. Транскрипционное профилирование осуществляли с использованием технологии секвенирования РНК с деплецией рРНК на секвенаторе HiSeq 2500 System (Illumina) в подгруппе из 24 участников. Анализ данных метилирования ДНК показал достоверную ассоциацию с преобладающим типом волокон для дифференциально метилированных CpG-сайтов, с преимущественной локализацией в суперэнхансерных регионах, специфичных для мышечной ткани и в близости с сайтами связывания транскрипционных факторов, взаимодействующих с рецепторами стероидных гормонов. Взаимосвязанный с метилированием профиль изменения генной экспрессии, ассоциированный с типом мышечных волокон, был показан для 34% DM CpG сайтов. Использование различных методических подходов показало потенциальную роль транскрипционных факторов ESRRB и MYF6 в регулировании дифференцировки типов мышечных волокон. Эти предположения дополнительно подтверждаются и при анализе данных метиломного и транскриптомного профилирования мышечных волокон из независимых источников (dbGaP: phs001048.v1.p1). Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 21-15-00362 «Исследование молекулярно-генетических механизмов морфофункциональных изменений мышечных волокон человека в ходе высокоинтенсивных физических нагрузок».

ОПТИКО-БИОСЕНСОРНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ВОДНОЙ СРЕДЕ И БИСЛОЙНОЙ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ

О.В. Гнеденко¹, П.В. Ершов¹, Л.А. Калужский¹, Е.О. Яблоков¹, С.А. Усанов², А.А. Ковалевский², А.М. Тумилович², А.А. Гилеп², Н.В. Струшкевич³, А.С. Иванов¹

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; ²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск;

³Сколковский институт науки и технологий, Москва

Белок-белковые взаимодействия (ББВ) лежат в основе функционирования множества метаболических и сигнальных путей. Особый интерес представляют ББВ с участием мембранных белков, образующих комплексы для передачи сигнала в клетку, транспорта ионов и молекул, переноса электронов в различных электрон-транспортных цепях. Оптико-биосенсорный анализ (SPR метод) позволяет оценить термодинамику, кинетические (kon и koff) и равновесные (Kd) константы ББВ. Исследовали ББВ с участием митохондриального цитохрома P450 CYP11A1, митохондриального цитохрома b5 (CYP5B) и аденодоксина (Adx). Было показано, что параметры взаимодействия Adx – CYP11A1 и CYP5B – CYP11A1 зависят от способа иммобилизации белков и микроокружения. В водном микроокружении при сходном значении koff $(1,5 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, значения kon комплексов Adx – CYP11A1 и CYP5B – CYP11A1 различались на порядок $((6,5 \pm 0,5) \times 10^4$ и $(0,30 \pm 0,03) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, соответственно), что согласуется с высоким сродством CYP11A1 к физиологическому редокс-партнеру Adx. В липидном микроокружении скорость распада комплекса CYP11A1 – Adx значительно выше, чем в водном, koff составляет $(9,1 \pm 0,3) \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$. Параметры комплекса CYP11A1 – CYP5B определить не удалось, вследствие неспецифического связывания мембранных белков, используемых в качестве аналитов, с липидным бислоем. Показана применимость SPR метода для детекции и количественной оценки комплексобразования митохондриальных цитохромов P450 с их редокс-партнерами как в водном, так и в липидном микроокружении. Экспериментальные протоколы SPR анализа, которые были валидированы в этой и предыдущих работах, представляют собой неотъемлемую часть современных подходов для изучения ферментов семейства цитохромов P450. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030) и поддержана грантом РФФИ № 19-04-00485а. Экспериментальная часть была выполнена на оборудовании ЦКП «Протеом человека» при ИБМХ, поддержанного субсидией Минобрнауки № 075-15-2019-1502 от 5 сентября 2019 года.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВ МЕТОДАМИ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОТЕОМИКИ НА ПРИМЕРЕ УБИКВИТИН-ЗАВИСИМОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ

А.А. Лобас¹, Амир Ата Саеи², Е.М. Соловьева¹, Л.И. Левицкий¹, Р.А. Зубарев^{2,3}, М.В. Горшков¹

¹Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, ФИЦ химической физики РАН

им. Н.Н. Семенова, Москва; ²Отдел медицинской биохимии и биофизики, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция;

³Институт фармации, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

Выяснение механизмов жизнедеятельности клеток и их развития, включая изменения в результате лекарственного воздействия, влияния внешних факторов или физиологического состояния самого организма, является одной из основных задач современных постгеномных исследований и разработок в области «омиксных» технологий и системной биологии. Использование современных высокопроизводительных методов анализа расширяет существующие возможности для качественных изменений в подходах к решению фундаментальных и практических проблем медицины, таких, в частности, как предсказания эффективности лекарственного воздействия. Эти решения, в свою очередь, находят дальнейшее применение в биологии и

клинической практике. При воздействии, например, химиотерапевтического препарата на раковые клетки, его мишенями могут быть не только «титульные» для данного лекарства, но и другие белки протеома, которые могут запускать ранее неизвестные механизмы действия, с которыми могут быть связаны как побочные эффекты терапии, так и возможные механизмы выработки резистентности. Одним из основных подходов в подобных исследованиях является качественный и количественный анализ ассоциированной экспрессии белков протеомов методами химической протеомики. Возможности метода будут продемонстрированы на примере анализа количественных полнопротеомных данных, полученных ранее [1] в Каролинском институте Стокгольма для клеточной линии аденокарциномы A549, являющуюся моделью рака легких, которая была обработана 56 химиотерапевтическими препаратами, включая препараты, используемые в клинической практике или находящиеся в стадии экспериментальной терапии. В докладе также будут рассмотрены биоинформатические подходы и результаты поиска сигнатур убиквитин-протеасомальной деградации белков в анализируемых системах «лекарство-протеом» и построены гипотезы о существовании ранее неизвестных механизмов действия у ряда исследованных в работе лекарств. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 20-14-00229.*

[1] Saei, A.; Beusch, C.; Chernobrovkin, A. et al., Nat. Commun. 2019, 10, Article # 5715.

УВЕЛИЧЕНИЕ КОПИЙНОСТИ МУТАНТНОЙ АЛЛЕЛИ КАК МЕХАНИЗМ ПОДДЕРЖАНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ НОНСЕНС-МУТАНТОВ

Е.М. Максютенко^{1,2}, Ю.А. Барбитов¹, А.Г. Матвеев¹, С.Е. Москаленко^{1,2}, Г.А. Журавлева¹

¹Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, ²Филиал Института общей генетики, Санкт-Петербург

Присутствие стоп-кодонов в кодирующих последовательностях различных генов является причиной примерно 30% всех наследственных болезней человека, а также многих форм рака. Вместе с тем, существует естественный механизм, предотвращающий последствия возникновения преждевременных стоп-кодонов путем их считывания как значащих. Этот механизм называется нонсенс-супрессией; он реализуется в клетках всех живых организмов – от бактерий до млекопитающих. Гены SUP45 и SUP35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, кодирующие факторы терминации трансляции eRF1 и eRF3, являются жизненно-важными. Ранее мы отобрали нонсенс-мутантов по этим генам (sup45-n и sup35-n) и показали, что количество полноразмерного белка Sup45 или Sup35 в мутантных клетках снижено и составляет от 1 до 30% по сравнению со штаммами дикого типа. Этот факт является удивительным, т.к. из данных других лабораторий известно, что уменьшение содержания одного из этих белков до 10% сопровождается значительной потерей жизнеспособности дрожжевых клеток. Мы предположили, что в ходе отбора мутантов sup45-n и sup35-n происходит накопление дополнительных, повышающих жизнеспособность, мутаций. Для идентификации таких мутаций мы провели полногеномное секвенирование штаммов, полученных в результате замещения аллели дикого типа SUP45 или SUP35 на мутантные аллели sup45-n или sup35-n. У изученных ста штаммов не были выявлены нуклеотидные замены, которые бы присутствовали у всех вариантов. В то же время, было обнаружено достоверное увеличение копиюности плазмид, содержащих аллели sup45-n или sup35-n. Для подтверждения результатов секвенирования проводили ПЦР-РВ. Полученные данные согласуются с результатами полногеномного секвенирования и показывают увеличение копиюности плазмидной ДНК в диапазоне 3–10 копий у нонсенс-мутантов по генам SUP45 и SUP35 по сравнению с клетками дикого типа. Также нами проведена оценка числа копий мутантных аллелей sup45-n и sup35-n в том случае, когда мутация локализована в геноме, а не на плазмиде. В ходе такой оценки обнаружен тот же феномен увеличения числа копий мутантной аллели. Таким образом, одним из механизмов, которые приводят к улучшению жизнеспособности нонсенс-мутантов, является отбор клеток с увеличенным числом копий мутантной аллели. *Работа поддержана грантом РФФИ 18-14-00050.*

OMIC TECHNOLOGIES TO DECIPHER REGULATORY NETWORKS IN GRANULOCYTIC CELL DIFFERENTIATION

Svetlana Novikova, Olga Tikhonova, Leonid Kurbatov, Tatiana Farafonova, Victor Zgoda

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow

Induced granulocytic differentiation of human leukemic cells under all-*trans*-retinoid acid (ATRA) treatment underlies differentiation therapy of acute myeloid leukemia. Knowing the regulation of this process it is possible to identify potential targets for antileukemic drugs and develop novel approaches to differentiation therapy. In this study, we have performed transcriptomic and proteomic profiling to reveal up- and down-regulated transcripts and proteins during time-course experiments. Using data on differentially expressed transcripts and proteins we have applied upstream regulator search and obtained transcriptional and proteome-based regulatory networks of induced granulocytic differentiation that cover both up-regulated (HIC1, NFKB1A, and CASP9) and down-regulated (PARP1, VDR, and RXRA) elements. To verify the designed network we measured HIC1 and PARP1 protein abundance during granulocytic differentiation by selected reaction monitoring (SRM) using stable isotopically labeled peptide standards. We also revealed that transcription factor CEBPB and LYN kinase were involved in differentiation onset, and evaluated their protein levels by SRM technique. Obtained results indicate that the omics data reflect involvement of the DNA repair system and the MAPK kinase cascade as well as show the balance between the processes of the cell survival and apoptosis in a p53-independent manner. The differentially expressed transcripts and proteins, predicted transcriptional factors, and key molecules such as HIC1, CEBPB, LYN, and PARP1 may be considered as potential targets for differentiation therapy of acute myeloid leukemia.

This work was supported by the Russian Science Foundation (RSF Grant 21-74-20122; <http://www.rscf.ru/>). The authors are grateful to the “Human Proteome” Core Facility, Institute of Biomedical Chemistry (IBMC).

МЕТАБОЛОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ ЭКСТРЕМОФИЛОВ

Е.А. Зеленцова¹, Ю.П. Центалович¹, Л.В. Яньшолё¹, С.В. Шеховцов², Д.И. Берман³

¹Международный томографический центр СО РАН; ²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

³Институт Севера биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан

Метаболом представляет собой совокупность всех исходных, конечных и промежуточных продуктов обмена веществ в ткани. Ответом организма на воздействия внешней среды является смещение концентраций отдельных метаболитов или групп метаболитов от «нормальных» значений, которое позволяет скомпенсировать новые факторы среды и адаптировать к ним клетку. Особый интерес вызывает метаболомный ответ организмов, способных выживать в экстремальных условиях (температура, давление, гипоксия и др.). В данной работе было проведено количественное метаболомное профилирование тканей сердца и печени Сибирской лягушки *Rana amurensis*, которая способна выживать без кислорода (менее 0,2 мг/л O₂) в течение нескольких месяцев. Важной особенностью Сибирской лягушки является сохранение активности в условиях аноксии (она реагирует на внушение раздражители), которой лишены другие устойчивые к аноксии организмы. В эксперименте исследовались две группы животных: 1) содержащиеся при аноксии в течение месяца и 2) контрольные животные, которые содержались в тех же условиях (температура близка к 0) при нормоксии. Сравнительный метаболомный анализ показал, что адаптация к условиям аноксии у Сибирской лягушки сопряжена с сильнейшим энергетическим стрессом (растут концентрации метаболитов гликолиза; накапливается сукцинат, AMP, NADH и другие изменения). Другой выдающейся особенностью *Rana amurensis* является способность выживать при экстремально низких температурах. В работе были исследованы метаболомные изменения в тканях мышц и печени Сибирской лягушки, а также другого экстремофила – Сибирского углозуба (*Salamandrella keuserlingii*), обеспечивающие криопротекцию тканей данных животных. Данная работа проливает свет на очень любопытный вопрос – приспособление клетки к экстремальным условиям внешней среды. Количественное метаболомное профилирование является универсальным инструментом для установления молекулярных механизмов адаптации клетки. Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ проект 18-29-13023.

ПАНОРАМНЫЙ ПРОТЕОФОРМНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ ГЕПАТОКАРЦИНОМЫ: АСПЕКТЫ ГЕТЕРОГЕННОСТИ И ПОИСКА БИОМАРКЕРОВ

Е.С. Зорина¹, С.Н. Нарыжный^{1,2}

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; ²Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константина, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) – основная форма опухолей печени (гепатоцитов), которая выявляется чаще всего на поздних стадиях. Поэтому остро стоит вопрос о ее раннем выявлении. Данная работа направлена на выявление сравнительной информации о белках ГК и белках нормальных гепатоцитов, включая и разнообразные белковые виды (протеоформы), то есть на решение первоочередной задачи, поставленной в международном раковом проекте по изучению протеома человека (Cancer-PP). Представлены данные по изучению проб, полученных при резекции ткани от больных ГК (опухоль и неопухолевый контроль). Пробы исследовали секционным двумерным гель электрофорезом (2DE) в сочетании с масс-спектрометрией (панорамный протеоформный анализ). Кроме того, был проведен панорамный масс-спектрометрический протеомный анализ проб. Идентификацию белка и относительную количественную оценку выполняли с использованием программы Mascot (v. 2.4.1) или SearchGui (v. 3.3.20). Особое внимание при анализе мы уделили ПТМ, которые являются одним из ключевых факторов в патогенезе гепатоцеллюлярной карциномы. Применение секционного метода позволило для каждого из образцов получить до 3500 уникальных генов / белков, при этом с помощью протеомного профилирования методом LC-ESI-MS/MS было получено до 900 уникальных генов / белков. Секционный подход позволяет идентифицировать не только уникальные белки, но и протеоформы. В среднем для каждой пробы было детектировано не менее 15000 протеоформ. Полученные данные позволили обратить внимание на профили некоторых белков, протеоформы которых являются потенциальными биомаркерами. Составлен список таких белков, среди них такие белки, как альфа-фета протеин (AFP-L3), анексин А2 (ANXA2) и другие. Полученные данные позволяют получить и сравнить профили протеомов ГК/гепатоцитов на уровне протеоформ, оценить динамические изменения, происходящие с белками при клеточной злокачественной трансформации за счет сопоставления результатов в норме и при патологическом состоянии. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы. Электрофоретические и масс-спектрометрические работы выполнены с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» в ИБМХ.

ДВА ПОДХОДА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БЕЛКОВОЙ ИНТЕРАКТОМИКЕ

А.С. Иванов

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

В живых системах большинство белков находятся в составе различных молекулярных комплексов, формирование которых происходит за счет белок-белковых взаимодействий (ББВ). Информация о ББВ крайне необходима для: (1) функциональной аннотации белков; (2) расширения знаний о внутриклеточных молекулярных машинах; (3) исследования низкомолекулярных регуляторов ББВ; (4) нахождения целевых ББВ как потенциальных мишеней для создания лекарств нового поколения. Экспериментальные методы исследования ББВ разделяются на две основные группы: (1) «локальная» интерактомика отдельных целевых белков; (2) «микс-интерактомика» общей массы белков, формирующих белковый интерактом (субинтерактом). Для исследования ББВ отдельных целевых белков мы используем оригинальный метод прямого молекулярного фишинга, основанный на комбинации аффинной и высокоэффективной гель-хроматографии, поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и LC-MS/MS идентификации белков. В качестве аффинного реагента используется целевой белок-наживка, иммобилизованный на сорбенте (препаративный фишинг) или на SPR чипе (аналитический фишинг). Ключевым звеном данного подхода является использование SPR биосенсора типа Biacore (Cytiva, США) для моделирования фишинга и оптимизации протоколов

его выполнения. В области «омикс-интерактомики» мы разработали оригинальный подход для анализа субинтерактома стабильных белковых комплексов, основанный на комбинации высокоэффективного гель-хроматографического фракционирования лизата биоматериала, LC-MS/MS идентификации белков и биоинформатического анализа полученного массива данных. Подход позволяет выполнить интерактомную паспортизацию каждого белка по следующим параметрам: (1) факт участия белка в формировании стабильных комплексов; (2) доля белка в мономерном или олигомерном состоянии; (3) распределение белка между комплексами разного размера; (4) размер комплексов, в которых участвует белок; (5) списки возможных белков-партнеров в каждом комплексе. *Работа была выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в РФ на долгосрочный период (2021-2030 годы) с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ (финансовая поддержка Минобрнауки в рамках соглашения №075-15-2019-1502 от 5 сентября 2019 года).*

DIRECTMS1: ИДЕНТИФИКАЦИЯ 2000 БЕЛКОВ ЗА 5-МИНУТНЫЙ ГРАДИЕНТ БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАСС-СПЕКТРОВ ФРАГМЕНТАЦИИ

М.В. Иванов¹, Ю.А. Бубис¹, В. Горшков², Ф. Кьельдсен², М.В. Горшков¹

¹Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

Полнопротеомный анализ сложных биологических проб, таких как клеточные линии человека, связан с необходимостью идентификации и количественного анализа тысяч белков в рамках одного эксперимента. Ключевым методом для такого анализа является хроматомасс-спектрометрия высокого разрешения. При этом, возможности этого метода с точки зрения количества идентифицируемых белков и пептидов ограничены скоростью измерения tandemных масс-спектров. Это вызывает необходимость в сложных приборах и длительном времени экспериментального анализа. Нами был разработан метод DirectMS1 для идентификации и количественного анализа белков, не использующий tandemные масс-спектры. Данный метод позволил значительно сократить время и сложность экспериментов. Эффективность метода DirectMS1 была расширена при помощи интеграции модели на основе машинного обучения Lightgbm. Кроме того, была интегрирована модель DeepLC для предсказания хроматографических времен удерживания пептидов. В работе было показано, что метод позволяет достоверно идентифицировать более 2000 белковых групп для образцов 200 нг клеточной линии HeLa, используя 5-минутные хроматографические градиенты, что значительно превосходит результаты для классического метода анализа протеомов с использованием масс-спектров фрагментации. Также в работе особое внимание было уделено достоверности получаемых результатов и было показано, что более 95% идентифицируемых белков подтверждаются результатами классических подходов с длинными хроматографическими градиентами. *Работа была выполнена при поддержке РФФ, грант № 20-14-00229.*

НАНОПРОВОЛОЧНЫЕ ЧИПЫ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ МИРНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЛИОМОЙ, В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Ю.Д. Иванов¹, К.А. Мальсагова¹, Т.О. Плешакова¹, В.П. Попов², Д.И. Ларионов¹, А.И. Арчаков¹

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; ²Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск

Были разработаны чипы на базе кремниевых КНИ-структур для выявления миРНК, ассоциированных с развитием глиомы. Чип на своей поверхности содержит 10 кремниевых нанопроволочных сенсоров. Сенсорные элементы имеют следующие размеры: толщина 32 нм, ширина 3 мкм, длина 10 мкм. Принцип работы нанопроволочных чипов основан на регистрации изменения тока, протекающего через сенсорный элемент при адсорбции на его поверхность молекулы из раствора аналита. Биоспецифичность анализа обеспечивалась за счет предварительной сенсбилизации поверхности сенсорных элементов молекулярными зондами – одНК, комплементарных к целевым молекулам. Анализ проводился в режиме реального времени без использования дополнительных меток. На первом этапе были проанализированы буферные растворы, содержащие одНК в концентрационном диапазоне 10^{-15} – 10^{-18} М. Минимальная концентрация одНК, которую удалось зарегистрировать, составила $3,3 \times 10^{-17}$ М. При этом время анализа составило ~15 мин. Затем были проанализированы растворы, содержащие миРНК, выделенные из плазмы крови пациентов с подтвержденным диагнозом глиобластома. Было продемонстрировано, что разработанный подход позволяет регистрировать уменьшение сигнала от нанопроволочных сенсоров при анализе образцов миРНК от пациентов с глиобластомой относительно сигнала, зарегистрированного при анализе образцов миРНК, выделенных из плазмы крови пациента с диагнозом гиперплазия предстательной железы. Таким образом, представленные результаты показывают, что нанопроволочные чипы позволяют проводить регистрацию измененного профиля биомолекул на ранней стадии заболевания без применения амплификации и меток с высокой чувствительностью. Серологическая диагностическая система на базе нанопроволочных чипов за счет мультиплексности и экспрессности измерений, в перспективе, позволит проводить селективную преддиагностику социально-значимых заболеваний, включая онкологические патологии. *Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы).*

«ЗОЛОТОЙ СТАНДАРТ» ТРАНСКРИПТОМИКИ НА ПРИМЕРЕ ХРОМОСОМЫ 18

Е.В. Ильгисонис, Н.Э. Вавилов, Е.А. Пономаренко, А.В. Лисица, Е.В. Поверенная, В.Г. Згода, С.П. Радько, А.И. Арчаков

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Целью данного исследования являлось формирование «золотого стандарта» транскриптома, позволяющего получить полное транскриптомное покрытие генома отдельной хромосомы. Уровень отсечения, применяемый при анализе секвенирования, варьируется в зависимости от технологии секвенирования, типа образца и цели исследования, что может в значительной степени повлиять на охват и надежность полученных данных. Задачей данного исследования было определение оптимальной

комбинации параметров для наиболее полного анализа транскриптома. Было проведено сравнение результатов, полученных с использованием различных платформ (количественная полимеразная цепная реакция, Illumina RNASeq и Oxford Nanopore Technologies MinION) для транскриптома, кодируемого хромосомой 18 человека в клеточной линии HepG2 и образцах ткани печени человека. Из трех проанализированных технологий были выбраны две: технологии секвенирования Illumina и технологии нанопор, которые хорошо дополняют друг друга с точки зрения неперекрывающихся общих транскриптов и позволяют регистрировать полный геном хромосомы. Комбинация технологий позволила обнаружить по крайней мере один транскрипт для каждого гена 18 хромосомы, кодирующего белок. Очевидно, что транскрипты обнаруживаются разными платформами с разной степенью чувствительности, поэтому рекомендуется использовать несколько технологий. Было показано, что увеличение уровня отсека приводит к уменьшению количества зарегистрированных транскриптов и повышению надежности их обнаружения. Наибольший охват генома хромосомой 18 достигается при уровне отсека > 0 . В будущем результаты, полученные в этом исследовании, будут применены к другим хромосомам человека. *Выполнение работы профинансировано грантом РНФ “Использование 2D фракционирования в качестве “золотого стандарта” протеомики” (соглашение №20-15-00410).*

ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

Д.Н. Каширина¹, А.Г. Бржозовский², Л.Х. Пастушкова¹, А.С. Кононихин^{1,3}, Е.Н. Николаев^{2,3}, И.М. Ларина¹

¹ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН; ²Сколковский институт науки и технологий; ³Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Для исследования влияния факторов космического полета, среди которых особое внимание уделяется микрогравитации, применяются различные наземные модели, самой эффективной из которых является «сухая» иммерсия. В ходе эксперимента воссоздается эффект безопорности, равномерной компрессии и гипокинезии, при которой даже в краткосрочных исследованиях происходит глубокое снижение мышечного тонуса. Структурное и функциональное изменение мышечной ткани сопровождается модификацией окружающей соединительной ткани. С целью анализа действия факторов «сухой» иммерсии на организм здорового человека, методами протеомики была проанализирована плазма крови мужчин-участников 21 суточной «сухой» иммерсии и женщин-участниц 3-суточной «сухой» иммерсии. В ходе прободготовки плазму очищали от мажорных белков, а затем подвергали восстановлению, алкилированию, осаждению белков и ферментативному расщеплению с помощью трипсина. Полученную полипептидную смесь разделяли с помощью хроматографа, сопряженного с масс-спектрометром TIMS TOF (Bruker). Идентификацию белков и выявление их относительного количества проводили с помощью программного пакета PEAKS studio. Всего в образцах плазмы было полуколичественно исследовано более 500 белков. Выявлена группа белков, концентрации которых достоверно менялись к концу экспериментов. Для данных белков характерно участие в метаболизме внеклеточного матрикса, который является основой соединительной ткани и играет важную роль в межклеточных контактах, транспорте веществ и механической поддержке клеток. Выявлено увеличение концентрации матриксной металлопротеиназы-2, что указывает на реорганизацию и активацию деградации внеклеточного матрикса. К концу эксперимента также выявлено снижение протеогликанов внеклеточного матрикса, таких как олигомерный матриксный белок хряща и люмикан, что может отражать снижение метаболической активности хрящевой и мышечной тканей. Таким образом, моделируемые факторы космического полета оказывают значительное влияние на белки внеклеточного матрикса, что характеризует матрикс как динамичную структуру, адаптирующуюся к острой механической нагрузке. *Работа была выполнена в рамках базовой тематики РАН 65.3.*

ВЛИЯНИЯ НОНСЕНС-ОПОСРЕДОВАННОЙ ДЕГРАДАЦИИ РНК НА ФОРМИРОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМА И ПРОТЕОМА РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

А.Н. Князев, А.И. Глушкевич, И.С. Ляпина, А.С. Мамаева, Е.А. Петров, И.А. Фесенко

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

Система нонсенс-опосредованной деградации РНК (NMD) обеспечивает деградацию aberrантных транскриптов и участвует в регуляции экспрессии множества генов. Известно, что у растений 17,4% мультиэкзонных генов имеют альтернативно-сплайсирующиеся изоформы, которые могут являться мишенями NMD. Также показано, что система NMD в условиях стресса ингибируется, что может приводить к дифференциальной экспрессии ряда генов и появлению новых белков и пептидов. Роль таких белков и пептидов в ответе растений на стрессовые факторы среды мало изучена. Целью нашего исследования является идентификация функциональных белков и пептидов, регулируемых системой NMD. Для этого, мы провели системный анализ транскриптома, протеома и пептидома дикого типа и мутантной линии с нокаутом ключевой киназы системы нонсенс-опосредованной деградации SMG1 модельного растения мха *Physcomitrium patens*. Транскрипционный анализ с применением технологии прямого нанопорового секвенирования выявил дифференциальную экспрессию 2236 транскриптов. Также, было идентифицировано 18517 новых альтернативно-сплайсирующихся изоформ, среди которых 711 дифференциально экспрессировались в растениях с мутантной системой NMD. Более того, мы идентифицировали 407 локуса, которые ранее не были известны как транскрибируемые участки генома. Предсказанные на основе данных транскрипционного анализа белки и пептиды были идентифицированы с помощью масс-спектрометрического анализа. Мы подтвердили трансляцию 416 новых изоформ, регулируемых системой NMD. Количественный протеомный анализ выявил 84 дифференциально экспрессирующихся белков, что значительно меньше, чем выявленных различий на транскрипционном уровне. Таким образом, в рамках проведенных исследований мы впервые получили экспериментальные данные по нативному транскриптому, протеому и пептидому растений, мутантных по системе NMD, и показали роль этого механизма в формировании профиля мРНК и полипептидного пула растительной клетки. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-14-01189.*

ИССЛЕДОВАНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОГО СОСТАВА МОЧИ И КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ С ЦЕЛЬЮ ДИАГНОСТИКИ РАННИХ СТАДИЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ А.С. Кононихин¹, А.Е. Бугрова², А.Г. Бржозовский¹, М.И. Индейкина², Н.В. Захарова², Д.Н. Каширина³, И.М. Ларина³, Н.В. Чеботарева⁴, Е.Н. Николаев¹

¹Сколковский институт науки и технологий; ²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;

³Институт медико-биологических проблем РАН; ⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва

Хронический гломерулонефрит (ХГН) в структуре хронической болезней почек среди первичных почечных заболеваний занимает первое место, кроме того, отмечается рост распространенности ХГН в 2,4 раза за последние 10 лет. При тяжелом течении болезнь приводит к инвалидизации больных еще до наступления терминальной почечной недостаточности, в том числе вследствие побочных эффектов лечения. В то же время клиническое течение хронического гломерулонефрита может варьировать от мягкого доброкачественного до быстро прогрессирующего в хроническую почечную недостаточность; при этом выраженность клинических проявлений не всегда соответствует тяжести почечного повреждения, что требует проведения биопсии почки, которая является золотым стандартом диагностики и мониторинга ХГН. У подавляющего большинства больных в мировой и отечественной практике биопсия почки проводится однократно для определения морфологической формы гломерулонефрита, и крайне редко в динамике – для оценки эффективности терапии и прогноза заболевания по причине инвазивного характера этого метода и риска осложнений. Однако оценка активности почечного процесса в динамике на разных этапах его развития крайне важна для оптимизации условий лечения: определения вида, объема и длительности иммуносупрессивной терапии с целью минимизации ее побочных эффектов, так как сроки лечения больных с активным ХГН могут достигать нескольких лет. Основной задачей проводимого исследования является разработка эффективных неинвазивных «инструментов» для мониторинга течения ХГН и более точной оценки эффективности проводимой терапии. Для решения поставленных задач используются современные протеомные и пептидомные подходы, основанные на масс-спектрометрии для определения особенностей белкового, пептидного профиля мочи и крови пациентов на разных стадиях течения ХГН. Полученные результаты будут особенно актуальны и востребованы для неинвазивной диагностики формы нефрита у лиц, имеющих противопоказания к нефробиопсии. Работа проводится в рамках проекта РНФ 21-74-20173 в тесном сотрудничестве с ЦКП "Протеом человека" ИБМХ РАН.

β-ЛИТИЧЕСКАЯ ПРОТЕАЗА *LYSOBACTER CAPSICI*: ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

М.А. Константинов¹, А.С. Афошин², И.В. Кудрякова², Н.В. Васильева², И.Ю. Торопыгин¹

¹НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва; ²ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

На сегодняшний день, согласно Global Proteome Machine Database, для из почти 2 миллиардов аннотированных белков, примерно из 96% – идентифицированы с помощью трипсина. Однако в ряде случаев сохраняется потребность в использовании альтернативных протеаз. В этой работе мы предлагаем бета-литическую металлоэндопептидазу *Lysobacter capsici* (БлМП) в качестве комплементарной протеазы для протеомики. Наши исследования показали, что БлМП дает оптимальные по массе фрагменты для масс-спектрометрического анализа белка. Гидролиз в основном проходит по карбонильной группе глицина. Это дает возможность использования этого фермента для протеомного анализа мембраносвязанных белков. Фермент выделен из культуральной среды *Lysobacter capsici* ВКМ-2533Т. Для проверки возможности использования исследуемого фермента в протеомных исследованиях полосы ПААГ с белком были гидролизованы БлМП по аналогии с трипсином. Полученный набор пептидов был проанализирован с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии и белки были идентифицированы с использованием поисковой системы Mascot в базе данных SwissProt. Исследуемые белки: миоглобин, овальбумин, казеин, БСА и NADPH ДГГ2 были идентифицированы с высоким значением Score. Одним из преимуществ использования БлМП является оптимальные условия ее работы, включая температурный диапазон от 23 до 37°C, большое окно pH и малое время гидролиза. Наше исследование показало возможность использования БлМП в протеомных исследованиях. Также он проявляет высокую стабильность и показывает большой процент покрытия белковой последовательности. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013 – 2020 годы. Электрофоретические и масс-спектрометрические работы выполнены с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» в ИБМХ.

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ РНК ФЕРМЕНТОМ ADAR В ХОДЕ ОНТОГЕНЕЗА ПЛОДОВОЙ МУШКИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

А.А. Ключникова¹, А.О. Гончаров¹, Л.И. Левицкий², М.А. Пятницкий¹, С.Е. Новикова³, К.Г. Кузнецова¹, И.Ю. Ильина¹, С.А. Мошковский¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН; ³НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Редактирование матричной РНК аденозиндеаминазами из семейства ADAR представляет собой посттранскрипционную модификацию, в ходе которой фермент распознает двухцепочечные фрагменты РНК и меняет остаток аденозина на остаток инозина. При нахождении сайта редактирования в транскрибируемой части мРНК последний чаще всего транскрибируется как гуанозин, из-за чего в белке может происходить одноаминокислотная замена. В нашей работе мы использовали протеомный подход для анализа сайтов редактирования РНК в данных из работы [Casas-Vila et al., 2017] у плодовой мушки на разных стадиях развития. Всего в протеоме дрозофилы нам удалось достоверно детектировать 40 пептидов, содержащих сайты редак-

тирования. По данным интерактивного анализа, данные белки, по большей части, задействованы в синаптическом везикулярном транспорте и в организации актомиозинового комплекса. Наиболее интересным результатом является то, что относительная отредактированность большинства сайтов коррелирует с представленностью белков, характерных для соответствующей стадии развития животного. Так, на поздних стадиях куколки, нам удалось наблюдать описанный ранее «взрыв» редактирования РНК. На этих стадиях группа наиболее представленных и в наибольшей степени отредактированных белков обогащена белками, задействованными в нейрогенезе и формировании мускулатуры. Полученные биоинформатическими методами результаты мы дополнили собственными данными таргетного количественного анализа редактирования наиболее интересных белков в мозге личинок, куколок и имаго дрозофилы. Именно белки, задействованные в функциях нейронов обогащены событиями редактирования. В целом, в ходе онтогенеза плодовой мушки в большинстве проанализированных сайтов, уровень редактирования растет. Протеогеномный анализ белковых продуктов редактирования РНК оказался хорошим инструментом, помогающим увидеть реальную картину редактирования и пронаблюдать ее в процессе развития организма.

ПАНОРАМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПОСТТРАНЛЯЦИОННЫХ И ХИМИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ В «СКОРОСТРЕЛЬНОЙ» ПРОТЕОМИКЕ

Л.И. Левицкий¹, Ю.А. Бубис¹, И.А. Тарасова¹, Е.М. Соловьева¹, М.В. Горшков¹, С.А. Мошковский^{2,3}

¹Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, ФИЦ химической физики РАН

им. Н.Н. Семенова; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ;

³ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Идентификация модифицированных форм пептидов имеет ключевое значение в протеомных исследованиях. Определение посттрансляционных модификаций, в том числе редких, необходимо в широком спектре биологических задач. В тоже время, правильный учёт химических модификаций требуется для корректной интерпретации результатов, а артефакты пробоподготовки могут «заслонять» собой биологически значимые модификации и замены. В последнее время распространение получил подход к анализу модификаций в панорамном протеомном анализе, названный «открытым поиском». В этом подходе пептиды из базы данных идентифицируются с произвольным сдвигом молекулярной массы, что позволяет детектировать пептиды с «неожиданными» модификациями любой природы. Обработка результатов открытого поиска существенно отличается от стандартного подхода, где идентифицируется конкретная изоформа пептида. При анализе требуется интерпретировать величину сдвига массы пептида: она «кодирует» модификацию (либо сумму модификаций и/или замен), которую данный пептид несёт. Локализация модификации на том или ином аминокислотном остатке возможна путём анализа спектра фрагментации пептида. Для решения этих задач требуется развитие новых программных методов. Поставленную задачу решает AA_stat, разработанный авторами алгоритм для интерпретации результатов открытого поиска. AA_stat производит статистический анализ сдвигов масс, достоверно наблюдаемых в протеомном эксперименте. С помощью анализа частот встречаемости аминокислот, а также базы модификаций Unimod, AA_stat предлагает наиболее вероятные интерпретации наблюдаемых сдвигов масс, а также осуществляет их локализацию на основе спектров фрагментации. В результате исследователь получает интерактивный отчёт в формате HTML, содержащий полный профиль наблюдаемых модификаций с их аннотацией, результатами частотного анализа и локализации. В докладе показаны примеры анализа редких посттрансляционных модификаций с помощью AA_stat, а также возможные подходы к анализу «больших данных», то есть анализа множества разнородных наборов данных и их классификации с точки зрения наблюдаемых наборов сдвигов масс. *Работа поддержана грантом РФФИ №18-29-13015.*

МЕТАБОЛОМНЫЕ ЛАБОРАТОРНО-ЛОКАЛИЗОВАННЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ (LDT): ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

П.Г. Лохов, С. Лихтенберг, О.П. Трифонова, Д.Л. Маслов, Е.Е. Балашова

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Сегодня исследователи пытаются создать омикс-тесты для диагностики заболеваний, оценки риска их развития и определения реакции пациента на лечение. Метаболомика, последняя и новейшая из омиксных наук, за последние 10 лет накопила большой объем данных, которые позволяют создавать подобные омикс-тесты, основанные на полном анализе низкомолекулярной фракции биологических жидкостей организма. Применение подобных тестов в медицине вместо используемых сегодня лабораторных тестов, ориентированных на измерение ограниченного набора лабораторных показателей, даст качественный скачок в эффективности лабораторной диагностики. Но, несмотря на перспективы внедрения метаболомных омикс-тестов в клинику, их применение на практике осложнено отсутствием регламентированных процедур и стандартов, разработка которых затруднена сложностью метаболомных методов анализа биоматериала. Возможным решением этой проблемы представляется внедрение метаболомики в клиническую практику в формате лабораторно-локализованных тестов (laboratory-developed test – LDT). LDT – это подмножество устройств для диагностики in vitro, которые разрабатываются, производятся и используются в одной лаборатории. Данный формат уже успешно применяется в медицинской практике как для измерения концентраций отдельных веществ в биоматериале, так и их совокупностей. В докладе рассказывается история возникновения и развития LDT. Проанализировано современное состояние и перспективы широкого внедрения метаболомных LDT в практику. В сравнении с научным метаболомным исследованием и конвенциональным клиническим лабораторным тестом показаны характерные особенности метаболомного LDT, раскрывающие его сущность, сильные стороны и ограничения. Обсуждается возможность масштабирования метаболомных LDT и потенциальное значение подобного масштабирования для здравоохранения. Также представлены правовые аспекты регулирования LDT в США, Евросоюзе и Сингапуре, демонстрирующие различные подходы к данному вопросу. На основании представленных данных даны рекомендации о целесообразных путях дальнейшего внедрения метаболомных LDT в практику. *Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы).*

ЯМР-МЕТАБОЛОМИКА: ИНСТРУМЕНТ АНАЛИЗА БИОХИМИЧЕСКОГО ОТВЕТА ЖИВЫХ СИСТЕМ

С.С. Марьясина¹, Д.И. Ларичева^{1,2}, О.А. Аверина ОА¹, М.А. Шепелюк¹, Ю.Р. Вараева³, А.В. Стародубова³, В.А. Ивлев⁴, Г.А. Калабин⁴, П.В. Сергиев¹, В.И. Польшаков¹

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова;

³ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи; ⁴Российский университет дружбы народов, Москва

Метаболомика – важный элемент системной биологии, анализирующий состояние живого организма на основе определения качественного и количественного состава низкомолекулярных метаболитов – продуктов биохимических процессов в тканях и биологических жидкостях. Состав метаболитов зависит от биохимических процессов на всей цепочке геном — транскриптом — протеом — метаболом. Он лучше всего позволяет получить информацию о реакции организма на различные факторы, среди которых как внешние условия (например, состав питания, стресс и т.п.), так и внутренние (в т.ч. генетические нарушения или наличие заболеваний). Метаболом млекопитающих включает более 30 тыс. индивидуальных низкомолекулярных соединений с огромным химическим разнообразием и диапазоном изменения их концентраций. Для идентификации метаболитов, представленных в малой концентрации, используют методы хромато-масс-спектрометрии, обладающие высокой чувствительностью. Для идентификации и количественного определения метаболитов, представленных в биологических жидкостях и тканях в большей концентрации, используют методы спектроскопии ЯМР. Этот метод выгодно отличается высокой воспроизводимостью результатов и простотой пробоподготовки. При изучении животных и человека наиболее доступным и информативным метаболомным исследованием является идентификация низкомолекулярных соединений в моче и крови. Методами ЯМР удаётся детектировать и определять концентрацию до 100 метаболитов в моче и около 60 в крови. В докладе представлены результаты изучения метаболомных профилей более 100 добровольцев, принимавших витамины Д, С, В1, В6, В9 и В12. Цель этого исследования, выполненного методом ЯМР, – поиск биомаркеров витаминного статуса человека, которые могут быть использованы для идентификации витаминной недостаточности и рационального подбора персонализированной витаминотерапии. Вторым направлением исследований является изучение нескольких генов, продукты которых участвуют в процессинге РНК или регуляции липидного обмена. Методами ЯМР проведено сравнительное исследование метаболома мышей, нокаутных по соответствующим генам, с метаболомом животных дикого типа. Проведенный анализ позволил установить связь между функциями этих генов и их фенотипическим проявлением. *Работа выполнена при поддержке РФФ 19-14-00115 и РФФ 21-64-0000.*

ПЕРЕКОДИРОВАНИЕ ПРОТЕОМОВ МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ РЕДАКТИРОВАНИЯ МАТРИЧНОЙ РНК АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗАМИ

С.А. Мошковский^{1,2}, Л.И. Левицкий³, К.Г. Кузнецова², А.А. Ключникова^{1,2}, А.О. Гончаров^{1,2}, И.Ю. Ильина², М.В. Иванов³, С.Е. Новикова⁴, В.Г. Згода^{4,5}, М.В. Горшков³

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальроза, ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН; ⁴НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ⁵Сколковский институт науки и технологий (Сколтех), Москва

Одним из источников образования вариантов аминокислотной последовательности белков являются посттранскрипционные модификации в кодирующих участках матричной РНК. Самое распространенное явление такого рода – редактирование РНК аденозиндезаминазами ADAR. Эти эволюционно древние ферменты существуют у большинства многоклеточных организмов и дезаминируют в РНК остатки аденозина с образованием инозина. Последний в большей степени комплементарен цитозину, нежели урацилу, вследствие чего РНК перекодируется, а в аминокислотную последовательность вносятся точечные замены. Описаны случаи, когда перекодирование белков в течение развития модельных животных и человека имело функциональную роль. Ранее перекодирование белков исследовали в основном на уровне РНК или в отдельных белках, но почти не осуществляли его анализ на уровне целого протеома. Нами был осуществлен такой протеомный поиск с использованием доступных данных редактирования РНК (эдитома), на основе которых были сгенерированы специализированные белковые базы данных. Разработанный нами мультиомиксный подход позволил проанализировать головной мозг модельных организмов, в том числе, плодовой мушки, мыши и человека. В рамках этих исследований нам удалось идентифицировать участки белков, отредактированные на уровне матричных РНК. В итоге, анализ эдитома дрозофилы на белковом уровне выявил наличие примерно 70 участков редактирования. Далее было показано, что появление отредактированных мРНК на уровне протеома у млекопитающих очень низкая – в протеоме было зарегистрировано примерно 2% сайтов редактирования из числа обнаруженных в транскриптоме. Обнаружено, что глиальные клетки и нейроны обладают различным набором отредактированных белков. В продолжение работы перекодирование белков исследовали в 40 наборах данных панорамной протеомики разных клеток и тканей человека. Подтвержден высокий уровень и разнообразие перекодированных белков в головном мозге человека. Разнообразный профиль перекодирования был характерен для ряда злокачественных опухолей. Функциональное значение тканеспецифического распределения и выраженности перекодирования белков за счет работы ферментов ADAR еще предстоит выяснить. *Работа поддержана грантами РФФ 17-15-01229 и 20-15-00072.*

ПРОЦЕСС РОСТА РАСТЯЖЕНИЕМ У ЗЛАКОВ: ХРОНОЛОГИЯ СОБЫТИЙ, УСТАНОВЛЕННАЯ МЕТОДОМ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА

Л.В. Козлова, А.Р. Назипова, О.В. Горшков, А.А. Петрова, Т.А. Горшкова

Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань

Растительные клетки в ходе своего развития проходят этап деления, после чего молодая клетка удлиняется и далее дифференцируется в зависимости от выполняемых ею функций. На стадии удлинения размеры клеток могут увеличиваться в десятки и сотни раз по сравнению с исходными. Удлинение подразумевает реорганизацию архитектуры клеточной стенки

клетки, которая включает разрушение связей между существующими полисахаридами с одновременным встраиванием нового строительного материала, что позволяет клетке растягиваться, не теряя прежней толщины стенки. Механизмы, обеспечивающие этот процесс, исследуются, в основном, на двудольных растениях, обладающих клеточными стенками первого типа, в то время как у злаков, имеющих клеточные стенки второго типа, механизмы роста растяжением гораздо менее изучены. В процессе реорганизации клеточных стенок могут быть задействованы гликозилтрансферазы – ферменты, синтезирующие полисахариды – и гликангидролазы, разрушающие их. Мы использовали кончик корня проростка кукурузы в качестве объекта для изучения роста растяжением у злаков, поскольку в нем легко разграничить зоны, клетки в которых находятся на разных этапах своего развития. Эти зоны корня были проанализированы с помощью метода транскриптомного профилирования и кластерного анализа экспрессии генов. Результаты были сопоставлены с данными протеомного анализа, а также подтверждены результатами иммунообочения полисахаридов и анализа гликангидролазных активностей на срезах корня кукурузы с помощью коммерческих субстратов. Было обнаружено, что в меристеме и в зоне начала роста растяжением корня кукурузы, клеточные стенки совмещают в себе особенности стенок первого и второго типов. На стадии активного роста растяжением экспрессия генов, кодирующих ферменты синтеза основных полисахаридов клеточных стенок злаков, уже превалирует. Для одного из ключевых полисахаридов клеточных стенок второго типа были идентифицированы два независимых набора гликозилтрансфераз и гликозилгидролаз, предположительно участвующие в синтезе и деградации двух разных популяций углеводных молекул. *Работа выполняется при финансовой поддержке Российского научного фонда, № проекта 18-14-00168.*

ПРОТЕОМНЫЕ СИГНАТУРЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ДЛЯ ЛИНИЙ КЛЕТОК РАКА ЛЕГКОГО И КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

С.Е. Новикова, Н.А. Шушкова, Т.Е. Фарафонова, О.В. Тихонова, В.Г. Згода

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Колоректальный рак (КРР) и рак легких (РЛ) лидируют по распространенности и смертности во всем мире. Внеклеточные везикулы (ВнВез) опухолевого происхождения, включая экзосомы, нагружены белками, которые являются «зеркальным отражением» протеома клетки-продуцента. Данные белки могут быть обнаружены в биологических жидкостях, например в плазме крови. Таким образом, ВнВез несут протеомные сигнатуры, представляющие большой интерес для скрининга, а также для предиктивного и прогностического анализа опухолей. С целью определения универсальной, тканеспецифичных и линия-специфичных протеомных сигнатур, мы выполнили масс-спектрометрическое профилирование без использования стабильных изотопных меток для ВнВез, происходящих из клеток КРР человека линий Сасо-2, НТ-26 и НСТ116, а также из клеток РЛ человека линий NCI-H23 и A549. Применяв мониторинг выбранных реакций (SRM) с использованием изотопно-меченных пептидных стандартов, мы оценили уровень содержания 28 дифференциально экспрессирующихся белков, включая общепринятые маркеры экзосом CD9, CD63, CD81, CD82 и HSPA8. Белки FN1, ITGB3 и HSPG2 были верифицированы в качестве компонентов универсальной протеомной сигнатуры ВнВез. Содержание белков CNP, TSG101 и ESP15 было повышено в образцах ВнВез легочного происхождения, в то время как белок TUBA4A был верифицирован как компонент протеомной сигнатуры ВнВез, полученных из клеток КРР. Измерение панели белков FN1, TUBA4A, TLN1 PASCIN2 и HSPA8 методом SRM в плазме крови, полученной от 23 пациентов с РЛ на различных стадиях, позволяло отличить пациентов с ранней (1) и поздними (2-4) стадиями болезни. Протеомный груз внеклеточных везикул представляет собой привлекательный источник потенциальных биомаркеров КРР и РЛ, которые требуют дальнейшей валидации. *Работа поддержана грантом РНФ № 21-74-20122. Эксперименты выполнены с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» (ИБМХ).*

ОЦЕНКА ВКЛАДА РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИИ ПРОТЕОМА В ПРОЦЕСС ПОИСКА НОВЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ

П.В. Погодин, Е.В. Ильгисонис, О.И. Киселева, Е.А. Пономаренко, В.В. Поройков

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Белки – молекулярные машины, ответственные за непосредственное проявление клеткой разнообразного поведения в меняющихся условиях окружающей среды. Обнаружение белков, установление их структурных вариантов, исследование функции и, соответственно, роли в норме и при патологиях – неотъемлемая часть биомедицинских исследований, которая получила существенное развитие в рамках международного проекта «Протеом человека». Для исследования белков разработано и применяется ряд экспериментальных и вычислительных методов, основанных на биохимических, биофизических, электрохимических, иммунологических, физических, статистических и иных принципах. Применение экспериментальных методов иногда приводит к накоплению сведений, которые по разным причинам могут вступать в противоречие друг с другом. Агрегация и гармонизация таких сведений в электронных ресурсах, проводимая в последние десятилетия с применением биоинформатики, позволяют установить наиболее перспективные направления дальнейших исследований белков в качестве терапевтических мишеней, то есть таких объектов, модуляция которых приведет к коррекции патологического состояния организма. Однако, достижения биоинформатики позволяют не только уточнить информацию о биологических объектах, но и оценить роль конкретных экспериментальных и вычислительных методов в успехе биомедицинских исследований, выявить существующие тренды и готовиться к возникновению новых. Так, например, проведенный нами анализ базы данных (БД) NextProt (www.nextprot.org/) показал наблюдающееся в последние годы смещение интереса научного сообщества от поиска у белков функций, связанных с фосфорилированием и регуляцией транскрипции, к функциям, связанным с иммунным ответом. В настоящей работе проведен сравнительный анализ БД о структуре и функциях белков, NextProt, и БД о терапевтических мишенях, OpenTargets (www.opentargets.org/), с учетом сведений, содержащихся в полнотекстовых публикациях. Результатом работы является обзор особенностей применения различных экспериментальных и биоинформатических методов в процессе обнаружения новых характеристик белков и определения их в качестве терапевтических мишеней. *Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы).*

ВЫБОР МИШЕНЕЙ ДЛЯ НОКАУТА НА ОСНОВЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МУЛЬТИОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HepG2 И МЕТА-АНАЛИЗА

Е.А. Пономаренко, О.И. Киселева, Е.В. Ильгисонис, М.А. Пятницкий, Е.В. Поверенная

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Совокупность результатов экспериментального профилирования одного и того же образца биологического материала на транскриптомном, протеомном и метаболомном уровнях обеспечивает системное понимание происходящих молекулярных процессов и взаимосвязей между продуктами экспрессии в геноцентричном формате. Создание мультиомного цифрового портрета клеточной линии HepG2 является важным шагом в понимании функциональной специфичности генов и механизмов онкотрансформации клеток. Для исследования была выбрана опухолевая клеточная линия HepG2 (SCC249, Sigma-Aldrich). Образцы клеточной линии были заготовлены в максимально единообразных условиях, после чего направлены на экспериментальное полногеномное и транскриптомное секвенирование (Illumina NovaSeq 6000), транскриптомное секвенирование с помощью технологии MinION (Oxford Nanopore), протеомный анализ (LC-MS/MS, Orbitrap Fusion, Termo Fisher), метаболомное профилирование (LECO Pegasus 4DBT, Leco Corporation) и липидомный анализ (Maxis Impact qTOF). Результаты экспериментального анализа сопоставляли с текущим уровнем знаний о молекулярных особенностях клеточной линии HepG2, накопленным в форме научных публикаций (для автоматического тема-анализа текстов использовали модуль ScanBious) или формализованным в составе баз данных (Human Protein Atlas, Achilles, KEGG, MalaCards, DisGeNET, NeXtProt). Экспериментально в рамках данного исследования подтверждена экспрессия более 13 тысяч генов, при этом идентифицировано 1,3 тыс. белковых продуктов, 155 метаболитов и более 1 тыс. уникальных низкомолекулярных соединений липидной фракции клеточной линии HepG2. Интеграция экспериментальных данных и сведений о метаболических путях, интерактомных взаимодействиях и данных цитогенетического исследования клеточной линии позволила сформировать перечень генов-мишеней для последующего нокаута и оценки функциональных изменений мультиомного профиля клеточной линии. В перспективе накопленные данные могут быть основой для создания предсказательных моделей оценки уровня экспрессии белка и выявления функциональной специфичности, что является приоритетными задачами международного консорциума «Протеом человека». *Выполнение работы профинансировано грантом РНФ «Изменение мультиома опухолевой линии клеток печени при геном нокауте» (соглашение 20-14-00328).*

РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ

Д.В. Попов^{1,2}, В.Г. Згода³, Е.И. Балакирева², Г.Р. Газизова⁴, Е.И. Шагимарданова⁴, О.А. Гусев⁴, Е.А. Лысенко^{1,2},

П.А. Махновский¹

¹ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва; ²Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³НИИ биомедицинской химии им В.Н. Ореховича, Москва; ⁴Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Митохондрии играют ключевую роль в энергообеспечении тканей, особенно с высоким уровнем метаболизма. Скелетные мышцы являются метаболически активной тканью, играющей ключевую роль в регуляции углеводно-жирового обмена в организме. В работе изучали особенности регуляции биогенеза митохондрий в скелетной мышце человека при регулярных физических упражнениях. Семь нетренированных мужчин в течение двух месяцев тренировались на велозргометре (5 раз в нед., 1 ч в день). Биопсические пробы из m. vastus lateralis брали до и после тренировочного периода для оценки изменений транскриптома (секвенирование РНК) и протеома (панорамная масс-спектрометрия с использованием изобарической метки). В пробах мышц было обнаружено около 800 белков, при этом регулярные аэробные тренировки вызвали увеличение около 250 белков, включая около 100 митохондриальных белков. При сопоставлении изменений содержания белков и соответствующих мРНК было выявлено, что увеличение содержания многих белков (в основном, митохондриальных) не сопровождалось увеличением уровня мРНК. Анализ доступных баз данных показал, что такие белки и их мРНК – это высокопредставленные белки и мРНК с высокой устойчивостью к деградации. Одновременно было показано, что аэробные тренировки вызывают увеличение содержания 20 шаперонов (в том числе белков семейства HSP70) и шаперон-ассоциированных белков – белков, играющих важную роль в регуляции протеостаза. Потенциальная роль белков семейства HSP70 в регуляции биогенеза митохондрий скелетных мышц была оценена при сопоставлении экспрессии митохондриальных белков в мышцах плодовых мух с нокаутом 6 генов из семейства HSP70 и контрольной линии w1118. Содержание митохондрий и работоспособность (скорость передвижения по вертикальной стенке) у мутантов были значительно ниже, чем у контроля. Таким образом, увеличение содержание митохондриальных белков в скелетных мышцах не регулируется на уровне мРНК и, по-видимому, зависит от скорости их синтеза и деградации. Последнее частично может быть связано с функциями белков теплового шока. *Работа поддержана грантом РНФ № 21-15-00405.*

ОЦЕНКА РАЗНИЦЫ ПРОТЕОМОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЭНДОГЕННЫМИ ПСИХИЧЕСКИМИ РАССТРОЙСТВАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОГРАММЫ MAXQUANT

А.А. Серегин, Л.П. Смирнова, Е.М. Дмитриева, Г.Г. Симуткин, А.В. Семке, С.А. Иванова

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, НИИ психического здоровья, Томск

Протеомные методы становятся все более популярными при исследовании психических расстройств, несмотря на трудоемкость и большие массивы данных. Современные методы биоинформатики позволяют успешно справляться с обработкой данных масс-спектрометрии, наиболее популярным программным пакетом для этих целей является MaxQuant. В работе представлены результаты сравнения протеомов сыворотки крови больных шизофренией и биполярным аффективным расстройством (БАР) с помощью программы MaxQuant.

В работе проанализировали по 10 образцов сыворотки крови больных БАР, шизофренией и здоровых лиц. Сыворотку очищали от мажорных белков аффинной хроматографией и разделяли 1D электрофорезом по методу Леммли, после трипсинолиза

пептиды анализировали с помощью ВЭЖХ/масс-спектрометрии, на масс-спектрометре типа Orbitrap. Идентификация белков проводилась с помощью программы MaxQuant (версия 1.6.3.4), поисковой машины Andromeda и базы данных UniProtKB. Различия протеомов оценивались полуквантитативным анализом на основе средних интенсивностей ИВАQ с применением двустороннего t-теста. В каждой группе было идентифицировано более 1600 белков. Биоинформационный подход с использованием MaxQuant и дальнейшей оценкой нормализованных средних интенсивностей LFQ относительно исследуемых групп при помощи t-критерия позволил выявить уникальные белки, значительно отличающиеся в каждой группе: 27 белков в группе больных шизофренией, и 18 – для БАР. Выявлено, что белки, уникально характеризующие заболевание, отвечают за разные биологические процессы. Белки сыворотки крови больных шизофренией участвуют в иммунном ответе, регуляции метаболизма белков и нуклеиновых кислот, клеточной коммуникации и актин-зависимой передаче сигналов. Белки пациентов с БАР, участвуют в регуляции синтеза ДНК и клеточного цикла, дифференцировке нервных клеток-предшественников, развитии нейронов и олигодендроцитов, транспорте через клеточную мембрану и межклеточной коммуникации.

Выявленные различия протеомов больных БАР и шизофренией могут быть использованы для создания первой лабораторной панели биологических маркеров для дифференциальной диагностики этих расстройств. *Масс-спектрометрический анализ проводился на базе ЦКП «Протеом человека» ИБМХ г. Москва. Работа поддержана грантом РФФ № 18–15-00053 П.*

МИНОРНЫЕ БЕЛКИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ПРОСТОЙ И ПАРАНОИДНОЙ ШИЗОФРЕНИИ

Л.П. Смирнова¹, Е.М. Дмитриева¹, А.А. Серегин¹, А.В. Семке¹, В.Г. Згода², С.А. Иванова¹

¹НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН, Томск; ²НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Простая и параноидная формы шизофрении – наиболее часто встречаются в клинической психиатрической практике и характеризуются разной клинической симптоматикой. Сложности дифференциальной диагностики и лечения этих форм шизофрении основаны на недостаточном понимании их молекулярных механизмов патогенеза. Протеомные методы исследований помогут оценить вклад минорных белков в патогенетические особенности разных форм заболевания. В работе проанализирован протеомный спектр сыворотки крови 12 человек имевших диагноз параноидная шизофрения, 6 – простая шизофрения, 10 – здоровых лиц. Сыворотку очищали от мажорных белков аффинной хроматографией, разделяли 1D электрофорезом и после трипсинолиза пептиды анализировали с помощью ВЭЖХ/масс-спектрометрии на Orbitrap Q-exactive HF. Идентификацию белков проводили с использованием программного обеспечения Mascot Ver. 2.1, «Matrix Science». В результате качественного анализа у пациентов с параноидной шизофренией идентифицировано 58 специфических белков, у пациентов с простой шизофренией – 54 белка. При анализе функциональных свойств этих белков выявлены существенные различия. Для параноидной шизофрении характерны белки, отвечающие за инициацию процессов апоптоза и его регуляцию, в то время как для простой шизофрении – белки заключительной стадии апоптоза. Параноидная форма шизофрении характеризуется наличием белков отвечающих за повреждение ДНК, а простая – за процессы репарации ДНК. Кроме того, у больных параноидной шизофренией выявлены белки регулирующие посттрансляционную сборку и процессы трансляции. Для количественной масс-спектрометрии были выбраны минорные белки: MYT1, zNMDR1, ABL2, mGluR6, RIPK1 и DCLK1. Количество белка DCLK1, mGluR6, RIPK1 было значимо повышено у больных простой шизофренией в сравнении с контролем и параноидной шизофренией. Белки NMDZ1 и ABL2 показали достоверные количественные различия в группах сравнения контроль/параноидная шизофрения и контроль/простая шизофрения. Уровень MYT1 был достоверно снижен у больных параноидной шизофренией в сравнении с группой контроля. Эти данные создадут основу для первой панели биомаркеров психических расстройств. *Масс-спектрометрический анализ проводился на базе ЦКП «Протеом человека» ИБМХ г. Москва. Работа поддержана грантом РФФ № 18–15-00053 П.*

ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОМА И МЕТАБОЛОМА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ И ТКАНИ ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННОМ НЕОПЛАСТИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ

Н.Л. Стародубцева¹, В.В. Чаговец¹, А.Е. Бугрова^{1,2}, А.О. Токарева¹, А.С. Кононихин¹, С.В. Киндышева¹, Д.И. Атгоева¹, Н.М. Назарова¹, В.Е. Франкевич¹

¹НИИ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ; ²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Регистрируется рост числа случаев заболеваний шейки матки, ассоциированных с длительной персистенцией вируса папилломы человека (ВПЧ), у женщин репродуктивного возраста. Целью данного исследования являлось определение динамических изменений белкового состава цервика-вагинальной жидкости (ЦВЖ), метаболома соскоба клеток эпителия шейки матки (ШМ) при диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки у пациенток репродуктивного возраста с «малыми» поражениями эпителия ШМ (ASCUS и LSIL). Определение особенностей белкового состава ЦВЖ и метаболома соскоба клеток эпителия ШМ 40 пациенток репродуктивного возраста трехкратно при динамическом наблюдении в течение года. Трипситические пептиды ЦВЖ были разделены методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (Agilent 1100, USA) с идентификацией методом тандемной МС (7-Tesla LTQ-FT Ultra mass spectrometer, Thermo Electron, Germany) в DDA моде. Липидомный анализ проводился методом масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией на масс-спектрометре Maxis Impact qTOF (Bruker Daltonics, Бремен, Германия) в режиме положительных в диапазоне m/z 400-1000. В результате протеомного анализа было детектировано более 400 различных белков ЦВЖ со значимым изменением уровня 44 белков во время наблюдения. Всего через 6 месяцев изменился уровень 17 различных белков, в том числе ANXA2, CSTA и SERPINB13. Уровень белков SOD1, CSTA, FGB, ENO1, BPI, BPIFB1, SERPINB13 значимо изменился в ходе всего динамического наблюдения. Уровень 34 белков ЦВЖ достоверно изменился спустя 12 месяцев после первого обращения. Обнаружено, что липиды, специфичные для злокачественной трансформации шейки матки, индуцируемой ВПЧ, в основном относятся к глицерофосфолипидам: фосфатидилхолинам и фосфатидилэтаноламинам. Разработана диагностическая модель PLS-DA на основе 23 маркерных ли-

пидов (фосфатидилхолинов, этаноламинов и плазмалогенов), уровень которых изменяется синхронно со степенью неопластической трансформации эпителия шейки матки. В ходе динамического наблюдения за пациентками с «малыми» поражениями эпителия ШМ показано, что протеомный состав ЦВЖ и липидом соскоба эпителия ШМ отражают динамику патологического процесса ШМ. *Работа выполнена в рамках гранта РФФ №18-75-10097.*

НЕЙРОННАЯ СЕТЬ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ НЕОТНЕСЁННЫХ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ДАННЫХ В ПРОТЕОМЕТАБОЛОМИКЕ

А.А. Степанов, А.Т. Копылов, Д.В. Петровский, В.Р. Руднев, К.А. Мальсагова, А.Л. Кайшева

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Протеомные (MASCOT, Andromeda, OMSSA и др.) и метаболомные (Scripps, AMDIS и др.) поисковые алгоритмы идентификации ограничены референтными библиотеками и, вследствие, этого теряется огромный массив данных (модифицированные белки, изоформы и шум). Минуя этап идентификации, можно значительно увеличить объём данных для задач классификации. Это позволяет успешнее кластеризовать объекты ценой информации о молекулярных категориальных предикторах. Одним из методов машинного обучения, способных решать задачи классификации на зашумлённых данных, является метод свёрточных нейронных сетей (СНС). Цель: создание нейронной сети для классификации пациентов с близкими и несвязанными по этиологии и патогенезу заболеваниями на примере различных онкофенотипов и шизофрении. Мы провели масс-спектрометрическое протео-метаболомное исследование пациентов с пятью различными видами рака (молочной железы, яичников, почек, толстой кишки и предстательной железы), из них три были квалифицированы как гендерно-специфичные, а также пациентов с шизофренией. Полученные данные были разделены на два набора – для обучения и валидации СНС, – без предварительной идентификации. Для анализа и классификации патологий была разработана нейронная сеть с архитектурой «остаточных свёрток» (1D-Residual CNN), входными данными для которой являлись непосредственно данные масс-спектрометрического сигнала. Отличительной особенностью глубоких свёрточных нейронных сетей является их способность принимать данные в исходном виде и преобразовывать их в карты признаков. В нашей реализации нейронной сети данные масс-спектрометрического сигнала в MGF-формате перед подачей на вход нейронной сети были минимально преобразованы (нормализация и фильтрация шума). Для данной сети были достигнуты следующие показатели классификации патологий (для пяти онкофенотипов, шизофрении и контрольного набора данных): достоверность (accuracy): 0.89 и отклик (recall): 0.87. Обученная нейросеть с высокой достоверностью различает шизофрению от онкопатологии, а также различные онкологические фенотипы между собой, используя на входе метаболомные и протеомные спектры плазмы крови пациентов. *Работа поддержана грантом РФФ № 19-14-00298.*

ПРЕДИКТИВНАЯ ОНКОПРОТЕОМИКА: МОДЕЛИРОВАНИЕ ОТВЕТА ГЛИБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРАПИЮ ОНКОЛИТИЧЕСКИМИ ВИРУСАМИ

А.В. Липатова¹, А.В. Соболева¹, В.А. Горшков², Ю.А. Бубис³, Е.М. Соловьева³, С.А. Мошковский^{4,5},

Франк Кьельсен², М.В. Горшков³, П.М. Чумаков¹, И.А. Тарасова³

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ²Университет Южной Дании, Оденсе, Дания;

³ Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, ФИЦ химической физики РАН им. Н.Н. Семёнова, Москва; ⁴ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва ⁵ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва

Разработка онколитических вирусов (ОВ) для терапии злокачественных заболеваний, в том числе, опухолей мозга, является активно развивающейся областью. У направления имеется ряд нерешенных задач, среди которых отмечают низкую эффективность препаратов, отсутствие моделей, позволяющих предсказывать терапевтический эффект, а также недостаточное понимание механизмов действия онколитических вирусов. Здесь мы обобщим результаты цикла омиксных исследований, в результате которых было охарактеризовано разнообразие дефектов противовирусных механизмов в клетках мультиформной глиобластомы (ГМ), в том числе, и в стволовых. Собранные коллекции данных на молекулярном уровне характеризуют способность клеток ГМ активировать JAK/STAT каскад в ответ на стимуляцию интерферонами I-го типа и демонстрирует как это свойство коррелирует с чувствительностью клеток к некоторым ОВ. Результатом стимуляции интерферонами является гиперэкспрессия десятков интерферон-регулируемых генов (ИРГ) и трансляция белков с противовирусными свойствами. Гиперэкспрессия ИРГ являлась частым и воспроизводимым маркером активности сигнального пути JAK/STAT в клетках ГМ, лишь в некоторых культурах и стволовых клетках ГМ такой ответ отсутствовал. Исследование влияния дефицита экспрессии ИРГ на чувствительность к некоторым вирусам показало, что подавление MX1 может способствовать увеличению чувствительности ГМ к вирусу болезни Ньюкасла (*in vitro*). В то же время, подавление PLSCR1, IFIT3 и некоторых других генов может вызывать обратный эффект и способствовать увеличению резистентности клеток к некоторым вирусам. Оказалось, что направленное подавление экспрессии отдельных ИРГ приводит к изменению регуляции белков, вовлеченных в клатрин-зависимый эндоцитоз, что в свою очередь может влиять на интернализацию вируса. При разработке панели предиктивных маркеров оценка чувствительности клеток к ОВ должна быть комплексной, и, в частности, помимо статуса интерфероновой системы, включать измерение эффективности проникновения и репликации вирусов в клетках. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-29-01059-МК).*

IN SITU ДИАГНОСТИКА НАРУШЕННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ГЛЮКОЗЕ С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТАБОЛОМНОЙ СИГНАТУРЫ

О.П. Трифонова, Д.Л. Маслов, Е.Е. Балашова, П.Г. Лохов

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Метаболомика стала одним из самых перспективных «omics» направлением с точки зрения внедрения полученных результатов в медицинскую практику. Изучение метаболома на глобальном уровне является быстро развивающейся областью научных исследований, которая в будущем может оказать большое влияние на медицину. Сегодня врачи используют лишь очень малую часть информации, содержащейся в метаболоме, поскольку регулярно измеряют только узкий набор веществ для оценки состояния организма. Ожидается, что “узкий спектр химических анализов, используемых сегодня медицинским сообществом, в будущем будет заменен анализами, способными давать более полную информацию о метаболоме. Эта так называемая метаболомная сигнатура будет описывать глобальные биохимические aberrации, отражающие паттерны изменений в здоровье, более точно описывать конкретные заболевания и их прогрессирование и значительно помогать в дифференциальной диагностике”. В метаболомике масс-спектрометрические методы используются для обнаружения большого количества низкомолекулярных веществ в одном анализе, что могло бы иметь прямое применение в диагностике заболеваний. Однако из-за сложности анализа поиск способа его упрощения при сохранении диагностических возможностей является актуальной задачей. Было предложено использовать метаболомную сигнатуру без сложной обработки данных (определение массы, выравнивание, нормализация, идентификация, сложный статистический анализ), чтобы сделать анализ более простым и быстрым. Данный подход был реализован с помощью неколичественного масс-спектрометрического анализа с использованием только соотношения пиков в масс-спектре без измерения концентраций. Подход был апробирован на диагностике нарушенной толерантности к глюкозе, и полученная метаболомная сигнатура продемонстрировала диагностическую точность, равную 88% (специфичность 85%, чувствительность 90% и площадь под ROC кривой 0,91), что считается хорошим показателем для диагностики. Таким образом можно составить метаболомные сигнатуры, позволяющие диагностировать заболевание *in situ*, то есть прямо на масс-спектрометре, и ускорить внедрение метаболомики в медицину. *Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы).*

АНАЛИЗ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ОТКРЫТЫХ РАМОК СЧИТЫВАНИЯ У РАСТЕНИЙ

И.А. Фесенко, А.Н. Князев, А.И. Глушкевич, А.С. Мамаева, И.С. Ляпина, Е.А. Петров, И.А. Седлов, В.Т. Иванов

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

Анализ протеомного ландшафта клетки зависит от корректного предсказания в геноме открытых рамок считывания, кодирующих функциональные белки или пептиды. При автоматической аннотации генома, кодирующие рамки должны удовлетворять следующим требованиям: 1) размер больше 100 кодонов; 2) одна кодирующая рамка на транскрипт; 3) стартовый кодон начинается с AUG. Таким образом, значительная часть функционального протеома клетки может быть не аннотирована. Действительно, в последние годы было показано существование функциональных альтернативных кодирующих рамок считывания (алтОРФ), расположенных на разных типах РНК, включая длинные некодирующие РНК (длнкРНК). Согласно современной классификации к альтернативным рамкам считывания могут относиться короткие открытые рамки считывания (кОРС, <100 aa) и транслирующиеся единицы свыше 30 aa, перекрывающиеся с белок-кодирующими регионами мРНК. Целью нашего исследования является системный анализ алтОРФ в геноме и протеоме растений. В качестве модельного объекта исследований был использован мох *Physcomitrella patens*. Альтернативные рамки считывания были предсказаны на транскриптах мРНК и длнкРНК, были изучены их консервативность, структурные особенности, а также проведена функциональная валидация отобранных пептидов/микробелков. Используя данные нанопорового секвенирования транскриптома были идентифицированы 41 189 транскриптов из 19 778 локусов. На этих транскриптах были предсказаны 39575 белков больше 100 aa. Кроме того, были предсказаны 184 366 алтОРФ, размером от 30 до 100 aa. Масс-спектрометрический анализ подтвердил трансляцию нескольких десятков таких рамок. Кроме того, нами были проанализированы кОРС, предсказанные на длинных некодирующих РНК. Около 16% этих кОРС имели ортологи как минимум в одном виде мха, а часть этих рамок подвергалась действию отрицательного отбора, что может говорить о их функциональности. Только 5% идентифицированных кОРС имели предсказанными домены, самым распространенным из которых являлся «consensus disorder prediction». Масс-спектрометрический анализ подтвердил трансляцию свыше 200 пептидов, кодируемых кОРС. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-14-01189.*

ПРОТЕОМИКА РАСТЕНИЙ – ОДИН ИЗ ВАЖНЕЙШИХ КОМПОНЕНТОВ ПОСТ-ГЕНОМНОЙ МАГИСТРАЛИ В БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

**А.А. Фролов,^{1,2} Т.Е. Билова,^{1,3} Т.С. Леонова,^{1,2} А. Ким,¹ Е.М. Лукашева,² Д.П. Горбач,² К.В. Данько,² Н.В. Фролова,³
Ю.С. Шумилина,^{1,2} Т.В. Мамонтова,^{1,2} А.А. Царев,^{1,2} К. Илинг,⁴ А. Зинц,⁴ Л.А. Вессёяханн¹**

¹Департамент биоорганической химии, Лейбниц-Институт биохимии растений, ²Кафедра биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, ³Кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербургский государственный университет, ⁴Департамент фармацевтической химии и биоаналитики, Институт фармации, Мартин-Лютер университет Галле-Виттенберг

Протеомика является универсальным инструментом изучения изменений в растительном организме, сопровождающих развитие, старение и ответ на стресс. В биологии растений протеомика является одним из основных компонентов пост-геномной магистрали, который органично дополняет данные транскриптомики и/или метаболомики. При этом, благодаря более высокой производительности, более полному покрытию протеома, лучшему аналитическому разрешению, bottom-up протеомика на основе жидкостной хромато-масс спектрометрии представляет собой золотой стандарт протеомного анализа. Поэтому, наши методологические подходы основаны на применении деградируемых детергентов и пробоподготовки на фильтрах (filter-assisted sample preparation, FASP), а стратегия количественного анализа, как правило, опирается на подходы без использования

метки (label-free quantification), с процессингом с помощью программного обеспечения Progenesis Q1 и MaxQuant, и пост-процессингом с использованием собственных скриптов.

Для обеих стратегий прободготовки была выполнена валидация в отношении полноты покрытия протеома и линейности количественного ответа. Это позволило нам охарактеризовать широкий спектр растительных протеомов – арабидопсис, ячмень, редис, горох, фасоль обыкновенная, а также мхи и водоросли. Для высших растений мы успешно оптимизировали схему анализа для листьев, семян, корней и корневых клубеньков бобовых растений. Не менее важным является факт успешного применения нашего пайплайна для анализа изменения протеома в ходе старения растений, развития корневых клубеньков, ответа растений на действие стрессоров – засуху, засоление, соли тяжелых металлов, азотного голодания, обработки гербицидами и других экологических факторов. Наконец, мы распространили наш подход на неферментативные посттрансляционные модификации – окисление и гликирование, уделив особое внимание их участию в механизмах регуляции и сигналинга в растениях. *Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2020-922 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».*

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ МЕТАБОЛОМИКА В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Ю.П. Центалович, О.А. Снытникова, В.В. Яньшол, Л.В. Яньшол, Е.А. Зеленцова

Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск

Метаболомика является одной из наиболее перспективных и быстро развивающихся отраслей современной биологии, метаболомный анализ находит все большее применение в медицине, системной биологии, биохимии, клеточной биологии. Анализ метаболомного состава различных видов тканей или клеток позволяет гораздо лучше понять как общие закономерности функционирования живых клеток, так и особенности, характерные для специфических типов клеток. Для биологии особый интерес вызывает метаболический ответ на воздействие разнообразных стрессоров, таких как окислительный стресс, ультрафиолетовое облучение, химические агенты. Особенно ярко достоинства метаболомного подхода проявляются при исследовании механизмов развития заболеваний: даже небольшие изменения в экспрессии регуляторных белков могут приводить к заметным изменениям в метаболомном составе как пораженной ткани, так и биологических жидкостей (кровь, моча). Наиболее информативным вариантом метаболомного анализа является количественный подход, позволяющий установить абсолютные значения концентраций широкого круга метаболитов в ткани или в клеточной культуре. Развиваемый в нашей лаборатории количественный подход к метаболомному анализу основан на совместном применении двух метаболомных платформ – высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и высокопольной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Этот подход был успешно применен для решения целого ряда задач биологии и медицины, включая установление механизмов развития катаракты и кератоконуса; установление интервала после смерти; установление изменений в метаболомном составе тканей животных, обусловленных сезонными изменениями параметров внешней среды (температура, содержание кислорода в воде), развитием заболеваний, применением лекарственных средств; установление различий между соматическими клетками (фибробласты), эмбриональными и индуцированными плюрипотентными клетками. *Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ проект 19-04-00092.*

АВТОТРОФНЫЙ РОСТ И ЕГО ГЕНОМНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ У THERMUS SP.18SP

Н.А. Черных, Т.Г. Соколова, И.В. Кубланов, А.В. Лебединский

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва

Представители рода *Thermus* известны молекулярным биологам как продуценты термостабильных полимераз Taq и Tth, совершивших революцию в молекулярной биологии и медицине. Члены этого рода широко распространены как в природе, так и в домашних нагревательных системах и известны как гетеротрофные организмы. Штамм *Thermus sp.18SP* первоначально был выделен на минеральной среде из природного термального источника о. Кунашир. В качестве источника углерода и энергетического субстрата использовалась окись углерода, акцептором электронов служил кислород. Последующее секвенирование и анализ генома показали, что у данного организма присутствуют ключевые детерминанты цикла Кальвина, а гены, ответственные за окисление окиси углерода (coxSML гены CO-дегидрогеназы) не обнаружались. Из литературных данных известно, что у некоторых штаммов *Thermus islandicus* кластер cox-генов находится в плазмиде. У нашего штамма *Thermus sp.18SP* также была обнаружена плаزمид, длиной 19528 п.о., но она не содержала cox-генов. По-видимому, причиной этого стало то, что ДНК для секвенирования генома была выделена из гетеротрофно выращенной биомассы. Однако наличие полного набора ферментов цикла Кальвина явилось стимулом для проведения экспериментов по выращиванию штамма *Thermus sp.18SP* в автотрофных условиях. Для этого на минеральной среде с тиосульфатом как источником энергии и кислородом, как акцептором электронов в присутствии бикарбоната в трех пересевах был убедительно показан автотрофный рост штамма *Thermus sp.18SP*. Филогенетический анализ ключевого фермента цикла Кальвина – рибулозобифосфат карбоксилазы показал, что этот фермент относится к первому типу (из известных четырех типов), характерному для высших растений и некоторых микроорганизмов. Таким образом, нам впервые удалось показать, что представитель рода *Thermus* способен расти автотрофно, используя при этом цикл Кальвина. Анализ геномов представителей рода *Thermus*, доступный в базах данных показал, что у 13 видов из 28 описанных имеются ферменты цикла Кальвина. По-видимому, и другие виды этого рода способны к автотрофному росту. *Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-54-12031 и частично профинансирована Министерством науки и высшего образования РФ.*

ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ И СИСТЕМО-КИБЕРНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ОМИК ОБЪЕКТОВ И ПРОЦЕССОВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

А.Г. Шлихт, Н.В. Краморенко

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

В задачах интерпретации состояния биохимических и физиологических объектов и процессов важную роль играют омикные данные (ОД) (ДНК, РНК, гены, транскрипты, белки, экзоны, метаболиты, ферменты, реакции, мутации и др.). Для использования информации накопленной в сфере ОД необходимы эффективные модели и структуры данных. Существующие хранилища ОД на базе международных порталов (NCBI, KEGG, Ensembl, UniProt и др.) не обеспечивают в должной мере автоматический анализ и интерпретацию ОД. Решающее значение здесь приобретают технологии искусственного интеллекта (ИИ) на основе баз данных (БД) и баз знаний (БЗ). Нами разработаны высокоструктурированные индексированные модели ОД на основе БД и БЗ, которые позволяют эффективно анализировать и интерпретировать ОД по метаболическим и сигнальным цепочкам и сетям. Метод базируется на реляционных моделях, которые позволяют проследить всю логику и семантику принятого решения (по аналогии с системой объяснения в экспертных системах). Таким образом, например, автоматически прослеживается вся цепочка событий: ДНК – мутация в нуклеотидной последовательности – мутация в аминокислотной последовательности белка – нарушения: пространственной структуры фермента; ферментативной реакции; метаболизма) – заболевание, как в прямую сторону, так и обратную. Более того, каждая стадия процесса сопровождается классической системно-кибернетической структурируемой моделью, в состав которой входят объект управления, информационно-измерительная система, система оценки текущего состояния объектов и процессов, блок сравнения с нормой и наконец, в контуре обратной связи, система поддержки принятия решений. ИИ позволяет перейти от больших количественных данных, к малым качественным данным, с которыми работает человек. Для ОД разработаны специальные интерпретаторы, которые в автоматическом режиме осуществляют поиск мотивов, промоторов, консервативных областей на основе регулярных реляционных структур. Созданные интеллектуальные системы нашли применение в задачах анализа и интерпретации ОД при онкозаболеваниях

[1] Naryzhny S., Volnitskiy A., Kopylov A., Zorina E., Kamyshinsky R., Bairamukov V., Garaeva L., Shlikht A., Shtam T. Proteome of Glioblastoma-Derived Exosomes as a Source of Biomarkers. *Biomedicines*, 2020, 8, 216. DOI:10.3390/biomedicines8070216

МОДУЛЯЦИЯ СТЕРОИДНЫМИ СУБСТРАТАМИ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ЦИТОХРОМ P450-ЗАВИСИМОЙ СИСТЕМЕ ЧЕЛОВЕКА

Е.О. Яблоков¹, Т.А. Сушко², Л.А. Калужский¹, А.А. Ковалевский³, Ю.В. Мезенцев¹, П.В. Ершов¹, А.А. Гилеп³, А.С. Иванов¹, Н.В. Струшкевич⁴

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; ²Отдел биоинженерии, Школа инженерии, Университет Токио, Япония; ³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; ⁴Сколковский институт науки и технологии, Москва

Синтез стероидных гормонов строго регулируется на разных уровнях, поскольку продуцируемые гормоны имеют решающее значение для поддержания физиологических функций организма. Ферменты, принадлежащие к суперсемейству цитохромов P450 (CYP), играют ключевую роль в биосинтезе стероидных гормонов надпочечников и функционируют в коротких цепях переноса электронов в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме. Однако, механизмы, регулирующие поставку восстанавливающих эквивалентов митохондриальной CYP-зависимой системе, полностью не изучены. В настоящей работе мы определили, как некоторые стероиды, субстраты, промежуточные продукты и продукты многоступенчатых реакций, модулируют белок-белковые взаимодействия между аденодоксином (Adx) и митохондриальными CYP11. Используя технологию поверхностного плазмонного резонанса (SPR), мы установили, что стероидные субстраты влияют на сродство и стабильность комплексов CYP11/Adx в изоформ-специфическом режиме. В частности, холестерин вызывает 4-кратное увеличение скорости образования комплекса CYP11A1/Adx (константа скорости образования комплекса (kon) увеличилась в 4 раза) без значительного влияния на диссоциацию (константа скорости диссоциации комплекса (koff) уменьшилась примерно в 1,5 раза), что в целом увеличивает сродство комплекса CYP11A1/Adx (равновесная константа диссоциации (Kd) снижается в 2,9 раза в присутствии холестерина). В то же время стероидные субстраты снижают сродство как комплексов CYP11B1/Adx, так и CYP11B2/Adx, преимущественно снижая их стабильность (увеличение koff в 4–7 раз). Наше наблюдение показывает дифференциацию регуляции белок-белковых взаимодействий внутри митохондриального пула CYP, которые получают электроны от одного донора – аденодоксина (Adx). Регулирование субстратами доставки электронов может повлиять на общую продукцию стероидных гормонов. Наши экспериментальные данные расширяют понимание механизмов регуляции белок-белковых взаимодействий внутри CYP-зависимых окислительно-восстановительных цепей, участвующих в стероидогенезе. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 – 2030 годы) и при поддержке гранта РФФИ №20-04-00014.

МЕТАБОЛОМИКА ТКАНЕЙ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

В.В. Яньшолё, Л.В. Яньшолё, Е.А. Зеленцова, А.Д. Мельников, Ю.П. Центалович

Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск

Метаболом тканей и жидкостей человека изучен довольно хорошо, чего нельзя сказать о тканях животных. Установление концентраций метаболитов в тканях животных и анализ влияния многих факторов на метаболизм, поможет прояснить механизмы эволюции биохимических процессов в тканях животных, обусловленной как общим развитием животного мира, так и адаптацией к конкретной среде обитания (в том числе к экологической обстановке). В настоящей работе методами высокопольного ЯМР и ВЭЖХ-МС высокого разрешения установлены концентрации наиболее распространённых метаболитов в ряде

различных тканей для нескольких видов пяти классов позвоночных животных (рыбы, земноводные, пресмыкающиеся, птицы и млекопитающие). Результаты опубликованы в открытом доступе в созданной в нашей лаборатории on-line базе данных Animal Metabolite DataBase (<http://amdb.online>) Для двух видов: *S. lucioperca* (Судак) и *R. rutilus lacustris* (Плотва) проанализировано сезонное изменение метаболитов в хрусталиках глаза, и обнаружено существенное изменение состава и концентраций ряда осмолитов и антиоксидантов. В нашей лаборатории впервые показано, что основным антиоксидантом хрусталика ряда рыб является овотиол А (OSH), который, как ранее считалось, присутствует только у ряда беспозвоночных животных. Концентрация этого соединения в хрусталике достигает нескольких микромолей на грамм ткани. Поскольку тиольная группа OSH в физиологических условиях находится в депротонированной форме (рКа=1.4), овотиол является гораздо более сильным антиоксидантом, чем другие тиолы, в частности, чем глутатион. Также, проанализировано содержание OSH в 10 тканях судака – жабры, сердце, печень, почки, селезенка, мышцы, мозг, молоко, хрусталик, водянистая влага и стекловидное тело глаза. OSH обнаружен почти во всех тканях судака, но его концентрация в других тканях значительно ниже, чем в хрусталике. Проведён анализ содержания метаболитов в хрусталиках для 14 видов птиц методом иерархической кластеризации. Полученное в результате дерево сравнено с классической систематикой и более современными методами филогенетики, и показано хорошее совпадение деревьев. Опубликованные в AMDB результаты могут быть использованы в широком спектре биологических отраслей, включая системную и эволюционную биологию, экологию, биохимию, ветеринарию и медицину. *Работа выполнена при поддержке РФФИ, номер гранта 18-29-13023.*

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Л.В. Яньшолё^{1,2}, В.В. Шерстюк², Е.А. Зеленцова¹, А.Д. Мельников¹, С.П. Медведев², С.М. Закиян², Ю.П. Центалович¹

¹Международный томографический центр СО РАН; ²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) — это специфические клетки, способные к самообновлению и дифференцировке во все типы клеток организма. Известны два основных типа ПСК – эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые получают из внутренней клеточной массы бластоцисты, и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), которые перепрограммируются из соматических клеток. ЭСК и ИПСК являются уникальными моделями для изучения раннего развития, клеточной дифференцировки, моделирования наследственных заболеваний и клеточной заместительной терапии. Метаболомные профили соматических клеток, эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) отражают их метаболические фенотипы. Сравнительный анализ метаболомных составов этих клеток существенен для понимания различий в метаболизме соматических и плюрипотентных клеток, а также возможных различий между ЭСК и ИПСК. В представленной работе впервые проведен количественный метаболомный анализ ЭСК, ИПСК и эмбриональных фибробластов (ЭФ) крыс. Исследование проведено с использованием ЯМР-спектроскопии и жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Всего было идентифицировано 106 метаболитов, концентрация определена для 51 соединения. Установлено, что перепрограммирование ЭФ в ИПСК влияет практически на все метаболические пути и вызывает резкие изменения метаболомного профиля клеток. Разница между ЭСК и ИПСК гораздо менее выражена: концентрации большинства метаболитов в ЭСК и ИПСК сходны, и значительные различия наблюдались только для нескольких соединений, включая аденозин, цистеиновую кислоту, глицерофосфоглицерин, инозитол-фосфат, глюкозу, миоинозитол, фосфосерин, кантозин, гуанозин. Наблюдаемые различия между метаболомными составами ЭСК и ИПСК не влияют на плюрипотентную способность ИПСК. *Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-75-20063.*

Стеновые доклады

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ЭКЗОГЕННЫХ ПЕПТИДОВ В ПЛАЗМЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА. ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ И ОРГАНИЗМОМ ЧЕЛОВЕКА

Г.П. Арапиди^{1,2,3}, А.С. Урбан^{1,2}, В.О. Шендер^{1,2}, И.О. Бутенко¹, О.Н. Букато¹, А.А. Кузнецов¹, О.М. Иванова¹, Л.В. Лопухов⁴, А.В. Лайков⁴, Н.И. Шарова⁵, М.Ф. Никонова⁵, А.Н. Митин⁵, А.И. Мартынов⁵, Т.В. Григорьева⁴, Е.Н. Ильина¹, В.Т. Иванов², В.М. Говорун¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ³Московский физико-технический институт (НИУ), Москва; ⁴Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ⁵ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва

Симбиоз между организмом человека и его микробиотой – важный вопрос современной биомедицины и персонализированной медицины, однако о молекулярных механизмах этой связи известно немного. Принимая во внимание повсеместное участие пептидов в биомолекулярных взаимодействиях и регуляторных процессах, мы предприняли попытку прямого поиска пептидов кровотока человека, происходящих из микробных белков. LC-MS/MS анализ образцов сыворотки и плазмы крови 20 здоровых доноров провели на масс-спектрометре Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap. Подготовку образцов провели на основе разработанного нами метода десорбции пептидов с поверхности основных белков плазмы крови. Для иденти-

фикации пептидов последовательности белков человека были взяты из базы знаний UniProt Knowledgebase, а последовательности белков микробиоты человека – из проекта NIH Human Microbiome Project. В результате из 13625 идентифицированных пептидов 912 это уникальные фрагменты белков микробиоты человека, что составляет около 6,69% от общего количества обнаруженных пептидов кровотока. В 30 случаях идентификацию пептидов микробиоты в кровотоке подтвердили масс-спектрометрическим анализом индивидуальных синтетических пептидов. Абсолютная количественная оценка с помощью масс-спектрометрического метода мониторинга множественных реакций подтвердила присутствие бактериальных пептидов в кровотоке человека в диапазоне приблизительно от 0,1 нМоль/л до 1 мкМоль/л, что сопоставимо с физиологически значимыми концентрациями гормонов в крови человека в норме. Анализ полученных *in silico* гидролизатов белков микробиоты показал, что значительное количество идентифицированных пептидов происходит из белков-предшественников в результате гидролиза трипсином, химотрипсином и пепсином, основными протеазами желудочно-кишечного тракта. 60% идентифицированных «бактериальных» пептидов происходят из кишечной флоры, около 20% – из микробиоты полости рта и 20% приходится на оставшиеся микробиотические сообщества. Изолированная фракция мононуклеаров периферической крови показала увеличение секреции провоспалительных цитокинов, колониестимулирующих факторов и хемоаттрактантов в ответ на добавление некоторых из идентифицированных пептидов микробиоты. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (20-15-00400).*

АСМ-ЧИПЫ С АКТИВИРОВАННОЙ ФОТОКРОСЛИНКОМ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ

А.А. Валуева, М.О. Ершова, Р.А. Галиуллин, Ю.Д. Иванов, А.И. Арчаков, Т.О. Плешакова

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Атомно-силовой микроскоп (АСМ) визуализирует белки на единичном уровне. Для АСМ-анализа необходимо иммобилизовать биомолекулы на поверхности чипов. АСМ-чипы с активированной поверхностью могут быть использованы для неспецифического вылавливания белков из биологической жидкости и решения задачи инвентаризации протеомного состава исследуемого образца. В этом случае необходима модификация (активация) поверхности с помощью сшивающих агентов – кросслинкеров. Показана возможность детекции преальбумина в 10^{-9} М буферном растворе с помощью чипов, активированных кросслинкером на основе бензофенона – N- сукцинимидилового эфира 4-бензоилбензойной кислоты (SuccBV), который является фотокросслинкером и реагирует с белками при УФ-облучении (от 350 до 370 нм) [1].

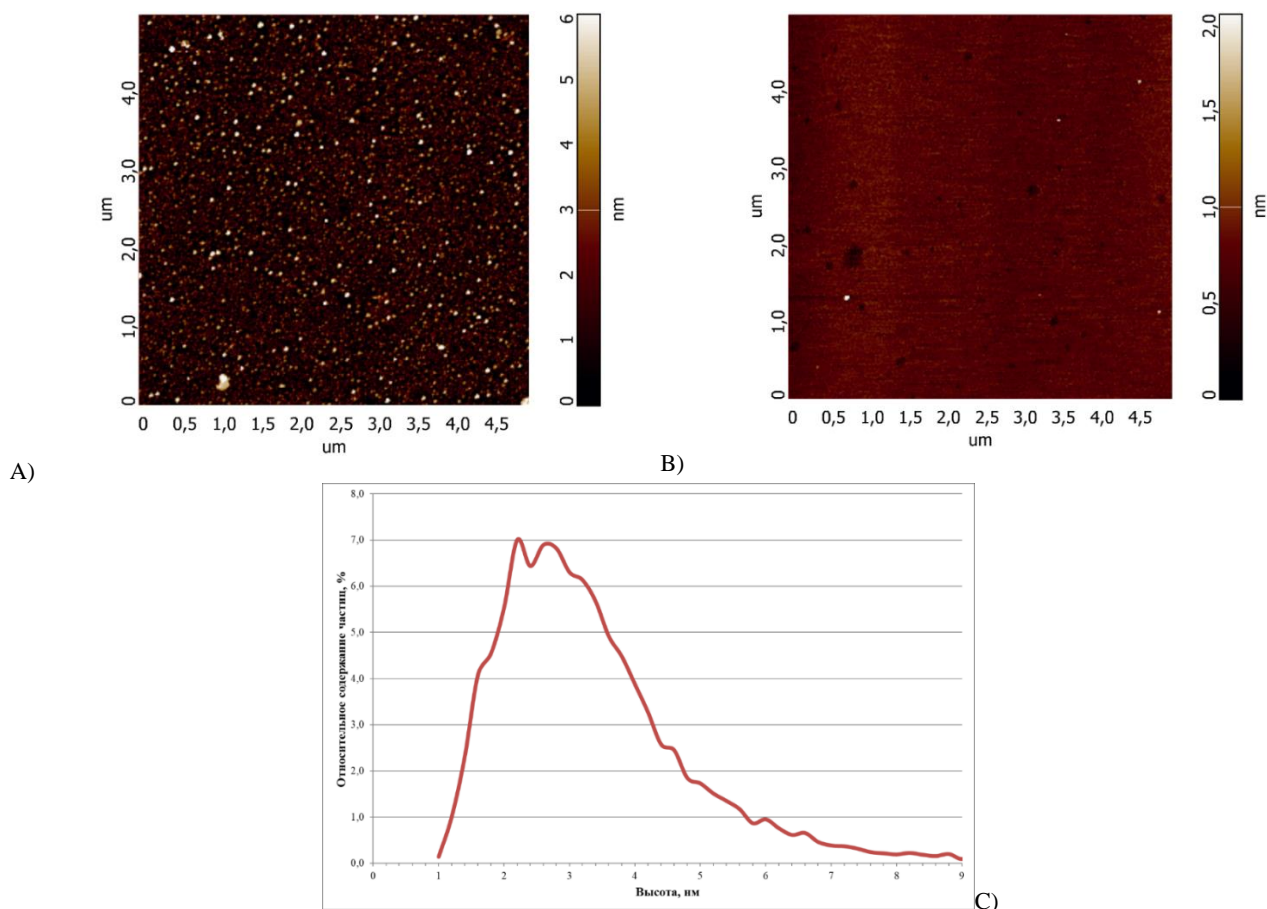


Рисунок 1. Типичные АСМ-изображения, полученные после инкубации чипа с активированной (А, опыт) и неактивированной (В, контроль) поверхностью в 10^{-9} М растворе преальбумина. (С) результат обработки данных сканирования – плотность распределения визуализированных объектов по высотам (опыт).

Как видно из рисунка 1 (А), в случае опыта на поверхности визуализируются компактные объекты с высотами от 2 до 7 нм, которые были отнесены к молекулам белка, так как в контроле подобные объекты не наблюдались. Обработка данных опыта (С) показала, что наибольший вклад в распределение вносят объекты с высотами от 2,2 нм до 2,6 нм. Количество визуализированных объектов, приведенное на площадь 400 мкм², в опыте составило 4697 объектов, в то время как в контроле 115 объектов (сопоставимо с уровнем шума). Полученные данные свидетельствуют об эффективности вылавливания преальбумина на поверхность АСМ-чипа, активированную фотокрослинкером. *Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы). Измерения проводились на оборудовании УНУ «Авогадро».*

1. Sumranjit J., Chung S. J. //Molecules. – 2013. – Vol. 18. – №. 9. – P. 10425-10451.

РОЛЬ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОМНОЙ ДНК В ОБРАЗОВАНИИ КОЛОНИЙ *MYCOPLASMA HUMANI* РАЗНЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ФОРМ

Д.В. Евсютина, Т.А. Семашко, М.А. Галямина, В.Г. Ладыгина, К.М. Климина, О.В. Побегутц

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Патогенные бактерии сталкиваются с резкими изменениями условий, когда попадают внутрь организма хозяина. Известно, что бактериальные популяции самопроизвольно дифференцируются в различные фенотипические состояния. Одним из возможных естественных механизмов выживания бактерий является образование мини-колоний (Small Colony Variants – SCV). Хорошо изученные SCV золотистого стафилококка устойчивы к антибиотикам, вызывают слабый иммунный ответ у хозяина, имеют изменённый метаболизм. Для *Mycoplasma hominis* – условного патогена человека – описана способность формировать SCV. Целью нашей работы было выяснить, какие изменения на геномном уровне происходят в лабораторном штамме *M. hominis* при переходе из состояния, в котором большинство клеток популяции образуют колонии классического типа, в состояние с преобладанием SCV. Для этого были подобраны условия для получения классических колоний и SCV *M. hominis*, выделена геномная ДНК и подготовлены библиотеки для секвенирования на приборе MiSeq (Illumina). Результаты секвенирования позволили нам провести качественную *de novo* сборку генома *M. hominis*, формирующих классический тип колоний. Поиск однонуклеотидных полиморфизмов между геномами двух форм *M. hominis* показал, что помимо синонимичных замен, существуют не синонимичные мутации в генах, кодирующих липопротейн семейства P80, β -субъединицу РНК-полимеразы и пиримидин-нуклеозид фосфорилазу. Влияние этих замен на функции соответствующих белков предстоит выяснить. Проведя поиск ортологичных генов у референсного штамма *M. hominis* ATCC23114, мы обнаружили существенные отличия. Так, анализируемый нами штамм содержал на 55 открытых рамок считывания больше, чем штамм *M. hominis* ATCC23114, 5 из них принадлежат системам рестрикции-модификации. Мы показали, что эти гены вероятнее всего расположены в геномной ДНК, а не локализованы на плазмиде. Проведенный анализ геномных последовательностей между геномами двух форм *M. hominis* не выявил различий, которые могли бы объяснить генетическую детерминированность SCV.

ПРОТЕОМНЫЕ И МЕТАБОЛОМНЫЕ ПРОФИЛИ КЛЕТочНОЙ ЛИНИИ HepG2: АНАЛИЗ В ДИНАМИКЕ

О.И. Киселева, И.Ю. Курбатов, В.А. Арзумян, Е.В. Ильгисонис, И.В. Вахрушев, Е.В. Поверенная,

Е.А. Пономаренко

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

На уровне протеома и метаболома осуществляется большинство судьбоносных решений в жизни клетки. Однако методы, используемые для характеристики статуса клеток и поиска потенциальных маркерных молекул, по-прежнему в своей массе ориентированы на анализ некоего «стационарного» состояния. Такой анализ во многом ограничивается геномной директивой и не отражает изменения, развивающиеся в ответ на внешние воздействия или в соответствии со сменой стадии клеточного цикла. В этой работе мы проанализировали динамику скоординированного изменения протеомных и метаболомных профилей клеточной линии гепатобластомы HepG2 на разных этапах ее клеточного цикла. Мы использовали панорамные методы протеомного (LC-MS/MS, Dionex Ultimate 300 / Thermo Fisher Orbitrap Fusion) и метаболомного (GC×GC/MS, LECO Pegasus 4D VT) профилирования клеток HepG2, проанализировав таким образом белковую и низкомолекулярную фракции в пяти временных точках. Особое внимание мы обращали на «молекулярные» черты, традиционные приписываемые раковым клеткам, и мониторировали изменение содержания молекул, отражающих процессы синтеза аминокислот и нуклеотидов, гликолиза, окислительного фосфорилирования, апоптоза и проч.

Проведенное исследование позволило оценить вариабельность белкового и метаболитного профилей клеточной линии, часто используемой в качестве доклинической модели гепатобластомы, выявив факторы влияния на воспроизводимость технических и биологических повторений. Мы полагаем, что полученные данные позволят повысить экспериментальную прозрачность мультиомных тестов, тем самым укрепив достоверность фундаментальных исследований молекулярных механизмов, реализующихся в клетках линии HepG2, равно как и практических работ по созданию диагностических и лекарственных инструментов, которые могли бы эффективно использоваться в терапии гепатобластомы. *Выполнение работы профинансировано грантом РНФ «Изменение мультиома опухолевой линии клеток печени при геном нокауте» (соглашение 20-14-00328).*

ПРОТЕОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИЧИН УХУДШЕНИЯ КАЧЕСТВА МЯСНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Л.И. Ковалев¹, М.А. Ковалева¹, И. А. Каменихина¹, И.М. Чернуха²

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва

В последние годы существенно возросла доля животных, поступающих на переработку из промышленных комплексов, у которых после убоя в мышечной ткани обнаруживаются значительные отклонения в скорости и характере развития автолитических процессов, что в итоге отражается на качестве и выходе готовой продукции. Производство свинины составляет в РФ около 4 млн тонн и, соответственно, имеются серьезные экономические потери. Образцы с высоким конечным (DFD) или низким (PSE) pH относятся к мясу с пороками качества. По ряду регионов России и Белоруссии количество свинины с признаками DFD и PSE может достигать до 50–80% от общего количества поступающего на переработку сырья. Предполагается, что причинами этого процесса в созревшем мясе являются изменения количества гликогена или его структуры, количества АТФ, условий откорма, состояние животного, генетических факторов, устойчивости животного к стрессу и многих других причин. Проведенное исследование образцов мышечных тканей свинины серии DFD и PSE показало, что в ряде случаев одним из существенных факторов является именно генетический компонент, который отражается на структуре миозинового комплекса, изменениях выработки АТФ и гликогена. В норме состав основных компонентов миозинового комплекса представлен продуктами генов тяжелых и легких цепей миозина в формате (MYH1, MYH4, MYH7, MYL3, MYL6 и MYLPF), относящихся к быстрым типам мышечных волокон. В типичном он изменен на другое сочетание (MYH1, MYH7, MYL2, MYL3, MYL6B), где преобладает медленный тип. Формируется аномальный тип мышечных волокон гибридного типа из медленных и сердечных изоформ. Кроме этого, выявлено резкое падение количества гликогенфосфориллазы (ген PYGM), в которой обнаружена и аминокислотная замена 742V-I/L, что не может не привести к изменению ее функциональных свойств. Также существенно уменьшилось количество АТФ/АДФ трансферазы 1 (SLC25A4) и ендолазы 3 (ENO3), фермента этапа гликолиза, где также выявлена аминокислотная замена 325 L/P. Необходимо дальнейшее изучение верифицированных пород и породосочетаний домашней свиньи на наличие подобных мутаций для исключения их из промышленного производства, что будет способствовать улучшению качества и функционально-технологических свойств мясного сырья и увеличению объема полезной продукции.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКОПЛАЗМЫ С КЛЕТКОЙ ХОЗЯИНА НА ТРАНСКРИПЦИОННОМ УРОВНЕ

Л.Н. Пенкин, Д.С. Матюшкина, Д.М. Фёдоров

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Из-за небольшого размера генома бактерии рода *Mycoplasma* могут служить моделью для минимальной клетки. Классический способ изучения микоплазмы как минимальной клетки – использовать различные модели возмущений. Одной из наиболее интересных моделей для изучения микоплазм является модель внутриклеточного паразитизма, изучение которой позволит сделать выводы о возможностях и принципах минимального строения клетки. Целью нашей работы было изучение механизмов адаптации и регуляции *Mycoplasma gallisepticum* на транскрипционном уровне при внутриклеточной инфекции. Заражение было инициировано совместным культивированием клеток HD3 с культурой *M. gallisepticum* S6 и последующим извлечением от внеклеточных микоплазм обработкой гентамицином. Затем внутриклеточные микоплазмы высвобождали путем лизиса эукариот и культивировали в течение нескольких пассажей, после чего выделяли РНК и готовили библиотеки для секвенирования, которое выполняли на приборе HiSeq 2500 (Illumina). Масштабных изменений в экспрессии генов относительно контрольной культуры, культивированной на богатой среде, выявлено не было. Только ген семейства липопротеинов и гемагглютининов (VlhA) показал 4-кратное увеличение экспрессии. Ранее белки семейства VlhA описывались как важные для микоплазм в патогенезе и уходе от иммунного ответа. Изменения в экспрессии других генов указывают на то, что инвазия является стрессом для патогена – экспрессия других переменных генов (10) подавлена. Ранее мы изучили изменение протеомного профиля *M. gallisepticum* на той же модели и обнаружили значительные изменения в протеоме микоплазмы. Наблюдаемые различия в адаптации микоплазм к внутриклеточной среде на уровне мРНК и белков указывают на альтернативный способ регуляции ответа на стресс в минимальной клетке. Работа поддержана грантом РФФИ № 191500427.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА MEIS В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ СЕРДЦА

Е.С. Зубкова, Е.В. Парфенова, Д.Н. Пеньков

НМИЦ кардиологии, Москва

Для усовершенствования метода прямого репрограммирования клеток в кардиомиоциты необходимо понимание механизмов дифференцировки этих клеток в процессе эмбриогенеза. К настоящему времени установлен целый ряд факторов и сигнальных молекул, участвующих в кардиомиоцитарной дифференцировке. Однако, в большинстве случаев непосредственный механизм их действия остается невыясненным. Это отчасти связано со сложной пространственной организацией хроматина, образованием многофакторных комплексов и отсутствием соответствующей клеточной модели для изучения. Анализ сайтов связывания кардиомиоцит-специфичного фактора Tbx5 показал их очень высокое сходство с ДНК сайтами транскрипционных факторов из группы TALE (Prer, Meis, Pbx). В данной работе методом ChIP-seq нами исследовалось возможное участие факторов Prer и Meis в совместном с Tbx5 связывании с ДНК на стадии эмбрионального развития сердца мыши. Установлено, что фактор Meis связывается с ДНК в области регуляторных элементов кардиомиоцит-специфичных генов, разделяя это свойство с фактором Tbx5. Фактор Prer1 обладает меньшей специфичностью к связыванию с кардиомиоцит-специфичными генами, что согласуется с установленным ранее свойством Prer регулировать базовые биохимические процессы клетки. Таким образом, нами показана возможная совместная с Tbx5 роль Meis в эмбриональном развитии сердца.

НОВЫЕ ТАКСОНЫ БАКТЕРИОФАГОВ МОГУТ БЫТЬ ВЫЯВЛЕНЫ ПРИ АНАЛИЗЕ ПЛАЗМИД *BACILLUS CEREUS* Э.Г. Пилигримова¹, О.А. Казанцева¹, А.Н. Казанцев², Н.А. Никулин¹, А.В. Скорынина¹, О.Н. Копосова¹, А.М. Шадрин¹

¹Лаборатория биологии вирусов бактерий, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН; ²Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Пушинская радиоастрономическая обсерватория, Пушино

Бактериофаги (фаги) – это вирусы бактерий. Фаги обладают разными стратегиями жизненного цикла: они могут реплицировать свою ДНК и собирать фаговые частицы вскоре после попадания в хозяйскую клетку (литический цикл), либо интегрировать свою ДНК в геном хозяина (лизогенный цикл, интегрированные профаги) или реплицироваться в виде кольцевой или линейной плазмиды в цитоплазме хозяина (лизогенный цикл, плазмидные профаги). Профаги могут сохраняться в популяции хозяина в течение нескольких поколений, а затем переключаться на литический цикл (индукция профага). Биологически активные профаги (те, которые сохранили способность к индукции и продукции функциональных фаговых частиц) могут дегенерировать (мутировать) до неактивных форм, неспособных к размножению из-за мутаций в ключевых генах.

Известно более 20 бактериофагов, которые на стадии профага существуют в форме кольцевых плазмид. Наиболее известный – профаг P1, заражающий *E. coli*. Поскольку секвенирование геномов становится доступнее, таких фагов находят все чаще, и это явление получает признание как еще одна вариация лизогенного цикла. Эти фаги обладают общими характеристиками – белками, обеспечивающими внехромосомную репликацию. Пример таких белков – две сайт-специфичные рекомбиназы, XerC и XerD, которые, как полагают, участвуют в «распутывании» димерных форм профагов-плазмид до мономеров после репликации. Еще один пример – белки систем «plasmid partitioning», необходимые для перемещения реплицированных профагов-плазмид к противоположным полюсам клетки перед делением.

В настоящем исследовании мы провели анализ последовательностей плазмид бактерий группы *Bacillus cereus* на наличие ключевых белков, характерных для плазмидных профагов, и выявили геномы, которые с большой вероятностью могут принадлежать таким профагам. Всего было проанализировано 506 геномов, в 58 из них были найдены ключевые гены. Двадцать восемь геномов были классифицированы как предполагаемые плазмидные профаги. Среди идентифицированных геномов 23 оказались особенно интересны, поскольку филогенетически удалены от известных вирусов и друг от друга. После экспериментальной верификации эти фаги могут стать представителями 23 новых таксонов уровня как минимум рода.

БЕЛОК ANKRD12 – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР ПРОСТОЙ ШИЗОФРЕНИИ

Е.М. Дмитриева, А.А. Сергеев, О.В. Тихонова, А.В. Семке, Л.П. Смирнова

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, НИИ психического здоровья, Томск

Простая шизофрения – тяжелое психическое расстройство, клиническая картина которого заключается в нарастающих эмоционально-волевых изменениях, которые приводят к грубой психопатизации личности, являясь причиной аддиктивного, делинквентного поведения. Простая форма шизофрении плохо поддается терапии, практически не дает ремиссии и приводит к инвалидизации пациента в трудоспособном возрасте. Маркеры и патологически значимые белки, для данной формы не исследовались. В исследование было включено 40 пациентов с диагнозами простая и параноидная шизофрения и 24 здоровых донора. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием Q-exactive HF масс-спектрометра (Thermo Fisher Scientific). Белки идентифицировали путем использования программного обеспечения Mascot Ver. 2.1 (www.matrixscience.com, «Matrix Science»). Количественную оценку белка Ankyrin repeat domain-containing protein 12 (ANKRD12) проводили набором ELISA Kit (Cloud-Clone Corp., USA). Для статистической обработки использовали пакет «STATISTICA» 10.0 и статистическую среду R (<http://www.r-project.org>). Достоверность различий оценивалась с использованием критерия Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни и критерия Фишера с поправкой Йетса. Корреляционный анализ проводился с расчетом коэффициента ранговой корреляции по Спирмену. В результате протеомных исследований сыворотки крови больных простой формой шизофрении был выявлен 12-й белок, содержащий анкириновые повторы. ANKRD12 выступает в качестве корепрессора, который может блокировать лиганд-зависимую транскрипцию путем антагонистической функции коактиватора через HDAC. Как известно, HDAC вовлечены в основные патогенетические механизмы психических расстройств. Вероятно, опосредованная повышенная экспрессия HDAC может являться причиной тяжелых когнитивных нарушений и негативной симптоматики. В результате количественной оценки было выявлено значимое повышение уровня ANKRD12 у больных простой шизофренией по сравнению с уровнем у больных параноидной шизофренией ($p=0,0007$) и у здоровых лиц ($p=0,04$). Таким образом, ANKRD12 может представлять собой лабораторный маркер для пациентов с простой формой шизофрении. Масс-спектрометрический анализ проводился на базе ЦКП «Протеом человека» ИБМХ, г. Москва. Работа поддержана грантом РНФ № 18–15–00053.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ β -ЛИТИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ *LYSOBACTER CAPSICI*

М.А. Константинов¹, А.С. Афошин², И.В. Кудрякова², Н.В. Васильева², И.Ю. Торопыгин¹

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; ²ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушино

В своей хозяйственной деятельности человек использует ферменты более девяти тысяч лет. Но и на сегодняшний день они остаются наиболее востребованными продуктами биотехнологии – выделяются, изучаются и создаются (например, путем направленной эволюции) новые ферменты. Для эффективного использования желательного или необходимо знать механизмы функционирования и специфичность ферментов. В представленной работе исследована молекулярная специфичность β -литической металлопротеазы *Lysobacter capsici*. Впервые эта эндопептидаза была выделена более 50 лет назад, и было принято считать, что в белках она гидролизует связи Gly-X. В нашем исследовании с использованием β -литической металлопротеазы проведен гидролиз группы белков и с помощью масс-спектрометрического анализа идентифицированы полученные продукты. Было показано, что помимо ранее связей Gly-X, β -литическая протеаза эффективно гидролизует связи Lys-X и Ala-X. При

этом также наблюдается незначительный гидролиз связей Ser-X и His-X Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы. Масс-спектрометрические работы выполнены с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» в ИБМХ.

МЕХАНИЗМ ВАРИАбельНОСТИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЕМАГГЛЮТИНИНОВ У *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*

Г.Ю. Фисунов, Д.В. Евсютина, Т.А. Семашко, Е.А. Цой

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Большинство бактерий класса Молликут, в частности, микоплазмы являются паразитами или комменсалами многоклеточных организмов. Вследствие этого микоплазмы обладают широким репертуаром поверхностных белков, участвующих в адгезии к клеткам хозяина или проникновении в них. Поскольку белки адгезии являются одновременно мажорными, поверхностными и жизненно-важными для микоплазм, они представляют отличную мишень для иммунного ответа хозяина. Вследствие этого у микоплазм развились механизмы вариабельности поверхностных белков. Все изученные на данный момент механизмы вариабельности поверхностных белков микоплазм основаны на активации и репрессии кодирующих их генов путём случайных генетических перестроек, таких как: инверсия промоторов и кодирующих частей генов, рекомбинация между кодирующими частями генов, случайное изменение числа повторов в кодирующих частях генов. Ранее для *M. gallisepticum* был описан механизм активации и инактивации генов поверхностных гемагглютининов vIhA с помощью случайных вариаций числа GAA-повторов в их промоторах. В настоящей работе мы впервые продемонстрировали неслучайное переключение гемагглютининов VhA у *M. gallisepticum* при обработке антителами против VhA. Для этого была разработана модель иммунного ответа хозяина. Клетки пассировались на среде с антителами против текущего мажорного гемагглютинина. В процессе пассирования отбирались образцы для проведения геномного и транскриптомного анализа. Также была проведена идентификация белков, распознающих GAA-повторы методом аффинной хроматографии. Методом нативного электрофореза комплексов мембранных белков были найдены их белковые партнёры в мембране. Были идентифицированы функционально-важные элементы промотора vIhA и влияние числа GAA-повторов на его активность. В результате мы показали, что очерёдность переключения генов гемагглютининов определяется числом GAA-повторов в их промоторах. Также мы показали, что ген, рецептор иммунной атаки и гемагглютинин составляют единый трансмембранный комплекс.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕМЯН ГОРОХА В УСЛОВИЯХ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ

М.А. Черевацкая, Н.В. Фролова, Э.В. Кисель, Т.С. Леонова, А.В. Соболева, Д.П. Горбач, М.В. Вихнина, С.С. Медведев, В.А. Жуков, Г.Н. Смоликова, Т.Е. Билова, А.А. Фролов

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербург

Важным свойством семян сельскохозяйственных растений является способность сохранять питательную ценность в течение нескольких лет. Тем не менее, долговременное хранение семян сопровождается постепенным накоплением структурных и метаболических повреждений, приводящих к старению семян и к снижению их посевных и пищевых качеств. Скорость процесса старения семян определяется генотипом растений, но в большей степени зависит от внешних условий, таких как влажность и температура воздуха. Низкая влажность и температура являются условиями успешного хранения семян. Оценить масштабность процесса старения семян позволяет метод ускоренного старения семян, при котором семена подвергают повышенной температуре и влажности. Стареющие семена в этих условиях быстро теряют всхожесть. В данной работе мы изучали метаболические изменения семян гороха в условиях ускоренного старения с целью выявления метаболических маркеров сортов гороха, ассоциированных с продолжительным сроком хранения. Для этого было проведено комплексное изучение метаболома контрольных и подверженных ускоренному старению (45°C, влажность 86%, 24 ч) семян гороха сортов Rondo и Скиф, включающее анализ первичных и вторичных метаболитов методами газовой и высокоэффективной жидкостной обращённо-фазовой и ион-парной хромато-масс-спектрометрии. Было выявлено более высокое качество семян Скиф по сравнению с сортом Rondo. Так, в отличие от семян Скиф под влиянием ускоренного старения у сорта Rondo резко снижалась всхожесть семян, большинство проросших семян развивали аномальные проростки. Метаболомный анализ показал, что условия ускоренного старения, по-разному изменяли метаболитный состав семян. Сходным изменением для обоих сортов было накопление сахароспиртов, сахаров, карбоновых кислот и аминокислот, однако состав накапливаемых соединений был разным. В условиях ускоренного старения в семенах Rondo и Скиф наблюдались противоположные изменения уровней вторичных метаболитов: в семенах Rondo уровни многих вторичных метаболитов снижались, тогда, как в семенах Скиф больше было выявлено вторичных метаболитов, уровни содержания которых возрастали.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-316-80052 с использованием РЦ Научного парка СПбГУ «Развитие клеточных и молекулярных технологий» и «Криогенный отдел».

МЕЖКЛЕТочНАЯ КОММУНИКАЦИЯ, ОПОСРЕДОВАННАЯ КОМПОНЕНТАМИ СПЛАЙСОСОМЫ: РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКА

В.О. Шендер^{1,2,3}, П.В. Шнайдер^{1,2}, К.С. Ануфриева^{1,2}, О.М. Иванова^{1,2}, И.К. Мальянц², Г.П. Арапиди^{1,2,3}, М.А. Лагарькова^{1,2}, В.М. Говорун²

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

В процессе лечения наблюдается быстрая эволюция злокачественных опухолей, сопровождающаяся адаптацией опухолевых клеток к лечебному воздействию. Ранее мы показали, что опухолевые клетки, погибающие под действием химиотерапии (ХТ) как в условиях *ex vivo* (асцитные жидкости пациентов), так и *in vitro* (кондиционные среды), секретируют во внеклеточное

пространство белки сплайсосомы [1]. Такие секретомы от погибающих клеток многократно повышали устойчивость реципиентных клеток к последующей ХТ.

Чтобы исследовать, какие параметры, запускаемые внешними стимулами, приводят к изменению фенотипа опухолевых клеток на более агрессивный, было проведено транскриптомное секвенирование трех типов образцов: (I) клеток, выделенных из пациентов до и после ХТ, (II) клеток, обработанных асцитными жидкостями до и после ХТ, а также (III) клеток рака яичников SKOV3, инкубированных с кондиционными средами, полученными до и после обработки цисплатином *in vitro*. Сравнение профилей экспрессии показало, что во всех трех моделях секретомы после ХТ индуцировали активацию эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) и сигнального пути MYC. Мы подтвердили, что секретомы от погибающих клеток вызывают мезенхимальную трансформацию с помощью биологических тестов, а также с помощью биоинформатического метода, позволяющего проследить за уровнем прогрессии EMT. Сравнение альтернативного сплайсинга показало, что общими для всех трёх моделей являются изменения сплайсинга генов, вовлеченных в сплайсинг мРНК, сборку реснички, хромосомную сегрегацию, а также репарацию ДНК. Известно, что изменение структуры ресничек может служить индуктором EMT, также было показано, что изменения сплайсинга мРНК являются одним из главных событий, опосредующих приобретение клетками мезенхимального фенотипа. Наконец, известно, что для мезенхимальных клеток характерна повышенная способность к репарации ДНК. Таким образом, мы предполагаем, что циркулирующие во внеклеточном пространстве факторы сплайсинга могут «подготовить» интактные опухолевые клетки к последующему лекарственному воздействию. Знания об этих механизмах могут быть полезны для разработки новых подходов комбинированной ХТ в сочетании с традиционными препаратами.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-10123.

1. Anufrieva K.S. et al.// *Genome Med*, 2018.

АНАЛИЗ СОСУЩЕСТВОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *ROTHIA AMARAE* С КЛЕТКАМИ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ *ARABIDOPSIS THALIANA*

А.О. Соколов, О.И. Соколов, А.А. Галицкая, Л.А. Дыкман

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

Впервые из суспензионной культуры клеток *Arabidopsis thaliana* (Heunh.) были выделены и идентифицированы бактерии, длительное время латентно сосуществующие с растительными клетками. По итогам предварительного таксономического анализа с применением технологии 16S рРНК было установлено, что последовательность гена 16S рРНК данного изолята с идентичностью 99,73% соответствует аналогичной последовательности штамма *Rothia amarae* J18, являющегося типовым для данного вида. Это дало основания причислить изолят к виду *Rothia amarae* и присвоить ему штаммовое наименование *Rothia amarae Saratov*. Были подобраны условия культивирования (на кровяном агаре и триптон-соевом бульоне), позволяющие сохранять морфологические и иммунохимические свойства изолята. Определена чувствительность данного штамма к антибиотикам. Показано, что наибольшую чувствительность бактериальные клетки проявляют к рифамицину, цефлоситину, тетрациклину и азитромицину. Относительно слабое действие показали левометицин и пенициллин. Получены поликлональные кроличьи антитела к клеткам бактерий *R. amarae Saratov*, выращенных в чистой культуре на синтетической питательной среде. Методом дот-анализа показана высокая чувствительность полученных антител. Установлено, что бактерии, выросшие на кровяном агаре и полученные непосредственно из живой суспензионной культуры клеток арабидопсиса, являются морфологически и иммунохимически идентичными. С помощью полученных антител иммуноцитохимическими методами с применением конфокальной микроскопии продемонстрировано присутствие и определена локализация бактерий *R. amarae Saratov* в клетках суспензионной культуры *A. thaliana*. Таким образом, не исключено, что выделенный нами штамм *R. amarae Saratov* может выступать в роли эндосимбионта суспензионной культуры *A. thaliana*.

Конкурс молодых ученых

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ СПЛАЙСИНГОВЫХ ФАКТОРОВ ПРИ ПОМОЩИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

К.С. Ануфриева^{1,2,3}, В.О. Шендер^{1,2,4}, Г.П. Арапиди^{1,2,3,4}

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Московский физико-технический институт (НИУ); ⁴Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Альтернативный сплайсинг мРНК представляет собой механизм обеспечения протеомного и транскриптомного разнообразия в эукариотических клетках. В опухолевых клетках этот механизм способствует развитию и прогрессированию опухоли за счет появления онко-специфичных изоформ и уменьшения количества копий белок-кодирующих изоформ. Изучение регуляции альтернативного сплайсинга поможет разработке новых персонализированных подходов для лечения онкологических заболеваний. Сплайсинговые факторы играют существенную роль в регуляции альтернативного сплайсинга. Они контролируют выбор сайта сплайсинга, посредством распознавания определенных участков пре-мРНК. То есть именно сплайсинговые факторы определяют, какие участки должны включиться в конечный транскрипт зрелой мРНК. Используя данные секвенирования мРНК 10 тыс. пациентов из проекта TCGA, мы построили различные модели машинного обучения для предсказания изменений альтернативного сплайсинга на основании изменений экспрессии сплайсинговых факторов. Наши вычислительные

эксперименты показали, что модель XGBoost обладает значительно более низкими значениями абсолютной ошибки, чем модели KNN, Lasso, Ridge. На основании построенной модели мы определили сплайсинговые события, ассоциированные с плохим прогнозом, для каждого типа опухоли из проекта TCGA. Также мы предложили список сплайсинговых регуляторов, ассоциированных с aberrантным альтернативным сплайсингом для каждого типа рака из проекта TCGA. Построенная модель была валидирована при помощи данных eCLIP и shRNA секвенирования консорциума ENCODE. В своей предыдущей работе мы показали, что различные типы химиотерапевтических препаратов приводят к одинаковым изменениям в альтернативном сплайсинге. Более того, удержания интрона в сплайсинговых факторах оказались наиболее частым событием альтернативного сплайсинга после воздействия различных типов химиотерапии. На основании построенной модели мы показали, что эти сплайсинговые события задействованы в петлях авторегуляторной обратной связи. Сплайсинговые факторы связываются со своей пре-мРНК и способствуют удержанию интронов в конечной транскрипте. *Работа поддержана Грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.*

ОЦЕНКА ГЕТЕРОГЕННОСТИ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТЧНОЙ ЛИНИИ HepG2 НА ОСНОВЕ ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ

В.А. Арзуманян, М.А. Пятницкий, Е.В. Поверенная

Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Считается, что клеточные линии имеют воспроизводимый молекулярный профиль, что позволяет сопоставлять полученные на конкретных линиях результаты. Молекулярные профили клеточной линии воспроизводимы и уникальны. Несмотря на заявленную молекулярную «стабильность» клеточных линий, недавнее широкомасштабное исследование линии HeLa показало, что клеточные линии одного типа могут существенно различаться между собой по геномному и транскриптомному профилю (Liu Y. et al, 2019).

Опухолевая клеточная линия HepG2 часто используется в качестве модели для исследования метаболизма лекарств, раковых процессов и др. Таким образом, для корректного использования этой клеточной линии необходимо проверить ее гетерогенность на различных молекулярных уровнях. Целью данного исследования является оценить воспроизводимость транскриптомного профиля опухолевой клеточной линии HepG2.

Для исходной клеточной линии HepG2 было проведено секвенирование с помощью технологий Illumina и Oxford Nanopore в трех и пяти технических повторах. Было показано, что данные, полученные с помощью этих технологий, имеют высокую степень корреляции по уровню геномной экспрессии ($R^2=0,82$). Тем не менее, технические повторы, выполненные с использованием Oxford Nanopore, отличаются меньшей воспроизводимостью ($R^2=0,85$), чем в случае использования Illumina ($R^2=0,96$). Полученные образцы также были проанализированы на предмет транскриптов, образованных в результате несинонимичных однонуклеотидных замен и альтернативного сплайсинга. Суммарно было выявлено 4506 мутаций и 84105 сплайс-вариантов, при этом, в силу особенностей технологий, пересечение между результатами для разных платформ составило 30% и 63%.

Дополнительно был проведен сравнительный анализ собственных результатов секвенирования клеточной линии HepG2 и данных для этой клеточной линии, депонированных в репозиторий SRA NCBI, полученных технологиями Illumina (25 образцов). Было выявлено высокое значение корреляции по уровню геномной экспрессии. Анализ транскрибируемых мутаций и сплайс-вариантов показал высокую гетерогенность.

Таким образом, наблюдаемая гетерогенность клеток HepG2 должна быть учтена при проведении протеоеномных и протеотранскриптомных исследований. *Данная работа выполнена в рамках гранта РНФ № 20-14-00328.*

ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИОННОГО ПРОФИЛЯ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАКА ЯИЧНИКА

Р.А. Власенкова, Д.Н. Конышева, Р.Г. Киямова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Выявление новых молекулярных маркеров важно для прецизионной диагностики и терапии онкологических заболеваний. Раково-тестикулярные антигены (РТА) – это группа белков, экспрессия которых ограничена мужскими зародышевыми клетками, однако при раке эти антигены начинают экспрессироваться опухолевыми клетками, что делает их потенциальными опухолевыми маркерами. Открытые базы данных, включающие в себя результаты больших исследований являются бесценным источником для поиска новых опухолевых маркеров в том числе, среди РТА. Целью данного исследования является характеристика мутационного профиля раково-тестикулярных антигенов в качестве потенциальных прогностических маркеров рака яичников на основе исследований из открытых баз данных. Нами были собраны данные 19981 образцов в 5 исследованиях рака яичника из трех баз данных (cBioPortal, TCGA; cBioPortal, Genie; ICGC). На основе собранных данных был проведен анализ мутационного профиля 31 раково-тестикулярных антигена, а также зависимость продолжительности жизни пациентов от наличия мутаций в антигенах. В общей сложности выявлено 8090 мутаций в 31 раково-тестикулярном антигене. Среди них определены 417 функционально значимых миссенс-мутаций в 6 антигенах (ACRBP, AKAP3, GAGE1, KDM5B, PRAME, SSX4) с помощью 5 инструментов предсказания функциональной значимости мутаций – PROVEAN, SIFT, PolyPhen-2, FATHMM, Mutation Assessor. Продолжительность жизни пациентов достоверно ниже в исследованиях рака яичников при наличии мутации в следующих антигенах: ACRBP, AKAP3, CCT4, CT45A5, GAGE1, GAGE2A, KDM5B, MAGEA1, MAGEA10, MAGEA4, MAGEC1, PIWIL1, PIWIL2, PIWIL4, PRAME, SPA17 (оценка Каплана-Мейера, $p<0.05$). Таким образом, нами были найдены 417 функционально значимых мутаций в 6 раково-тестикулярных антигенах, и показана зависимость продолжительности жизни пациентов от наличия мутаций в 16 РТА. Среди них, антигены CCT4 и PIWIL4 являются новыми потенциальными маркерами рака яичника и требуют дальнейшего более углубленного изучения. *Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и при поддержке РНФ в рамках проекта № 20-14-00166.*

АНАЛИЗ ПРОТЕОМА БАКТЕРИИ *HELICOBACTER CINAEDI* И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕЁ ВЛИЯНИЯ НА РАЗВИТИЕ ПЕНИСТОГО ФЕНОТИПА У МАКРОФАГОВ

А.К. Воронина¹, Б.А. Ефимов⁴, М.В. Малахова¹, М.Е. Богомякова¹, П.В. Шнайдер¹, О.М. Иванова¹,
М.А. Лагарькова¹, В.О. Шендер^{1,2}, В.М. Говорун¹, Г.П. Арапиди^{1,2,3}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ³Московский физико-технический институт (НИУ); ⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва

Сердечно-сосудистые заболевания занимают первое место в структуре смертности как в развитых, так и в развивающихся странах. Среди заболеваний сердца и сосудов наибольший вклад в смертность вносит атеросклероз. Согласно липопротеидной теории патогенеза атеросклероз может быть индуцирован нерегулируемым захватом модифицированных липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и очень низкой плотности неповрежденным эндотелием стенки сосудов. Опубликован ряд исследований, согласно которым нарушение метаболизма ЛПНП в макрофагах может быть вызвано внутриклеточным патогеном, микроорганизмом *Helicobacter cinaedi*, однако роль *H. cinaedi* в развитии патологии окончательно не доказана [Khan et al. // *Microbiol Immunol*, 2012; Khan et al. // *Scientific Reports*, 2014]. *Helicobacter* – род спиралевидных грамотрицательных энтерогепатических бактерий, представители которого могут вызывать бактериемию у людей. Наиболее распространенным возбудителем данного заболевания является *H. cinaedi*. В опубликованных работах показано, что *H. cinaedi* при взаимодействии с макрофагами вызывает изменения в морфологии клеток (переход к так называемому «пенистому фенотипу», от английского «foam cells»). Целью нашего исследования является детальное изучение изменений, которые происходят на уровне белков после заражения макрофагов бактерией *H. cinaedi*. Поскольку на данный момент для *H. cinaedi* не опубликовано протеомных исследований, для достижения поставленной цели мы провели масс-спектрометрический анализ протеома *H. cinaedi* на Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. Отдельной проблемой при работе с *H. cinaedi* является подбор условий культивирования, поскольку данный микроорганизм характеризуется высокими требованиями к составу атмосферы. В ходе работы мы опробовали различные подходы к выращиванию бактерии на твердых и жидких средах и определили наиболее благоприятные для *H. cinaedi* составы среды и наиболее эффективные методы создания требуемой атмосферы. Для исследования влияния *H. cinaedi* на формирование «пенистого фенотипа» у макрофагов мы оптимизировали протоколы выращивания и окрашивания макрофагов, получаемых из мононуклеаров периферической крови. С помощью микроскопии мы подтвердили морфологические изменения макрофагов в результате взаимодействия их с бактериями *H. cinaedi*.

ADAR-ОПОСРЕДОВАННОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ РНК В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ГЛИОМЫ

А.О. Гончаров^{1,2}, А.А. Ключникова^{1,2}, А.С. Никитина¹, С.А. Мошковский^{1,2}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Посттранскрипционные модификации РНК вносят значительный вклад в развитие и прогрессирование онкологических заболеваний. Среди множества таких модификаций особое внимание уделяется редактированию РНК с заменой аденозина на инозин в клетках глиобластомы. В нашей работе мы проанализировали различные аспекты редактирования РНК, опосредованного аденозиндеаминазами ADAR, в различных клеточных линиях. Оценка экспрессии основных генов, ответственных за редактирование (ADAR1, ADARB1, ADARB2) и генов, вовлеченных в регуляцию редактирования (AIMP2, SRSF9) не выявило значительных различий в экспрессии ADAR1, ADARB1, AIMP2 и SRSF9 между клетками глиобластомы и остеосаркомы. Также, клетки похожим образом отвечают на обработку интерфероном I типа – индукция изоформы ADAR p150 не различается в линиях глиобластомы и остеосаркомы. При этом нам не удалось обнаружить экспрессию гена ADARB2 в клетках глиобластомы. Данный результат подтверждается исследованием, в котором показано отсутствие экспрессии ADARB2 в более чем 85% образцов глиобластом. Помимо оценки экспрессии отдельных участников каскада ADAR мы проанализировали общий уровень редактирования этого типа в транскриптах клеточных линий. Поскольку более 90% событий редактирования происходят в Alu-повторах, их анализ в данных высокопроизводительного секвенирования РНК позволяет количественно оценить уровень редактирования в масштабах транскриптома. Наиболее интересным результатом является то, что при одинаковом уровне экспрессии ферментов ADAR уровень редактирования Alu-повторов в клетках глиобластомы значительно выше.

ПРЕИМУЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ АЛГОРИТМОВ ДЕТЕКЦИИ CNV ПО ДАННЫМ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

В.Д. Гордеева¹, Е.И. Шарова¹, К.А. Бабалян¹, Г.П. Арапиди^{2,3,4}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Московский физико-технический институт (НИУ); ⁴Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Полноэкзомное секвенирование считается надежным и доступным подходом для поиска однонуклеотидных полиморфизмов и коротких инсерций/делетий. Однако эффективность применения данной технологии с целью идентификации более крупных геномных вариаций, таких как CNV, остается неясной. Ранние исследования возможностей существующих методов проводились на достаточно ограниченном наборе из 3-4 алгоритмов, кроме того, они использовали разные критерии для валидации. Учитывая несопоставимость полученных результатов, а также новые разработки в этой области, вопрос выбора наиболее оптимального алгоритма для детекции CNV до сих пор остается актуальным. В рамках этой работы мы провели сравнительный анализ 16 алгоритмов, для создания внутреннего стандарта на уровне экзонов были использованы общедоступные данные по исследованию CNV у эталонного образца NA12878. Мы показали, что алгоритмы неравнозначны – каждый из них имеет определенный диапазон детектируемых длин, а результаты предсказаний плохо согласуются между собой. Большинство алгоритмов ориентировано на поиск ограниченного числа CNV длиной от одного до семи экзонов, доля ложноположительных результатов не выше 50%. EXCAVATOR2, exomeCopy и FishingCNV способны идентифицировать широкий спектр

вариаций, однако показывают низкую точность. Ввиду разной направленности алгоритмов выбор наиболее подходящего стоит основывать на дизайне исследования и допустимых критериях точности идентификации. *Работа поддержана Грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.*

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ АНТИТЕЛО/АНТИГЕН НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА НА ПРИМЕРЕ ДЕТЕКЦИИ СА125

М.О. Ершова, А.А. Валуева, И.Д. Шумов, А.И. Арчаков, Ю.Д. Иванов, Т.О. Плешакова

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет исследовать комплексообразование на уровне единичных молекул. В работе проведена оценка константы диссоциации. Детектирован маркер рака яичников СА125 (антиген), в качестве зондов использованы анти-СА125, ковалентно иммобилизованные в виде отдельных молекул на поверхности чипа. Антитела наносились на поверхность АСМ-чипа с помощью автоматической системы раскапывания, площадь сенсорной зоны составила 0,02 мм². В процессе инкубации в 10⁻⁹М растворе антигена на поверхности формировались комплексы антитело/антиген. Типичные АСМ-изображения поверхности и результаты обработки данных приведены на рисунке 1. По данным сканирования, полученным в режиме счета отдельных молекул, определены характеристики антител на поверхности (3,618×10⁵ шт, высота от 1,2 нм до 3,6 нм) и комплексов антиген/антитело после инкубации (1,635×10⁴ шт., высота более 2,2 нм). На основе данных АСМ-анализа рассчитана константа диссоциации в штуках биомолекул по формуле:

$$K'_d = \frac{[Ab]*[Ag]}{[complex\ Ab/Ag]} = \frac{361800*10^{12}}{16350} = 2,21 * 10^{13} (шт.),$$

где [Ab] – количество молекул антител (шт.); [Ag] – количество молекул антигена (шт.), в избытке; [Ab/Ag] – количество комплексов антитело/антиген (шт.).

Если учесть, что объем реакции смеси составил 1 мл, то расчет константы диссоциации следующий:

$$K_d = \frac{K'_d}{N_A * V} = \frac{2,21*10^{13}}{6,02*10^{23}*10^{-3}} = 3,67 * 10^{-8} \text{ моль/л}$$

В работе [1] был произведен расчет константы диссоциации для пары антиСА125/СА125, которая составила 0,94±0,05×10⁻⁹М, что свидетельствует о достаточно высоком сродстве антител к антигену. Полученная нами величина K_d выше на порядок. Но согласно АСМ-данным, антиген находится в олигомерном состоянии, что, по-видимому, снижает эффективность связывания.

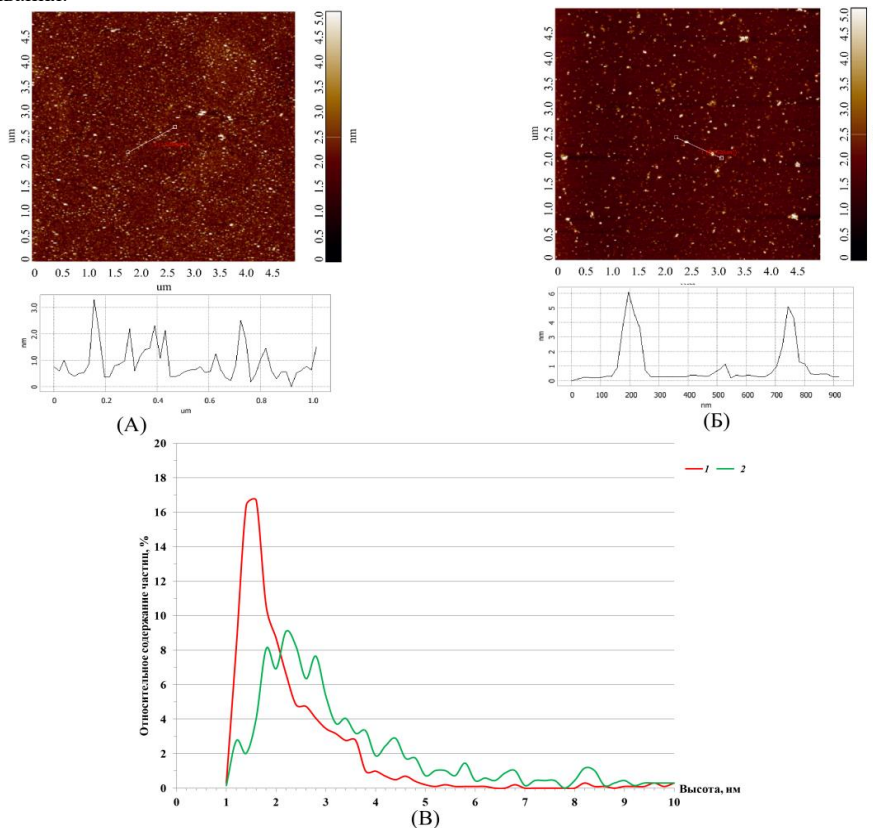


Рисунок 1. АСМ-изображения и соответствующие сечения иммобилизованных антител (А) и комплексов антитело/антиген СА125 (Б). График распределения высот (В), где красная линия соответствует распределению антител, а зеленая линия распределению комплексов антитело/антиген.

«Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы)». Измерения проводились на оборудовании УНУ «Авогадро».

1. Xie C. and etc. Study on homogeneous competitive immune reaction by fluorescence correlation spectroscopy: using synthetic peptide as antigen//*Talanta*, -2009, -Т.79, -N 3, -С.971-974.

ПОВЫШЕНИЕ ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ СПЛАЙСИНГОВЫХ ФАКТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ СПОСОБСТВУЕТ ИХ ВЫЖИВАНИЮ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ДНК

О.М. Иванова¹, Ж.Ж. Баймуханова², П.В. Шнайдер¹, К.С. Ануфриева¹, И.К. Мальянц², Г.П. Арапиди^{1,3}, М.А. Лагарькова¹, В.М. Говорун², В.О. Шендер^{1,3}

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

Клетки злокачественных опухолей находятся в постоянном динамичном общении друг с другом и со своим микроокружением. Ранее нами было показано, что в секретах от погибающих под действием химиотерапии (ХТ) опухолевых клеток повышена представленность различных белков сплайсосомы [1]. Такие секреты способствуют выживанию соседних опухолевых клеток, многократно повышая их устойчивость к последующей ХТ. Однако механизмы, лежащие в основе наблюдаемого биологического эффекта, не ясны. Их изучению посвящена данная работа. Помимо белков сплайсосомы в секретах, индуцированных терапией, также было обнаружено более 180 белков стрессовых гранул. Мы предположили, что сплайсинговые факторы (например, SR белки) могут секретироваться погибающими опухолевыми клетками как часть стрессовых гранул. Чтобы проверить эту гипотезу, мы котрансфицировали клетки SKOV3 плазмидами, кодирующими SR-белки и белки стрессовых гранул, меченные RFP и GFP, соответственно. После воздействия цисплатина обе группы белков перемещались из ядра в цитоплазму на ранних этапах апоптоза, до фрагментации ядра, и их локализация совпадала друг с другом. Затем мы показали присутствие SRSF4-RFP и TIA1-GFP, секретлируемых погибающими опухолевыми клетками, в реципиентных клетках с помощью флуоресцентной микроскопии. Такие реципиентные клетки имели большую устойчивость к цисплатину, причем нокаут белков стрессовых гранул отменял данный эффект. Вывод о том, что повышение представленности в опухолевых клетках ряда сплайсинговых факторов придает им большую устойчивость к цисплатину, подтверждается и на клеточных линиях SKOV3 со стабильной сверхэкспрессией этих белков. Анализ протеомов таких клеток после воздействия цисплатина показал, что в них эффективнее активируются пути, ответственные за репарацию ДНК. Таким образом, сплайсинговые факторы могут секретироваться погибающими опухолевыми клетками совместно со стрессовыми гранулами в составе внеклеточных везикул, проникать в реципиентные опухолевые клетки и приводить к формированию у них химиорезистентности. *Работа поддержана грантом РНФ № 19-75-10123 (молекулярное клонирование) и грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2019-1669 (LC-MS/MS анализ).*

1. Anufrieva KS et al.//*Genome Med*, 2018; Pavlyukov MS et al.//*Cancer Cell*, 2018

ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНЫХ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ РАКА

А.Н. Казакова^{1,2}, К.С. Ануфриева^{1,2,3}, О.М. Иванова^{1,3}, В.О. Шендер^{2,4}, П.В. Шнайдер^{1,3}, Ж.Ж. Баймуханова¹, А.В. Еремеев^{1,3}, Н.И. Дризе⁵, М.А. Лагарькова^{1,3}, Г.П. Арапиди^{2,3,4}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²Московский физико-технический институт (НИУ); ³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА; ⁴ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ⁵НМИЦ гематологии МЗ РФ, Москва

Опухоль-ассоциированные фибробласты (САФ) являются ключевыми компонентами стромального микроокружения опухолевых клеток и играют важную роль в стимуляции роста, инвазии и метастазировании опухоли. Однако ограничивающим фактором изучения опухоль-ассоциированных фибробластов является проблема их выявления среди всех клеток опухоли. Существующие гены-маркеры, с помощью которых в различных исследованиях выявляют САФ, активно экспрессируются и другими мезенхимальными клетками микроокружения опухоли, в том числе нормальными активированными фибробластами (NF). Мы проанализировали изменения транскрипции генов по данным секвенирования мРНК для 6 различных типов рака. Нами было обнаружено, что большинство существующих генов-маркеров для идентификации САФ также экспрессируются в NF местной соединительной ткани опухоли. По данным секвенирования мРНК был предложен список генов-маркеров, позволяющих отличить САФ от NF. Мы обнаружили, что найденные гены играют важную роль в процессах ремоделирования внеклеточного матрикса, активации тромбоцитов, регуляции различных сигнальных путей и гликозилирования белков. Затем мы изучили экспрессию выбранных генов в наборе данных секвенирования мРНК 936 раковых клеточных линий человека. Также, чтобы рассмотреть экспрессию найденных генов в клетках опухоли и ее микроокружения, мы проанализировали 13 общедоступных наборов данных секвенирования мРНК одиночных клеток опухоли для 9 различных типов рака. Чтобы агрегировать результаты 3 описанных выше анализов, мы ввели рейтинговую систему, которая учитывает все требования к потенциальным генам-маркерам САФ. В результате интеграции данных были обнаружены гены, которые наиболее специфично выявляют САФ среди всех клеток опухоли: OLFML1, ADH1B, MYH11, RSPO3, CCL11, DIO2, ABCA9, CDH6, CPXM2 и TBX2. С помощью количественного анализа методом ПЦР мы валидировали значимость изменения уровня экспрессии 4 выбранных нами генов-маркеров (ADH1B, MYH11, CCL11 и CDH6) в первичных культурах нормальных фибробластов и САФ, полученных из стромы нескольких типов опухолей: рак молочной железы, аденокарцинома яичника, доброкачественная опухоль яичника, диффузная В-крупноклеточная лимфома и рак мочевого пузыря. *Работа поддержана Грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.*

“ОМИКСНЫЕ” МАРКЕРЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК К СТРЕССУ

Е.М. Казакова¹, Е.М. Соловьева², М.В. Горшков^{1,2}, И.А. Тарасова²

¹Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный; ²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Талъерзе, ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

Клеточные модели продолжают оставаться важнейшими инструментами биологов при разработке новых препаратов в области медицины и биотехнологии. Так, комплексная оценка чувствительности злокачественных клеток к абиотическому стрессу, например, при обработке химиопрепаратами, представляет собой основу подбора персонализированной терапии для более эффективного лечения пациентов. При решении этих задач целесообразно определять панель маркеров, которые комплексно характеризуют свойства клеток *in vitro*: морфологические изменения, выживаемость, жизнеспособность, пролиферативные свойства и цитотоксичность. С развитием в последние годы методов ультракороткого панорамного протеомного анализа, имеющий спектр биотестов целесообразно дополнить количественной характеристикой чувствительности клеток к стрессу по совокупности молекулярных признаков, которая учитывает число дифференциально регулированных белков (ДРБ) и значимость наблюдаемых изменений относительных концентраций. Такая метрика должна количественно определять амплитуду молекулярного ответа по продуктам биохимических реакций, идентифицируемым методами хроматомасс-спектрометрии, избавляя исследователя от технических сложностей отбора ДРБ, и позволяя кластеризовать особенности клеточных моделей по типу нарушений в клетках. В данной работе, на примере восьми клеточных моделей, отличающихся экспериментальным дизайном, был разработан и апробирован метод отбора ДРБ на основе оценки плотности распределения кратных изменений концентрации и статистической значимости, а также оптимизированы критерии и стратегия замещения отсутствующих значений в количественных данных протеомного анализа. Показано, что предложенные подходы для работы с данными и отбора дифференциально регулированных признаков являются универсальными, могут быть приняты за основу при анализе хроматомасс-спектрометрических данных в количественной протеомике и позволяют кластеризовать культуры по типу клеток и особенностям их отклика. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-29-01059-МК).

ПРОГНОЗ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЛИГАНДАМИ НА ОСНОВЕ ХИМИЧЕСКИХ СТРУКТУР И АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Д.А. Карасев¹, Б.Н. Соболев¹, А.А. Лагунин^{1,2}, Д.А. Филимонов¹, В.В. Поройков¹

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Разработка лекарственных соединений – долгий и трудоемкий процесс. Компьютерные методы позволяют существенно снизить затраты при поиске соединений-кандидатов и идентификации их биологических мишеней. Компьютерный прогноз на основе структур химических соединений весьма эффективен, когда для белка-мишени уже установлен ряд лигандов. В случаях, когда осуществляется поиск лигандов для мишеней с неизвестным спектром лигандов, такой подход невозможен. Методы другой группы могут применяться только при наличии разрешенной трехмерной структуры мишени или ее качественной трехмерной модели. В то же время весьма актуальна задача выявления новых пар белок-мишень, которая должна решаться с привлечением больших объемов данных по аминокислотным последовательностям белков и химических структур. Нами разработан метод, который на основе указанных данных позволяет сделать прогноз для не аннотированных аминокислотных последовательностей белков и не охарактеризованных лигандов. Сопоставление химических структур лигандов производится с применением дескрипторов многоуровневых атомных окрестностей. Это позволяет рассчитать весовые коэффициенты, которые должны определять нечеткие классы лигандной специфичности белков, включающие как известные, так и новые соединения. Сопоставление аминокислотных последовательностей производится на основе поиска участков локального сходства. Тестируемая последовательность сравнивается с последовательностями обучающей выборки с учетом их принадлежности к прогнозируемому классу. Таким образом для каждой пары белок-лиганд рассчитывается вероятностная оценка их взаимодействия. Метод протестирован на различных группах белков-мишеней с различным уровнем филогенетического родства. Показана применимость метода к широкому кругу задач. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00374.

УРОВНИ микроРНК ПЛАЗМЫ КРОВИ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

И.С. Киселев¹, Н.М. Баулина¹, Г.Ж. Осмак¹, М.В. Писклова¹, О.С. Чумакова², Д.А. Затейщиков², О.О. Фаворова¹

¹НМИЦ кардиологии МЗ РФ; ²Центральная государственная медицинская академия УД Президента РФ, Москва

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – одна из наиболее распространенных наследственных патологий сердца, с фенотипически гетерогенными проявлениями: некоторые пациенты ведут нормальный образ жизни, в то время как у других развиваются кардиоэмболические инсульты, прогрессирующая сердечная недостаточность или внезапная смерть. МикроРНК – малые некодирующие РНК, способные посттранскрипционно подавлять экспрессию генов. Роль микроРНК в регуляции множества биологических процессов и относительная стабильность в плазме крови позволяют рассматривать эти молекулы как перспективные биомаркеры различных заболеваний. Мы определили относительные уровни микроРНК плазмы крови у 9 пациентов с ГКМП и у 6 здоровых индивидов с использованием высокопроизводительного секвенирования. Сравнение полученных профилей микроРНК в исследуемых группах позволило выявить 36 микроРНК, уровни которых отличались у пациентов и здоровых индивидов более чем в 2 раза ($p < 0.05$). Из их числа уровни 23 микроРНК у пациентов были снижены, а уровни 13 – повышены. После введения поправки на множественные сравнения, значимая ассоциация сохранялась только для miR-208b ($\log_{2}FC = -3,17$, $\text{padj} = 1,4 \times 10^{-5}$) и miR-499-5p ($\log_{2}FC = -3,84$, $\text{padj} = 0,043$), гены которых расположены в интронах ключевых генов, участвующих в развитии ГКМП, – генов тяжелых цепей миозина MYH7 и MYH7B. Далее пациенты с ГКМП были разделены на две группы в соответствии с тяжестью течения заболевания: индивиды с сердечной недостаточностью I и

II классов согласно классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA) составили группу легкой ГКМП (n=4), индивиды с сердечной недостаточностью III и IV классов и с обструкцией выводящего тракта левого желудочка – группу тяжелой ГКМП (n=5). Ожидаемо, что в обеих группах пациентов, независимо от формы ГКМП, выявлено снижение уровней miR-208b и miR-499-5p. Кроме того для обеих групп показано снижение уровня miR-454 и повышение уровня miR-339-5p. Специфичными только для легкой ГКМП оказались 11 микроРНК, а для тяжелой ГКМП – 28 микроРНК. Мы надеемся, что соответствующей валидации идентифицированные микроРНК могут выступить в качестве эффективных маркеров развития ГКМП и тяжести ее течения. *Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00353).*

ПЕРЕКОДИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В МЫШИНЫХ МОДЕЛЯХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВСЛЕДСТВИЕ РЕДАКТИРОВАНИЯ МАТРИЧНОЙ РНК АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗИ

А.А. Ключникова^{1,2}, А.О. Гончаров^{1,2}, С.Е. Новикова³, Т.Е. Фарафонова³, М.С. Кухарский^{2,4}, С.А. Мошковский^{1,2}
¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва; ³НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; ⁴Институт физиологически активных веществ, Черноголовка

Одним из источников вариантов аминокислотной последовательности является редактирование РНК – не до конца изученное явление посттранскрипционной модификации РНК, возникающее посредством ферментов семейства РНК-зависимых аденозиндезаминаз. Такое сайт-специфическое дезаминирование молекулы РНК с преобразованием аденозина в инозин приводит к образованию перекодированных продуктов, то есть белков с измененной аминокислотной последовательностью. В данной работе на трех линиях трансгенных мышей проанализировано влияние на степень перекодирования белков при таких состояниях, как FUS-опатия (отчасти моделирует нейродегенерацию, например, при боковом амиотрофическом склерозе), таупатия (гиперфосфорилирование белка тау, имитирующее признаки болезней Паркинсона, Пика и Альцгеймера), а также моделирующий психическое расстройство нокаут гена некодирующей РНК NEAT1. Разработан набор стандартов и методов для таргетного протеомного анализа MRM-SIS на приборе типа тройного квадруполя. Для каждого участка редактирования был создан пептидный стандарт с перекодированным остатком и стандарт “дикого типа”, с геномным вариантом. Набор был испытан на мозжечке и коре больших полушарий трех линий трансгенных мышей и контрольных линий. В результате были получены новые данные об отношении перекодированных и кодируемых в геноме участков на белковом уровне. Доля перекодирования варьировала от 100% перекодированных пептидов, например, для продуктов генов GRIA3 (глутаматный рецептор) и SYFIP2, до менее 10% для SOPA и CADPS (в мозжечке). Как оказалось, профиль перекодирования был совершенно одинаковым во всех трех линиях трансгенных мышей по сравнению с контролем. Таким образом, экспрессия генов FUS, tau и NEAT1 в головном мозге мышей никак не влияла на редактирование РНК, детектируемое на уровне протеома. Было показано, что профили перекодирования разных анализируемых сайтов воспроизводимо отличаются между корой головного мозга и мозжечком всех животных. *Работа поддержана грантом РФФИ № 20-15-00072.*

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЛИЦ С РАДИОЛОГИЧЕСКИ ИЗОЛИРОВАННЫМ СИНДРОМОМ – ВЕРОЯТНЫМ ПРЕДВЕСТНИКОМ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

М.С. Козин^{1,2}, Н.М. Баулина¹, А.Р. Кабаева², А.Н. Бойко^{1,2}, О.О. Фаворова¹, О.Г. Кулакова¹

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ; ²Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва

Рассеянный склероз (РС) – хроническое демиелинизирующее воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), одна из главных причин инвалидизации неврологического происхождения молодого трудоспособного населения. Широкое использование МРТ как метода диспансерного наблюдения привело к выявлению феномена, получившего название «радиологически изолированный синдром» (РИС), когда у пациентов выявляется типичная для РС пространственная диссеминация характерных очагов в ЦНС при отсутствии характерных для РС клинических симптомов. До настоящего времени остается неясным, является ли РИС начальной субклинической стадией патологического процесса, развивающегося при РС. В настоящей работе проведено сравнение транскрипционных профилей в мононуклеарных клетках периферической крови (МНК) у лиц с обнаруженным при МРТ РИС и у лиц без такового для выявления возможных молекулярных процессов, происходящих при РИС. Материалы и методы: в исследование включены 8 индивидов с РИС и 8 совпадающих по полу и возрасту индивидов без патологических изменений в веществе головного мозга (контроли) по данным МРТ. Тотальную РНК выделяли из МНК при помощи наборов RNeasy Mini Kit (Qiagen). Полнотранскриптомное профилирование проводили методом высокопроизводительного секвенирования РНК с использованием набора MGIEasy RNA Library Prep Set (MGI) на секвенаторе MGISEQ-200. Выравнивание прочтений на референсный геном проводили с помощью ПО STAR Version 2.7.6a. Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили при помощи пакета DESeq2 для языка R. Результаты: Сравнительный анализ транскриптомных профилей индивидов с РИС и контролей выявил 98 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ). Более 90 наборов из базы Gene ontology (GO) были значимо перепредставлены найденными ДЭГ. Наиболее существенные изменения при РИС происходят в путях, связанных с развитием иммунного ответа, цитокинового и хемокинового сигналинга и воспаления, включая миграцию лейкоцитов. Заключение: впервые показано, что профили экспрессии генов в МНК индивидов с РИС имеют принципиальные отличия от нормы. Полученные данные свидетельствуют о нарушениях ряда процессов в иммунной системе у индивидов с РИС в отсутствие клинических проявлений РС. *Работа подготовлена при финансовой поддержке РФФИ (проект №20-015-00073).*

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИММУНОАФФИННОГО ОБОГАЩЕНИЯ МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ БЕЛКОВ И ВЫДЕЛЕНИЯ НАТИВНЫХ ПРЕЗЕНТИРУЕМЫХ ПЕПТИДОВ-ЛИГАНДОВ ГКГС I ТИПА

А.А. Кузнецов¹, П.В. Шнайдер¹, М.Е. Богомякова¹, М.А. Лагарькова¹, В.М. Говорун¹, Г.П. Арапиди^{1,2,3}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный;

³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Онкологические заболевания занимают второе место в структуре смертности во всем мире. В качестве перспективной персонализированной терапии рака многие исследовательские группы рассматривают активно создаваемые сегодня противоопухолевые вакцины. Для обучения иммунной системы при подобной вакцинации могут быть использованы иммунопептиды, презентруемые на поверхности злокачественных клеток в составе главного комплекса гистосовместимости I класса (ГКГС I). Изучение иммунопептидома молекул ГКГС I опухолевых клеток – эффективный способ поиска биомаркеров злокачественных новообразований и мишеней для иммунотерапии рака. Различия множества существующих методов выделения и очистки ассоциированных с ГКГС I пептидов и отсутствие унифицированного научным сообществом протокола осложняют сопоставление результатов исследований иммунопептидома человека разных научных групп. Для поиска наиболее эффективной методики работы мы провели выделение молекул ГКГС I с пептидами-лигандами по самым распространенным опубликованным протоколам. Работу осуществляли на двух опухолевых клеточных линиях: Т-клеточной лейкемии Jurkat и В-клеточной лимфомы Raji. В качестве отрицательного контроля использовали линии клеток K562 и MDA-MB-231. Известно, что для аффинного выделения белковых комплексов крайне важно «мягко» лизировать клетки, чтобы не нарушить структуру комплексов. Поэтому в экспериментах варьировали методы лизиса клеток. Выделение проводили на магнитных частицах Pierce Protein A/G Magnetic Beads с ассоциированными антителами к ГКГС I. Для эффективного отделения пептидов-лигандов от ГКГС I мы также варьировали методы элюции. В результате LC-MS/MS анализа на Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer мы установили, что подход, совмещающий лизис клеток при помощи буфера состава 150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris-Cl, 1-х ингибиторы протеаз, pH 7.4 и элюцию буфером с 8M Мочевинной, 2M Тиомочевинной, 10mM Tris-HCl pH 9, показал наибольшее число идентифицируемых пептидов, потенциально ассоциированных с ГКГС I, и минимальное число пептидных и белковых контаминантов. Принадлежность идентифицированных пептидов к иммунопептидому проверяли при помощи сервиса NetMHCpan 4.1, способного предсказывать аффинность пептидов к аллелям молекул ГКГС I исследованных клеточных линий. Работа подготовлена при финансовой поддержке РНФ (№ 20-15-00400).

МИКРОБНЫЙ СОСТАВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ АНТРАЛЬНОГО ОТДЕЛА И ТЕЛА ЖЕЛУДКА: АНАЛИЗ НА ОСНОВЕ ДНК И РНК ПРОФИЛИРОВАНИЯ

Е.А. Куприянова, М.И. Маркелова, С.Ю. Маланин, С.Р. Абдулхаков, Т.В. Григорьева

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Существует мнение, что другие представители микробиоты желудка, помимо *H. pylori*, играют важную роль в патогенезе заболеваний верхних отделов ЖКТ. Однако этот вопрос по сей день остается малоизученным. При исследовании желудочной микрофлоры забор биопсийного материала обычно осуществляется из антрального отдела желудка, при этом не учитывается, что микробный состав разных отделов может сильно отличаться. Целью нашего исследования было охарактеризовать микробиоту слизистой оболочки желудка в образцах биопсии из антрального отдела и тела желудка. Для метагеномного анализа были получены 20 образцов биопсии слизистой оболочки от 10 пациентов – по одному образцу из антрального отдела и тела желудка соответственно. По результатам быстрого уреазного теста было выявлено 3 *H. pylori*-положительных и 7 *H. pylori*-отрицательных пациента. Из каждого образца была выделена тотальная ДНК и РНК, затем фракцию РНК использовали для синтеза кДНК. Для подготовки ДНК-библиотек проводили амплификацию V3-V4 варибельного участка гена 16S рРНК. Готовые библиотеки были просеквенированы на приборе MiSeq, Illumina. В случае *H. pylori*-положительных пациентов обнаружено значительное доминирование рода *Helicobacter* как на уровне ДНК, так и на уровне РНК. Также, обращает на себя внимание разница между бактериальным составом антрального отдела и тела желудка, что особенно примечательно для НР-положительных пациентов. Например, количество рода *Helicobacter* в образцах кДНК составляло 25, 35 и 36% при исследовании антрального отдела, и 87, 81 и 72% в теле желудка, что ставит под сомнение рациональность забора биопсии только из антрального отдела для подтверждения диагноза инфекции *H. pylori*. В *H. pylori*-отрицательных образцах наблюдалось преобладание родов *Streptococcus* и *Prevotella*. Бактерии родов *Lautropia*, *Enhydrobacter*, *Rikenellaceae*, *Acinetobacter*, *Leptotrichia* и *Carnosutorphaga* являлись уникальными только для образцов кДНК, вероятно, они отражают малочисленную часть желудочного бактериального сообщества. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания № 0671-2020-0058 в сфере научной деятельности.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ РЕАКЦИИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В ОТВЕТ НА ПРИСУТСТВИЕ АМИЛОДОГЕННЫХ ПЕПТИДОВ

С.Р. Курпе¹, С.Ю. Гришин¹, А.В. Глякина^{1,2}, М.В. Слизень¹, А.В. Панфилов¹, А.П. Кочетов³, А.К. Сурин^{3,4}, О.В. Галзитская^{1,5}

¹Институт белка РАН, Пушчино; ²Филиал Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, Пушчино;

³Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушчино; ⁴ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск; ⁵Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушчино

Насущной проблемой сегодняшнего дня становится уже не столько проявление мультирезистентности бактерий к антибиотикам, сколько распространение и сохранение механизмов устойчивости в природе. На фоне этого все большую угрозу для общественного здоровья несут патогенные организмы из группы ESKAPE: *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и другие бактерии. Развитие и распространение антибиотикорезистентности бактерий в популяции определяется сложным взаимодействием различных факторов. Скорость мутагенеза, адаптивность мутанта к биоцидам, сила

селективного давления – именно эти факторы позволяют охарактеризовать появление устойчивых штаммов бактерий. На первый взгляд, пептиды являются мощным средством для борьбы с патогенными организмами, однако, с другой стороны, способны стимулировать развитие резистентности. Для предупреждения появления новых антибиотико-резистентных мутантов, важно оценивать адаптивную способность патогенных бактерий к пептидам. Ранее нами и другими коллегами было показано, что амилоидогенные пептиды способны к проявлению антибактериальной активности. Амилоидогенные пептиды с антимикробной активностью могут стать новой стратегией для разработки антибиотиков против опасных патогенов. Для оценки комплекса ответных реакций *Pseudomonas aeruginosa* на присутствие в среде амилоидогенных пептидов мы исследовали протеом бактерий с применением масс-спектрометрии высокого разрешения (Orbitrap Elite ETD, Thermo Scientific, Германия). Протеомное профилирование бактерий позволяет оценивать стресс реакции в целом, что может помочь в выявлении молекулярных стратегий адаптации патогенов к неблагоприятным условиям и определении потенциальной опасности мутантных штаммов. Кроме того, этот подход уже используется для описания факторов вирулентности бактерий и выявления новых молекулярных мишеней для антибиотиков. В данной работе мы провели анализ белок-белковых взаимодействий, идентифицировали молекулярные функции, биологические процессы и метаболические пути определенных белков с помощью баз данных DAVID, KEGG, STRING. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-14-00321). Участие Курпе С.Р. в форуме было поддержано Фондом имени Геннадия Комиссарова.

СЕКРЕТОМНЫЙ АНАЛИЗ ШТАММА БАКТЕРИИ *T. TYROSINOSOLVENS* PS2 В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В.А. Романова, А.В. Лайков, Т.В. Григорьева

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Секретируемые в окружающую среду бактериями вещества включают в себя метаболиты, белки, которые могут проявлять биологическую активность. Существуют бактерии, утилизирующие углеводороды, которые продуцируют белки, обладающие поверхностно-активными свойствами. Подобные белки способствуют контакту между бактериальной клеткой и углеводородной молекулой. Протеомные подходы к выяснению секрета микроорганизма позволяют напрямую функционально характеризовать идентифицированные белки, тем самым понять физиологию и поведение бактерий. Целью данной работы является идентифицировать и описать внеклеточные секретируемые белки штамма *Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2, утилизирующего алканы. Методом масс-спектрометрии был получен тотальный секретом штамма PS2 на различных источниках углерода (сахароза, гексадекан). Всего было идентифицировано: 181 белок на среде с сахарозой, 157 белков на среде с гексадеканом. Полученный список белков секретом был расклассифицирован на основе базы данных COG по функциональным категориям. Большинство белков отвечали за транспорт и метаболизм аминокислот, углеводов, энергообразование, биогенез клеточной стенки, механизмы сигнальной трансдукции, трансляцию и посттрансляционные модификации. Значимую часть секретом (до 30%) составляли белки с неизвестной функцией, предположительно играющие важную роль в адаптации к различным источникам углерода, чью функцию еще предстоит определить. При сравнении источников углерода, на среде с гексадеканом наблюдали увеличение белков, ответственных за синтез и транспорт вторичных метаболитов, аминокислот, неорганических ионов и за энергообразование. На сахарозе увеличено количество белков, играющих роль в биогенезе клеточной стенки, сигнальной трансдукции и посттрансляционных модификациях. Таким образом, исследован секретом углеводородокисляющего штамма *T. tyrosinosolvans* PS2, состоящий из нескольких функциональных групп белков. Присутствующие в секретом биологически активные ферменты могут представлять ценность при создании биотехнологии с применением исследуемого штамма. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Номер проекта: 0671-2020-0058.

ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С ПНЕВМОНИЕЙ СРЕДНЕЙ ТЯЖЕСТИ, ВЫЗВАННОЙ COVID-19

А.М. Сенина¹, Д.Р. Хуснутдинова¹, М.И. Маркелова¹, Е.А. Булыгина¹, М.Н. Синягина¹, И.В. Григорьева²,

А.Р. Шархемуллина², Я.Р. Мангушева², Э.И. Мухаметшина², Т.В. Григорьева¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет; ²МСЧ Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань

Вирус SARS-CoV-2 вызывает тяжелое респираторное заболевание, получившее название COVID-19. Исследования показывают, что респираторные вирусные инфекции могут изменять состав сообщества микробиоты кишечника. В настоящем исследовании представлены данные сравнительного анализа пациентов с пневмонией средней тяжести (n=20, средний возраст 50±10), вызванной COVID-19, и здоровых добровольцев (n=33, средний возраст 30). Для анализа микробиоты выделяли ДНК из кала с использованием коммерческих наборов. Секвенирование библиотек по 16S рРНК проводили на платформе Illumina MiSeq. Достоверные отличия представленности таксонов между группами сравнения рассчитывали с помощью критерия Манна–Уитни. Индексы альфа-разнообразия были достоверно снижены в группе людей с заболеванием. У пациентов с COVID-19 статистически значимо (p<0,05) снижалась доля в сообществе неклассифицированных представителей порядка Clostridiales, семейств Coriobacteriaceae, Clostridiaceae, Lachnospiraceae, Peptostreptococcaceae, Ruminococcaceae, Mogibacteriaceae, Erysipelotrichaceae, родов Bifidobacterium, Lactococcus, Turicibacter, Anaerostipes, Blautia, Coprococcus, Dorea, Roseburia, Ruminococcus и видов *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Collinsella aerofaciens*, *Blautia producta*, *Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus torques*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus bromii*. Статистически значимо увеличивалась доля в сообществе неклассифицированных представителей семейств Rikenellaceae, Barnesiellaceae, Victivallaceae, родов Bacteroides, Prevotella, Butyrivibrio, Odoribacter, Sutterella, Klebsiella и видов *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides plebeius*, *Parabacteroides distasonis*, *Veillonella dispar*. Также у пациентов были идентифицированы вид *Prevotella stercorae*, и неклассифицированный вид рода CF231, которые не были обнаружены в образцах здоровых добровольцев. Таким образом, микробиота

кишечника пациентов с COVID-19 характеризуется пониженной представленностью пробиотических бактерий и продуцентов короткоцепочечных жирных кислот, тогда как доля условно-патогенных микроорганизмов в сообществе возрастает. *Исследование выполнено за счет средств, выделенных Казанского федерального университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности 0671-2020-0058.*

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ИЗОМЕРИЗАЦИИ АСПАРТАТА В БЕТА-АМИЛОИДНЫХ ПЕПТИДАХ ТКАНЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЕТОДАМИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

П.А. Стрельникова^{1,2}, А.Е. Бугрова¹, М.И. Индейкина¹, Н.В. Захарова¹, С.И. Пеков², И.А. Попов², А.С. Кононихин¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва; ²Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный

Болезнь Альцгеймера – нейродегенеративное заболевание, одним из характерных признаков которого является накопление в тканях головного мозга нерастворимых агрегатов бета-амилоидных пептидов. Существенное влияние на склонность β -амилоида ($\text{A}\beta$) к образованию нейротоксичных структур оказывают пост-трансляционные модификации пептида. Такой модификацией является изомеризация 7-ого аспартата, индуцирующая образование цинк-связанных олигомеров $\text{A}\beta$. Кроме того, в силу спонтанного неферментативного характера изомеризации, накопление модифицированных пептидов ассоциировано со старением, а также нарушением работы систем деградации белка. Целью настоящей работы является исследование профиля изомеризации $\text{A}\beta$, выделенного из тканей головного мозга трансгенных мышей различного возраста, с применением методов тандемной масс-спектрометрии (MALDI-TOF/TOF) и хромато-масс-спектрометрии с ионной подвижностью (nanoLC-TIMS-TOF). В качестве объекта исследования были выбраны трансгенные мыши FADx5, для которых характерно относительно раннее появление церебральных агрегатов $\text{A}\beta$ с последующим снижением когнитивных функций. Фракцию, содержащую $\text{A}\beta$, выделяли методом твердофазной экстракции из кислотного экстракта головного мозга модельных животных. Изомеризация вносит структурные изменения, но не влияет на массу молекулы, поэтому нельзя детектировать модифицированные формы путем измерения первичного масс-спектра. Для количественной оценки доли изомеризованных пептидов в исследуемой фракции был разработана методика, основанная на сравнении относительных интенсивностей «опорных» пиков в спектре фрагментации $\text{A}\beta$. Для анализа применялся метод MALDI-TOF масс-спектрометрии, спектры фрагментов целевого пептида получали в режиме диссоциации, индуцированной соударением. Эксперименты с использованием хромато-масс-спектрометрии и ионной подвижности проводились на масс-спектрометре TIMS-TOF Pro. В результате проделанной работы была получена оценка степени изомеризации пептидов в $\text{A}\beta$ -богатой фракции для выборки трансгенных мышей возрастом от 4 до 16 месяцев. Согласно полученным данным, доля изомеризованных пептидов в зависимости от возраста животного увеличивается (до 20%). Данный результат согласуется с представлениями о возможном накоплении модифицированных $\text{A}\beta$ -пептидов, сопряженном с развитием патологии.

TRIM29 РЕГУЛИРУЕТ ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ TP63 В БАЗАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Р.И. Султанов^{1,4}, А.С. Мулюкина², О.А. Зубкова¹, А.И. Федосеева², А.Н. Богомазова¹, К.С. Климина¹, А.К. Ларин¹, Е.И. Шарова², Э.В. Генерозов¹, М.А. Лагарькова², Г.П. Арапиди^{2,3,4}

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ⁴Московский физико-технический институт (НИУ), Москва

Регуляция развития базального эпителия – очень сложный процесс, который находится под контролем многих транскрипционных факторов. Один из самых известных – это TP63, транскрипционный фактор белкового семейства p53. Несмотря на длительную историю исследований TP63, его функции остаются не до конца изученными. В отличие от TP53 – TP63 обладает меньшей аффинностью к своему мотиву связывания с ДНК. Необходимая специфичность связывания с регуляторными элементами обеспечивается большим количеством белков-партнеров TP63. Часто, именно белки-партнеры определяют транскрипционную программу TP63. В этом исследовании мы определили новый белок-партнер TP63 – убиквитин лигазу TRIM29, принадлежащую семейству TRIM. Мы показали, что TRIM29 и TP63 не влияют на представленность друг друга в клетке. При этом TP63 и TRIM29 физически взаимодействуют друг с другом в нормальном базальном эпителии предстательной железы. Нокдаун TRIM29 приводит к значительному изменению экспрессии генов, которые находятся под регуляцией TP63. Именно гены, которые находятся под регуляцией этих двух белков, ассоциированы с эпителиальным фенотипом. Интересно, что только в присутствии TRIM29 TP63 активирует пути ответственные за формирование плотных контактов между клетками и их заякоривание в базальной мембране. Методом иммунопреципитации хроматина мы показали, что в присутствии TRIM29 количество регионов, с которыми связывается TP63 возрастает в 5 раз. Также значительно увеличивается связывание TP63 с промоторами и энхансерами генов, специфичных для базального эпителия. Для гена TP63 мы показали, что именно TRIM29 значительно повышает частоту взаимодействия промотора TP63 с его энхансерами. Однако, иммунопреципитация хроматина за TRIM29 не показала колокализации TP63 и TRIM29 на хроматине. В этой работе мы показали, что в базальном эпителии предстательной железы у TP63 есть ранее не описанный белковый партнер – убиквитин-лигаза TRIM29. TRIM29 может модулировать активность TP63 и направлять его на гены, специфичные для базального эпителия. В дальнейшем это позволит продвинуться в понимании тонкой регуляции развития базального эпителия. *Работа поддержана Грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.*

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР WhiA ОБРАЗУЕТ ПЕТЛЮ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ МЕЖДУ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИМ МЕТАБОЛИЗМОМ И ТРАНСЛЯЦИЕЙ У БАКТЕРИИ С РЕДУЦИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ

Е.А. Цой, Г.Ю. Фисунов, Д.В. Евсютина, И.А. Гаранина, В.А. Манувера, В.М. Говорун

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

WhiA – консервативный белок, генетическая последовательность которого присутствует в геномах бактерий, относящихся к разным классам. Белок состоит из двух доменов, соединенные гибким линкером. С-концевой домен подобен НТН-доменам, входящих в состав транскрипционных факторов, а N-концевой домен (HEN) является гомологом хоминг-эндонуклеаз. На данный момент функции WhiA плохо изучены. Данные, опубликованные в литературе, указывают на то, что в разных микроорганизмах белок задействован в различных процессах. Например, у *Streptomyces* spp он принимает участие в регуляции споруляции, а у *Bacillus subtilis* в поддержании структуры хроматина. Кроме того, WhiA является одним из четырех факторов транскрипции, которые сохранились в бактериях с редуцированным геномом-микоплазмах (класс Mollicutes). Целью данной работы стало изучение функции гомологичных белков WhiA из *Bacillus subtilis* и *Mycoplasma gallisepticum*. Проведя анализ консервативности WhiA и оперонной структуры у бактерий, мы выдвинули предположение, что основной мишенью для данного белка является оперон, кодирующий рибосомные и несколько других белков (оперон *grsJ*). Нами было доказано, что снижение концентрации WhiA в *Mycoplasma gallisepticum* приводит к увеличению уровня транскрипции генов, входящих в состав оперона *grsJ*. Сверхэксперсия WhiA в клетках не приводила к видимым изменениям в транскрипции. В ходе исследований нами было подтверждено, что каждый из доменов WhiA распознает и связывает определенную генетическую последовательность в промоторной области оперона *grsJ*. Мы доказали, что для образования специфического ДНК-белкового комплекса НТН домен должен связаться с основным мотивом GAYACRCY (Y=C или T, R=A или G), а HEN с дополнительным. Мы продемонстрировали, что оба белка, при изменении концентраций АТФ и АДФ, изменяют свое средство к ДНК. Увеличение концентрации АТФ в *M. gallisepticum* ведет к конформационным изменениям и диссоциации HEN домена от сайта связывания. Полученные нами результаты указывают на то, что в микоплазмах WhiA отвечает за репрессию оперона *grsJ* в ответ на снижение концентрации АТФ в клетке. Работа финансировалась грантом РНФ 19-74-10105.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СЕРОЗНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЯИЧНИКОВ И МОНИТОРИНГ ИХ ЛЕЧЕНИЯ ПО ИЗМЕНЕНИЮ ЛИПИДОМА КРОВИ

М.В. Юрова^{1,2}, В.В. Чаговец¹, В.Е. Франкевич¹, Н.Л. Стародубцева¹, Г.Н. Хабас¹, С.В. Павлович^{1,2}

¹НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва

Рак яичников (РЯ) устанавливается на III-IV стадиях, диктуя необходимость совершенствовать тесты ранней и дифференциальной диагностики. Цель исследования – проанализировать изменения липида крови до и после комбинированного лечения при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС). С ноября 2019 г. по март 2021 г. на базе НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова проведено наблюдательное исследование. Основную группу составили пациенты с I-IV стадиями серозного РЯ высокой степени злокачественности (РЯ ВСЗ, ранних (Ia-Ic, n=5) и распространенных (IIa-IVa, n=23) стадий). Группу сравнения составили пациенты с серозными пограничными опухолями яичников (ПОЯ, n=10), группу контроля – 13 пациентов сопоставимого возраста без заболеваний органов малого таза (данные опроса, УЗИ, онкомаркеры СА125 и НЕ4 в пределах референса). Также проанализированы образцы крови 7 пациентов с РЯ ВСЗ, получивших комбинированное лечение. Экстракты липидов получали модифицированным методом Фолча, анализ состава проводили с помощью МС с ионизацией электрораспылением. Для выявления различий между выборками применялся непараметрический метод Манна-Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга. На основании статистически значимых различий липидного профиля крови построены модели, кластеризирующие образцы пациентов с ранними и распространенными стадиями РЯ ВСЗ, ПОЯ и группы контроля: РЯ ВСЗ против группы контроля (128 липидов; R2=0,87, Q2=0,80, AUC=1, чувствительность и специфичность 100%); Ia-Ic стадии против группы контроля (108 липидов, R2=0,97, Q2=0,86); IIa-IVa стадии против Ia-Ic стадий (R2=0,96, Q2=1,00, AUC=0,99). Повышение в сыворотке крови пациентов производных лизофосфатидилхолинов [OxLPC (22:2(OO))] и глицерофосфолипидов [PEtOH(20:1_20:1)-H] пропорционально вероятности рецидива РЯ ВСЗ в течение года после окончания комбинированного лечения.

Идентификация липидного профиля крови позволяет выявить пациентов с Ia-Ic стадиями РЯ, дифференцировать опухоли и прогнозировать исходы лечения. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ, название проекта «Разработка метода дифференциальной диагностики образований яичников методом масс-спектрометрии высокого разрешения», № 20-65-46014.

БИОТЕХНОЛОГИЯ. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И ПРИЛОЖЕНИЯ

Устные доклады

ВЛИЯНИЕ КЛОНАЛЬНОЙ ВАРИАТИВНОСТИ ПО УРОВНЮ МЕТАБОЛИЗМА И ПРОДУКТИВНОСТИ НА ОПТИМИЗАЦИЮ ПОЛУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ-ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ В.В. Аргентова^{1,2}, В.А. Топорова², А.А. Панина², А.М. Аргентова-Стивенс², Т.К. Алиев^{1,2}, Д.А. Долгих^{1,2}, М.П. Кирпичников^{1,2}

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Для целей фарминдустрии требуется высокий уровень экспрессии рекомбинантных терапевтических иммуноглобулинов в клетках СНО. Однако, культивирование стабильных клеточных линий-продуцентов связано с проблемой накопления продуктов распада: лактата и аммония в среде культивирования, что приводит к снижению плотности, роста клеток и сокращению времени жизнеспособности культуры клеток. В связи с этим, в качестве дополнительных критериев отбора стабильных клонов-продуцентов важным представляется использование сравнительного анализа различных клонов по уровню выработки метаболитов. Первичный отбор клонов-кандидатов после стабильной трансфекции проводился на основании анализа метаболической активности. Наименьшее количество аммония в культуральной среде в диапазоне 82,3–87,3 нмоль/мл наблюдалось у клонов 2D2, 4C11, и 6F8. Клоны 4C10 и 1F2 показали максимальное значение 92,5 и 90,4 нмоль/мл, соответственно. Определение уровня лактата в среде культивирования проводили путем измерения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в среде культивирования. Содержание лактата в культуральной среде при выращивании клонов-кандидатов 4C11, 6F8 и 4C10 было наименьшим и составило 47,1, 53,3 и 74,7 нмоль/мл, соответственно. Таким образом, результаты по определению лактата и аммония показали, что при культивировании клонов 4C11 и 6F8 наблюдался наименьший уровень метаболитов. Следующий этап отбора клонов-кандидатов проводился на основании анализа продуктивности и плотности клеточной культуры. Наибольшую продукцию IgG1 показали клоны-продуценты 4C10, 2D2, 4C11 -37,0, 42,0 и 40,0 мкг, соответственно. В результате сравнения клонов-кандидатов по трем критериям были выбраны наилучшие клоны: 4C11 и 2D2, которые имели пониженный уровень клеточного метаболизма и повышенную продуктивность антител. На основании полученных результатов, для вторичного отбора был выбран клон 4C11, так как клеточная культура клона демонстрировала гомогенное состояние, в то время как культура клона 2D2 образовывала агрегаты, что предположительно связано с повышенной в 2 раза выработкой лактата (85,54 нмоль/мл). Таким образом, использование многофакторного отбора клонов-продуцентов позволяет более эффективно и быстро разрабатывать стабильные клеточные линии-продуценты рекомбинантных иммуноглобулинов G с пониженным клеточным метаболизмом.

МИКРОФЛЮИДНЫЙ БИОСЕНСОР НА ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОЛНАХ В ФОТОННОМ КРИСТАЛЛЕ ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ ПАТОГЕНОВ

Д.В. Басманов¹, Р.И. Шакуров¹, С.В. Сизова¹, Т.В. Митько¹, В.Н. Конопский², Ю.А. Беспятых¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА Россия, Москва; ²Институт спектроскопии РАН, Троицк

В последние годы идет активное создание мультиплексных биосенсоров, способных одновременно регистрировать взаимодействие множества различных иммобилизованных на твердой фазе лигандов с аналитом. Особенно перспективными могут быть методики без предварительной маркировки реагентов. Наибольшее развитие в данной области получили биосенсоры на поверхностных плазмонах с двумерным пространственным разрешением. Однако, применение подобных биосенсоров ограничено недостаточной чувствительности методики. Более высокой чувствительностью потенциально обладает биосенсинг, основанный на возбуждении поверхностных оптических волн в фотонных кристаллах (ФК), терминальным слоем которых является оксид кремния. Целью работы является разработка методики мультиплексной детекции молекулярных маркеров в реальном времени с помощью биосенсора на поверхностных оптических волнах в одномерном фотонном кристалле с двумерным пространственным разрешением. Поверхность ФК предварительно модифицировалась для последующей ковалентной адсорбции антигенов, с помощью споттера M2 iTwo-300P (Германия) в виде двумерной матрицы носились два типа антигенов: человеческий иммуноглобулин G (hIgG) и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Аналиты, содержащие антителами против данных антигенов, поочередно инжестрировались в микрофлюидную кювету биосенсора над поверхностью ОФК и селективно связывались с пятнами антигенов. Для типирования возбудителя туберкулеза подобраны и синтезированы 43 олигонуклеотидных зонда. Для модификации поверхности биосенсора использовались водные растворы АПТЕСа, декстранов из *Leuconostoc mesenteroides*, БСА. В результате была продемонстрирована одновременная независимая мультиплексная детекция биохимических реакций в 96 и 384 точках с помощью биосенсора на поверхностных волнах в одномерном фотонном кристалле с двумерным пространственным разрешением в реальном времени. Получены независимые кривые сорбции для каждого взаимодействия антиген-антитело на поверхности. Разработанная методика модификации и активации рабочей поверхности ФК позволяет связывать олигонуклеотиды различной последовательности и детектировать их связывание с молекулярными мишенями в реальном времени в мультиплексном формате. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-75-10144.

НЕЛИНЕЙНЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВА ЧЕРЕЗ МЕМБРАННЫЕ НАНОТРУБКИ

П.В. Башкиров ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА Россия, Москва

Клетки широко используют мембранные нанотрубки и сформированные из них сети. Транспорт вещества через просвет таких структур необходим для функционирования туннельных нанотрубок, соединения трубчатых органелл и высвобождения содержимого при слиянии и делении мембран. Просвет обычно рассматривается как узкая пора, транспортные характеристики

которой определяются ее радиусом и длиной. Стенка мембранной трубки представляет собой мягкий эластичный материал, поэтому ее форма может адаптироваться к меняющимся условиям транспорта, а также изменяться под действием сил, обеспечивающих перенос вещества. Однако роль мембранной механики в транспорте остается малоизученной. В данной работе показано, что форма мембранной нанотрубки (НТ) взаимосвязана с транспортом, управляемым электрическим потенциалом и перепадами давления. Причем связь может носить как линейный, так и нелинейный характер. В стабильной НТ латеральное натяжение мембраны определяет связь между формой НТ и движущей силой – силы, намного меньшие, чем натяжение, вызывают небольшие отклонения профиля НТ, определяемые упругостью мембраны. Когда форма НТ близка к неустойчивой, транспортные силы могут запускать обратимое переключение между геометрическими формами с резко различающимися размерами просвета. Причем переходы могут быть стохастическими или периодическими и контролируются электрическим полем через электрокапиллярную силу, действующую на упругую стенку НТ. Также установлена явная параметрическая зависимость вольт-амперной характеристики мембранной трубки от латерального натяжения и изгибной жесткости мембраны НТ, что превращает мембранные НТ в нелинейный транспортный элемент, полностью контролируемый мембранной механикой, с очевидными биологической и технологической значимостью.

ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ АОРТАЛЬНОГО АЛЛОГРАФТА С ПОМОЩЬЮ НОВОЙ ГИБРИДНОЙ ОБРАБОТКИ В МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ СИСТЕМЕ С СВЕРХКРИТИЧЕСКИМ CO₂ И ТВИНОМ -80

Д.В. Бритиков, А.В. Зубко, И.С. Чашин

НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева МЗ РФ, Москва

Донорские криоконсервированные аллотрансплантаты человека обладают отличными гемодинамическими характеристиками, устойчивы к инфекциям и обладают низкой тромбогенностью. Однако известно, что аллотрансплантаты клапанов сердца демонстрируют ускоренную дегенерацию за счет образования кальция, прежде всего в клеточных структурах. Одним из способов физической децеллюляризации биологических тканей является очистка сверхкритическим раствором CO₂ (scCO₂). Сверхкритические жидкие растворители, такие как scCO₂, являются промежуточными фазами между жидкостью и газами. Мы работали новым гибридным методом децеллюляризации. Мы применили классическую быструю промывку в растворе SDS в течение 1 часа с последующей специальной обработкой в многокомпонентной системе scCO₂ раствором небольших количеств: неполярного моющего средства Tween 80, воды и этанола. При этом обработку в scCO₂ проводили в пульсирующем режиме – 3 цикла воздействия в течение 30 минут. На первом этапе экспозицию проводили в растворе детергента дигитонина (0,1 в/в %) и ЭДТА (10 мм) при комнатной температуре и атмосферном давлении в течение 48 часов. Гибридная обработка включала воздействие на нативную ткань стандартным раствором детергента (1% v/v SDS) в течение 1 ч v=500 об/мин с последующей обработкой scCO₂ с Tween-80 в течение 1,5 ч. Для гистологической оценки парафиновые блоки и криоблоки окрашивали тремя красителями: гематоксилином и эозином, Пикросириусом красным, DAPI. Оценка проводилась с помощью световой и флуоресцентной микроскопии и выявила полное разрушение клеточных структур с сохранением коллагенового матрикса. Наружную и внутреннюю поверхности образцов аллотрансплантатов изучали с помощью полевого эмиссионного сканирующего электронного микроскопа. Внутреннюю структуру образцов ткани определяли с помощью ультратонких срезов ткани. Механическую прочность на растяжение образцов клеточных и децеллюляризованных аллотрансплантатов с помощью машины “Zwick/Roell BZ 2.5/TN1S”. Было показано, что специальная гибридная обработка нативной аорты человека позволяет добиться полного удаления клеток, при этом значительно укрепляя аорту в радиальном направлении и повышая эластичность. Мы считаем, что метод позволяет устранить клеточные центры кальцификации и сохранить приемлемые механические свойства.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА В КАЧЕСТВЕ ДОБАВКИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОРАЗЛАГАЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНА

И.А. Варьян^{1,2}, Н.Н. Колесникова¹, А.А. Попов^{1,2} *¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; ²Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, Москва*

Полимер – это тип материала, который состоит из больших и очень тяжелых молекул, обычно связанных между собой сильными ковалентными связями. Благодаря структурным особенностям синтетических полимеров, а также большому разнообразию свойств, которыми они обладают (долговечность, устойчивость к механическим воздействиям, химическая и биологическая стойкость, отличные оптические свойства и др.), полимеры являются чрезвычайно популярным материалом, который используется практически во всех областях повседневной жизни. Однако все те же свойства, которые делают синтетические полимеры столь популярным материалом, приводят к проблемам с их утилизацией. Действительно, благодаря высокой стойкости к химическим и биологическим воздействиям синтетические полимеры в конце срока службы практически не разлагаются в естественных биологических процессах, как это происходит с другими видами отходов. Отличным решением этой проблемы могла бы стать разработка биоразлагаемых полимеров, которые при попадании в окружающую среду будут легко разлагаться обычными видами микроорганизмов (бактериями, грибами и т. д.) с образованием природных продуктов, таких как биомасса, газ и вода. Для этого в синтетическую полимерную матрицу могут быть включены натуральные добавки, которые обеспечивают питательную среду для привлечения микроорганизмов к поверхности полимера и тем самым инициируют процесс биодеградации. В данной работе мы исследовали перспективы использования натурального каучука в качестве добавки к полиэтилену низкой плотности с целью создания полимерного соединения для быстрой биологической деградации в почве. Для этого используют полимерные соединения на основе полиэтилена с содержанием натурального каучука 0–50 (мас. %) изготавливались путем смешивания и прессования ингредиентов при повышенных температурах с последующим быстрым охлаждением. Физические свойства полученных таким образом тонкопленочных образцов исследовали с помощью испытаний на растяжение, оптической микроскопии и дифференциальной сканирующей калориметрии. Химический состав образцов исследовали с помощью инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием.

КОМПЛЕКСЫ НАНОЧАСТИЦ С РЕЦЕПТОРНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ: СИНТЕЗ, СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОАНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Б.Б. Дзантиев, А.В. Жердев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Комплексы антител, аптамеров и других рецепторных молекул с наночастицами широко используются в биохимических исследованиях и биотехнологиях как сорбенты, аналитические и тераностические средства. Эффективность применения определяется их составом и степенью сохранения функциональной активности иммобилизуемых биомолекул, однако выбор оптимальных препаратов в большинстве случаев остается эмпирическим, не основывается на структурно-функциональных взаимосвязях. В сообщении представлены результаты изучения количественных характеристик комплексов антител и компонентов межмолекулярных модулей (стрептавидин – биотин, иммуноглобулин-связывающий белок – антитело) с наночастицами золота и квантовых точек. Рассмотрено влияние адсорбционной, ковалентной и ориентированной иммобилизации, а также размеров нанодисперсных носителей на состав комплексов. Предложены флуориметрические методы контроля состава и функциональной активности рецепторных молекул в комплексах с наночастицами, минимизирующие влияние реакционной среды и носителей. Обнаружена значительная степень инактивации антител при адсорбционной иммобилизации на золотых наночастицах. При варьировании состава комплексов наночастица золота – антитело максимум антиген-связывающей способности достигается при покрытии белком 25-50% поверхности наночастиц в зависимости от антигена и условий иммобилизации. Охарактеризованы отличия сферических и несферических наночастиц золота разного размера как носителей рецепторных молекул. Показаны возможности применения свободной поверхности наночастиц (золото, серебро, платина) для их наращивания восстановлением солей металлов, определены оптимальные условия для нанозимного катализа. Рассмотрены варианты ко-иммобилизации антител и компонентов межмолекулярных модулей, их вклад в усиление сигнала при аналитическом использовании. Исходя из установленных закономерностей, разработаны тест-системы для экспрессного иммунохроматографического выявления воспалительных маркеров, кардиомаркеров, антибиотиков, фитопатогенов, тяжелых металлов. Показана возможность снижения пределов обнаружения аналитов до двух порядков благодаря применению комплексов наночастиц с рецепторными молекулами оптимального состава. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-14-00370.*

ИНДУКЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РОСТА, БИОСИНТЕЗА И НАКОПЛЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФИТОГОРМОНОВ И СТЕРОИДОВ РЫБ: ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ В ПУТЯХ БИОСИНТЕЗА ЛИПИДОВ И МНОГОФАКТОРНЫЙ СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИНДУКЦИИ

Т.А. Козлова¹, Р.А. Волошин¹, С.И. Аллахвердиев^{1,2}

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва; ²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино

Показатели роста и накопления вторичных метаболитов в клетках микроводорослей являются важными характеристиками биологического вида для его использования в качестве сырья для фармацевтической, аграрной и других видов промышленности. Поиск путей одновременного повышения продуктивности биомассы и накопления определенных биомолекул является одной из основных целей биотехнологии биомасс. Сравнительно новый способ индукции с мало исследованным механизмом воздействия – это индукция гормонами. Стимулирующее влияние гормонов растений и животного происхождения на метаболизм различных видов водорослей доказано рядом исследований. Важно, что экзогенные гормоны в наноконцентрациях показали способность одновременно повышать продуктивности биомассы и выработку биомолекул на клетку. В наших исследованиях впервые проанализированы как количественный состав жирных кислот нейтральных липидов и пигментов, так и их профили под воздействием различных зависимостей от типа гормонов и их концентраций. Проанализированы схожесть и различия воздействия четырех фитогормонов (ИУК, АБК, ЭБЛ, БЛ) и двух стероидов (Е2, 17,20-Р) на клетки микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*, связь показателей роста и накопления вторичных метаболитов методами многофакторного статистического анализа (анализа главных компонент (РСА) и анализа канонического соответствия (ССА)). Для лучшего понимания механизма воздействия гормонов на физиологию зеленых водорослей проведена работа по транскрипционному анализу ключевых генов в путях биосинтеза липидов. Начальные результаты показали, что 3-индолилуксусная кислота (ИУК) в наноконцентрациях 5 и 100 нМ стимулировала экспрессию генов, и изменил паттерны экспрессии генов связанных с биосинтезом жирных кислот. Результаты исследований показали возможность использования гормонов в биотехнологии для управления биосинтезом зеленых водорослей. Исследования механизма индукции гормонами будут продолжены.

СТИМУЛИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИМ МАТЕРИАЛОМ И ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ТОКОМ ПРОЦЕССА АНАЭРОБНОГО МЕТАНОГЕННОГО СБРАЖИВАНИЯ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

Ю.В. Литги¹, А.А. Ковалев², Д.А. Ковалев², Е.А. Журавлева¹, Д.С. Груздев¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²ФГБНУ ФНАЦ ВИМ, Москва

В высоконагруженных анаэробных реакторах повышается риск дестабилизации процесса из-за более высокой скорости ацидогенеза, по сравнению с метаногенезом. Это выражается в накоплении летучих жирных кислот (ЛЖК) и закислении среды. В работе изучали новые способы стимулирования метаногенеза за счет добавления электропроводящего материала (карбоновая ткань) и подачи электрического тока, активизирующих процесс прямого межвидового переноса электронов.

Стимулирующее влияние карбоновой ткани, в комплексе с нарастающей на ней биопленкой, наблюдалось при максимальной нагрузке по органическому веществу (ОВ). Выход биогаза увеличивался на 3,7%, метана на 9,5%, содержание метана в биогазе повышалось на 15,1%, степень удаления ОВ на 11,5%, концентрация ЛЖК снижалась на 33,7% по сравнению с кон-

троем. Бактериальное сообщество значительно обогащалось целлюлозолитическими и протеолитическими микроорганизмами родов *Coprothermobacter*, *Anaerobaculum*, *Defluviitoga* и *Clostridium III*, а в биоотходах присутствовали *Tepidanaerobacter* и *Pelotomaculum*, способные к синтрофному разложению ЛЖК. Среди архей преобладал гидротрофный метаноген *Methanothermobacter*, а ацетокластический *Methanotrix* практически полностью элиминировался. В контрольных реакторах (без ткани и с неэлектропроводящей тканью из стекловолокна) нарастали представители рода *Methanosarcina*, что свидетельствовало об их менее стабильной работе. Карбоновую ткань использовали далее в качестве анода и катода, к которым подключали постоянный электрический ток (100–500 мА). Подача тока увеличивала выход биогаза на 14–31%, в то же время степень удаления ОВ и содержание метана в биогазе снижались, соответственно, на 15–18% и 6–17%, предположительно вследствие электролиза воды. Чистый суточный прирост выхода метана составил 4,0–6,4%. Увеличение силы тока приводило к доминированию представителей *Defluviitoga* и *Methanothermobacter* в микробном сообществе. Таким образом, подача электричества в реактор стимулировала синтрофные связи, прямой межвидовой перенос электронов, а также увеличивала скорость протекающих процессов. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от 16.11.2020г. на осуществление государственной поддержки создания и развития НЦМУ «Агротехнологии будущего».

ВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ В РАСТЕНИЯХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Е.С. Марданова, Н.В. Равин *Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва*

Для продукции рекомбинантных белков медицинского назначения могут быть использованы различные системы гетерологической экспрессии, – бактерии, дрожжи, растения, клетки животных. Растения могут стать конкурентоспособной «биофабрикой» для получения рекомбинантных белков. Высокий уровень продукции белков в растениях может быть достигнут за счет использования систем транзientной экспрессии, основанных на рекомбинантных вирусах растений. Для экспрессии рекомбинантных белков нами были разработаны векторы на основе генома вируса X картофеля. Эти векторы были использованы для продукции в растениях рекомбинантных антигенов вирусов гриппа А, гепатита Е и коронавируса SARS-Cov2. В качестве основы кандидатной вакцины против гриппа А был использован внеклеточный домен М2 белка (М2е), последовательность которого высоко консервативна у различных штаммов вируса гриппа А человека. Данный подход открывает возможность создания рекомбинантных вакцин широкого спектра действия. Для повышения иммуногенности М2е пептида использовали различные адъюванты-носители: бактериальный флагеллин, ядерный антиген вируса гепатита В (НВс), капсидный белок вируса гепатита Е. Полученные в растениях препараты были исследованы на лабораторных животных и показали свою высокую иммуногенность и протективное действие. Для создания «растительного» вакцинного препарата против коронавирусной инфекции использован бактериальный флагеллин, к которому был присоединен рецептор-связывающий RBD домен (319-524 aa) SARS-Cov2. Гибридный белок экспрессируется в клетках растения, в дальнейшем планируется изучение его иммуногенности на лабораторных животных. В растительной системе экспрессии получены вирусоподобные частицы, образуемые капсидным белком вируса гепатита Е. Препарат показал высокую иммуногенность на лабораторных животных, и может быть в дальнейшем использован в качестве профилактической вакцины для человека и животных. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от 16 ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

РАЗРАБОТКА ТКАНЕЗАМЕЩАЮЩЕГО БИОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЕРМЫ

К.И. Мелконян¹, Т.В. Русинова¹, Я.А. Козмай¹, И.М. Быков¹, К.Г. Гуревич²

¹Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар; ²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва

Материалы на основе обескелеченных тканей - ацеллюлярные дермальные матриксы (АДМ) набирают большую популярность в качестве хирургических материалов при операциях на органах малого таза, в ожоговой терапии, в том числе при реконструктивной маммопластике. В пластической хирургии они используются как при мастэктомии, так и при вторичных операциях при деформациях груди в качестве поддерживающих эндопротез материалов. Главным преимуществом АДМ является возможность их «встраивания» в структуру собственной ткани пациента, прорастания сосудами и нервами, и их функционирования как собственной ткани. Таким образом, целью исследования стало создание протокола получения АДМ на основе дермы, обладающего оптимальными характеристиками для использования его в качестве хирургического импланта.

Основой для АДМ послужила свиная дерма толщиной 0,7 мм, образцы после забора электродерматомом замораживали при температуре -80°C. После размораживания дерму инкубировали в течение 6 часов (3 цикла по 2 часа) при 37°C в растворе трипсина-Версена. Затем проводили 2 цикла обработки 1% Триптоном X-100 и 4% раствором дезоксишолата натрия в комбинации с 0,002 М Na₂-ЭДТА общей продолжительностью 12 часов при комнатной температуре в шейкере-инкубаторе. Чтобы удалить ядерный материал клеток образцы инкубировали в растворе свиной панкреатической ДНКазы при 37°C в течение 4 часов. Для обеспечения стерильности образцов во все рабочие среды были добавлены 1% растворы гентамицина и амфотерицина В. Между циклами и при каждой смене растворов образцы отмывали деионизированной водой в течение 10 минут. Количество остаточного ДНК в матриксе составило 35,2±2,1 нг/мг ткани. Окрашивание образцов гематоксилином и эозином, а также флуорофором DAPI показало отсутствие ядерных структур и сохранение нативного расположения фибриллярных белков внеклеточного матрикса дермы.

Разработанный нами протокол создания АДМ на основе дермы свиньи является оптимальным, так как полученный АДМ обладает низкой иммуногенностью, максимально соответствует нативному внеклеточному матриксу дермы. Это позволяет использовать данный матрикс для дальнейших исследований по созданию полноценного хирургического материала, безопасного для применения в клинической практике.

ДИНАМИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРИ СОВМЕСТНОМ КОМПСТИРОВАНИИ ПИЩЕВЫХ И АГРООТХОДОВ

В.В. Миронов¹, А.В. Вантеева¹, А.Ю. Меркель¹, С.Д. Науменков²

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва;

²Акционерное общество «Агрофирма Бунятино», д. Абрамцево, Московская область

Исследование направлено на установление взаимосвязи между параметрами окружающей среды и разнообразием, составом и функцией микробных сообществ, которые преобладают на каждой стадии со-компостирования пищевых и сельскохозяйственных отходов. Биоразнообразие микробных сообществ увеличивалось со временем компостирования, и зрелое сообщество компоста было наиболее сложным. В начале компостирования и при переходе от мезофильной стадии к термофильной в условиях повышенной влажности в сообществе активно росли молочнокислые бактерии *Weissella*, *Leuconostoc*, *Limosilactobacillus*. В результате их активности значительно снизился pH, что вызвало замедление микробной активности. Основная активность биодеградации (по выбросам CO₂) наблюдалась во время термофильной стадии, когда доминантными родами бактерий были *Bacillus* и *Caldibacillus*, в то время как *Penicillium* и *Aspergillus* были доминирующими родами грибов. Высокая влажность и повышенное соотношение C/N способствовали уменьшению биоразнообразия и богатства микробных сообществ. В период, когда в субстрате существовали такие условия, быстрорастущие микроорганизмы вытесняли менее адаптированных представителей сообщества. Температура оказала значительное влияние на количество видов и разнообразие в грибном сообществе, которое было более чувствительно к резким изменениям температуры, чем сообщество прокариот. *Byssoschlamys*, образующие термостойкие споры, были основным членом грибкового сообщества во время перехода от мезофильной к термофильной стадии и во время стадии охлаждения. Нестабильность грибкового сообщества может отрицательно сказаться на скорости разложения органического вещества в быстро меняющихся условиях. Показано, что чем разнообразнее микробное сообщество, тем выше свойства компоста, стимулирующие рост и развитие растений, что связано с высокой корреляцией биоразнообразия с показателями прорастания и нитрификации. Высокое исходное соотношение C/N не привело к увеличению иммобилизации азота и снижению уровня элементов питания растений. В результате компостирования был получен зрелый компост, соответствующий критериям качества. Наши результаты расширяют понимание последовательности микробных сообществ в системах совместного компостирования пищевых отходов и пшеничной соломы.

НОВЫЕ ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ КОРМОВОГО БЕЛКА НА ПРИРОДНОМ ГАЗЕ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ И ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА

И.Ю. Ошкин¹, О.В. Данилова¹, С.Ю. Бут², К.К. Мирошников¹, С.Н. Дедыш¹, Н.В. Пименов¹

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино

Проблема дефицита кормового белка остается нерешенной во многих странах и является одной из причин низкой эффективности аквахозяйств, птицефабрик и животноводческих комплексов. Промышленное производство кормового белка (Гаприна) из природного газа с использованием термотолерантного метанотрофа *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 было реализовано в СССР в середине 1980-х. В настоящее время эта технология переживает этап трансформации в технологию второго поколения, в том числе за счет подбора новых штаммов-продуцентов.

В данной работе для поиска новых штаммов метанотрофов использовали образцы, отобранные из природных и техногенных местообитаний с высокой доступностью метана - активных ил очистных сооружений, пресноводный осадок и покрывающую почву полигона твердых бытовых отходов. Работы по культивированию позволили получить 4 изолята термотолерантных метанотрофов, обнаруживающих 98,56–99,35% сходства последовательностей гена 16S рРНК с таковой у *Mc. capsulatus* Bath. Гибридная сборка коротких и длинных прочтений позволила получить замкнутые геномы высокого качества размером от 3.2 до 4 млн. п. о. Пангеномный анализ показал, что многообразие генов во всех доступных геномах *Methylococcus* представлено 4485 кластерами. Из них 52% составляют коровый геном, т.е. присутствуют в геномах всех штаммов. Анализ инсерционных последовательностей выявил высокое сходство их композиции в трех исследованных изолятах. Отличия состава инсерционных последовательностей у четвертого штамма объясняется горизонтальным переносом с помощью интегративных конъюгативных элементов и интегративных. Это говорит о высокой консервативности геномов представителей *Mc. capsulatus* и низком влиянии горизонтального переноса. Культивирование новых изолятов в проточном режиме в модельных ферментерах показало, что ростовые параметры новых изолятов сравнимы или превышают таковые у *Mc. capsulatus* Bath. Высокие показатели роста и отсутствие в геномах достоверно полных последовательностей профагов указывают на потенциальную перспективность новых изолятов *Methylococcus* для производства кормового белка из природного газа.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от 16.11.2020г. на осуществление государственной поддержки создания и развития НЦМУ «Агротехнологии будущего».

НОВЫЕ ПОДХОДЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ОТ БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ – НАПРАВЛЕННАЯ МОДИФИКАЦИЯ И УПРАВЛЕНИЕ МИКРОБНЫМИ КОНСОРЦИУМАМИ

Н.В. Пименов, Ю.А. Николаев, В.А. Грачев, Ю.Ю. Берестовская, А.В. Белецкий, Е.В. Груздев, А.Г. Дорофеев, А.В. Пелевина, А.Ю. Каллистова, Н.В. Равин, А.В. Марданов

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Технологии очистки сточных вод от биогенных элементов основаны на деятельности микробных консорциумов активного ила, обогащённого микроорганизмами, способными окислять, накапливать или трансформировать основные биогенные элементы. Новые подходы по оптимизации и направленному управлению микробными консорциумами очистных сооружений

основаны на сочетании традиционных микробиологических и молекулярно-биологических методов. С использованием разработанных нами лабораторных биореакторов установлено, что для выращивания фосфат-аккумулирующих бактерий (ФАО) необходимо использовать нетрадиционное для микробиологии циклическое культивирование. Метагеномным анализом определен состав микробного консорциума, описаны новые технологически важные ФАО. Выяснено, что для ФАО характерен рост в виде флоккул, сепарация и концентрация которых представляется перспективным инженерно-технологическим приемом, способным путем естественной аугментации существенно повысить эффективность технологий очистки вод от фосфора.

Полноценное и эффективное удаление азота через Анаммокс-процесс (АМП) может быть реализовано только сообществом бактерий, основу которого составляют нитрификаторы и анаммокс-бактерии. Лабораторное моделирование процесса Анаммокс реализовано на специально созданной установке из трёх параллельно работающих биореакторов. Проведены исследования влияния разных концентраций сероводорода на активность АМП. Показано, что дополнительное внесение бактерий-нитрификаторов в действующий биореактор с анаммокс-сообществом повысило эффективность удаления азота в три раза. Исследование метагенома анаммокс-сообщества на разных этапах культивирования выявило наличие постоянно присутствующих гетеротрофных спутников. Обсуждается их возможная роль в анаммокс-сообществе. Был полностью собран и аннотирован геном анаммокс-бактерий порядка Brocadiales, доминирующих в наших лабораторных биореакторах. *Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-29-08008 и 18-29-25016).*

ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ В ПОСТ ГЕНОМНУЮ ЭРУ: РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В.В. Шумянцева^{1,2}, Т.В. Булко¹, А.В. Кузиков^{1,2}, Р.А. Масамрех^{1,2}, П.И. Королева¹, А.А. Гилеп³, С.А. Усанов³, А.И. Арчаков^{1,2}

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва; ³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Генетический полиморфизм определяет особенности фармакокинетики лекарственных средств. Проведен сравнительный анализ каталитической активности изоморфных модификаций цитохромов P450 2C9, 2C9*2, 2C9*3. Для исследования каталитической активности цитохромов P450, высокопроизводительного скрининга потенциальных субстратов, ингибиторов, эффекторов, поиска средств-корректоров метаболической активности этого надсемейства гемопротеинов как биокатализаторов разработаны электрохимические методы анализа, основанные на использовании рекомбинантных и генетически модифицированных ферментов. Проведен обоснованный выбор сенсорных конструкций для электроанализа биомолекул и выбора тандема биомолекула/модификатор. Разработан метод коррекции каталитической активности аллельных вариантов с помощью антиоксидантных метаболических препаратов. Разработаны новые подходы для высокочувствительной регистрации каталитической активности цитохромов P450 на основе флуоресцентных и электрохимических свойств субстратов и продуктов метаболических реакций цитохромов P450. Проведен анализ электрохимических параметров для моделирования совместного применения лекарств с различной терапевтической направленностью (антибиотики, метаболические антиоксидантные препараты, ингибиторы азольной природы, нестероидные противовоспалительные препараты). Предложен метод анализа и экспериментального расчета такого электрохимического параметра как потенциал начала катализа (Eonset) для сравнительной характеристики межлекарственных взаимодействий и выявления взаимного влияния на биотрансформацию, катализируемую цитохромом P450 3A4. Была выявлена закономерность, позволяющая прогнозировать поведение субстратов в качестве «ведущего» («perpetrator» или «нарушитель» в терминах фармакокинетики), метаболизируемого цитохромом P450 3A4 в первую очередь и не подверженного влиянию второго «ведомого» субстрата («victim» или «жертвы» по терминологии фармакокинетики). Прогностическая роль электрохимических параметров подтверждена в экспериментах по анализу межлекарственных взаимодействий для эритромицина, омепразола, кортизола, тестостерона, диклофенака. Проведено исследование механизмов взаимодействия ДНК с лекарственными препаратами в различных формах (фосфолипидных композициях) для фармакогеномных исследований.

Стендовые доклады

РЕКОНСТРУКЦИЯ САМОПОДДЕРЖИВАЮЩЕЙСЯ СИСТЕМЫ ОСЦИЛЛИРУЮЩИХ РЕАКЦИЙ ГЛИКОЛИЗА ВНУТРИ ИСКУССТВЕННЫХ МИКРОРЕАКТОРОВ

О.М. Алехина, Д.С. Матюшкина, И.О. Бутенко, П.В. Башкиров, В.М. Говорун
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Процессы, протекающие по механизму осцилляций, имеют очень широкое распространение в природе. В живых системах осцилляции происходят на всех уровнях организации – от экосистем и многоклеточных организмов до отдельных клеток, биополимеров и метаболитов. Гликолиз является одним из важнейших метаболических путей во всех клетках, в котором обнаружены периодические колебания интермедиатов, и было выдвинуто предположение, что осцилляции могут быть универсальным способом организации биологических систем, обеспечивающим им стабильность и выживаемость. Мы изучали гликолитические осцилляции, которые возникают в концентрированных экстрактах, полученных из дрожжевых клеток, и в результате смогли значительно расширить существующие знания о причинах и динамике этого явления. Было показано, что для появления осцилляций в дрожжевом экстракте достаточно лишь обеспечить ему постоянный приток основного субстрата – глюкозы, однако, для быстрого установления и длительного поддержания периодических колебаний необходимо присутствие определенных количеств некоторых метаболитов и кофакторов, в частности АТФ. Методами флуоресцентной спектроскопии и масс-спектрометрии были детектированы колебания нескольких интермедиатов гликолиза в процессе инкубации дрожжевого экстракта с глюкозой, и кроме того, были определены ключевые кинетические параметры осцилляций, протекающих в

разных условиях. Чтобы создать искусственную систему осциллирующих реакций, дрожжевой экстракт инкапсулировали внутрь двумембранных липосом, а также обращенных мицелл разного размера, покрытых одним слоем фосфолипидной мембраны. С помощью флуоресцентной микроскопии удалось обнаружить осцилляции кофактора гликолиза НАДН лишь в крупных мицеллах диаметром не менее 100 мкм, что скорее всего объясняется трудностью выведения излишков углекислого газа, образующегося в экстракте при брожении. Чтобы решить эту проблему, был изготовлен микрочип с изолированными полостями, связанными системой каналов. Экстракт, помещенный внутрь полостей, был способен осциллировать с воспроизводимыми кинетическими параметрами. Полученные микрореакторы со стабильными осциллирующими реакциями планируется использовать для изучения фундаментальных принципов организации клеточных процессов. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-08041.*

ТЕЛЦА ВКЛЮЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ A1 ИЗ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* КАК АНТИГЕН ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНОЙ АНТИСЫВОРОТКИ

С.И. Бахолдина, Н.Ю. Чернышева, О.Ю. Портнягина, Т.Ф. Соловьева

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

В настоящее время рекомбинантные белки (РБ), используются как компоненты вакцин, антигены для диагностики и получения поликлональных антител. Биотехнологическое производство РБ, помогает избежать контактов с высокопатогенными микроорганизмами, получать целевые антигены в неограниченных количествах, и контролировать в них наличие нежелательных примесей, что позволяет стандартизовать качество иммунодиагностических и иммунологических препаратов. Однако все РБ требуют сложной и длительной процедуры очистки. Фосфолипаза A1 из наружной мембраны (НМ) *Yersinia pseudotuberculosis* играет важную функциональную роль в клетке и относится к одному из факторов патогенности этих бактерий. Ранее нами был сконструирован штамм *E. coli* BL21(DE3)/mPldA для экспрессии PldA *Y. pseudotuberculosis* в виде телец включения (ТВ). Было показано, что рекомбинантная фосфолипаза (rPldA), выделенная из ТВ, иммуногенна для мышей. В данной работе мы использовали в качестве антигена для иммунизации ТВ rPldA. С целью выделения ТВ клетки дезинтегрировали с помощью лизоцима и ультразвука, очистку ТВ от примесей проводили, обрабатывая их 0.1% лаурилсаркозинатом натрия и 1% дезоксихолатом натрия. Данный подход позволил получить ТВ, полностью очищенные от эндотоксина и сопутствующих белков. Для получения специфических сывороток были подобраны схема иммунизации мышей, способ приготовления и концентрация вводимого антигена. В результате трехкратной иммунизации (0, 7 и 14 день) ТВ, суспендированными в PBS (40 мкг/мышь) или в 0,05% SDS (10 мкг/мышь) были получены антисыворотки с высоким титром антител, что сравнимо с таковым для сыворотки, полученной при иммунизации мышей rPldA. Показано, что антисыворотки к ТВ и rPldA с одинаковой эффективностью взаимодействуют с rPldA, а также выявляют данный антиген в Вестерн-блоттинге во фракции белков НМ *Y. pseudotuberculosis* и в цельноклеточных лизатах *E. coli*, продуцирующих rPldA или химерный белок PldA-GFP. Полученные результаты подтверждают, что rPldA в виде ТВ может быть использована в качестве антигена для иммунизации и получения антисыворотки с высоким титром специфических антител. Этот подход исключает применение дорогостоящих, длительных и трудоемких процедур выделения и очистки РБ из ТВ.

ОЦЕНКА РАЗМЕРА АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПОЛУДЕНАТУРИРУЮЩЕГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

П.Б. Дроздова^{1,2}, Ю.А. Барбитов¹, М.В. Белоусов^{1,3}, Р.К. Скитченко⁴, Т.М. Рогоза^{1,5}, Ж. Леклерк⁶, А.В. Каява⁶, А.Г. Матвеев¹, Г.А. Журавлева^{1,7}, С.А. Бондарев^{1,7}

¹Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет; ²НИИ биологии, Иркутский государственный университет; ³Лаборатория протеомики надорганизменных систем, ВНИИ сельскохозяйственный микробиологии; ⁴Международный научно-исследовательский институт биоинженерии Университет ИТМО, Санкт-Петербург; ⁵Институт общей генетики, Санкт-Петербургский филиал; ⁶ Исследовательский центр клеточной биологии, Университет Монпелье, Франция; ⁷ Научная лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле (SDD-AGE) был предложен для сравнения размера амилоидных агрегатов. Существенным его недостатком является невозможность проведения количественной оценки и статистической обработки полученных результатов. Мы предложили подход, позволяющий решить эту проблему. Он основан на использовании стандартных маркеров молекулярного веса ДНК и математической модели, описывающей взаимосвязь между их размерами и подвижностью в агарозном геле. Для удобства пользователей было создано приложение AGECalibratoR, позволяющее легко проводить этот анализ. Для проверки сходимости получаемых результатов мы использовали штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с известными вариантами приона [PSI⁺], которые отличаются по размеру агрегатов Sup35. В серии повторностей нам удалось продемонстрировать воспроизводимую и статистически достоверную разницу в размерах агрегатов Sup35 между исследуемыми штаммами дрожжей. При этом мы также описали влияние различных факторов на оцениваемый размер амилоидных агрегатов. Например, способ получения белковых лизатов, а также pH буфера для электрофореза могут менять подвижность амилоидов в геле. Таким образом, сравнение размеров агрегатов возможно, но требует стандартизации методики. Кроме этого, мы проанализировали возможность определения массы агрегатов в абсолютных величинах (кДа). Для решения этой задачи были получены образцы амилоидных фибрилл из рекомбинантных белков Sup35 и Rnq1 *in vitro*, их размеры мы оценили с помощью электронной микроскопии. В основу этих расчетов легло предположение, что расстояние между соседними молекулами белка в фибрилле составляет 4,7Å. Эти данные были сопоставлены с результатами аналогичной оценки, но с помощью SDD-AGE. Полученные данные существенно отличались друг от друга. Таким образом, на данном этапе оценка размера амилоидных агрегатов возможна только в условных единицах. Результаты были опубликованы в журнале *Prion* в 2020 году (Drozдова et al., 2020, DOI:10.1080/19336896.2020.1751574). *Работа поддержана грантом РФФИ 18-14-00050.*

ИЗМЕНЕНИЯ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ АНТИТЕЛ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

Д.В. Сотников, Н.А. Бызова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Комплексы золотых наночастиц с антителами широко используются в качестве аналитических реагентов. Предложен ряд способов получения этих комплексов, однако оценка синтезируемых препаратов в большинстве случаев сводится к качественной проверке их реакционной способности. Существующие методы количественного измерения инактивированных и активных антител на поверхности наночастиц трудоемки и сложны для широкого применения. В работе предложена оригинальная методика определения антиген-связывающей способности иммобилизованных на наночастицах антител, основанная на флуоресцентной спектроскопии. Количество антител в комплексе с наночастицами измеряли, регистрируя флуоресценцию триптофана в составе антител в исходном растворе и после их связывания с наночастицами. После установления состава комплексов антитело-наночастица измеряли степень сохранения функциональной активности антиген-связывающих центров, определяя количество свободного антигена (по его флуоресценции) в растворе после инкубации с наноконкомплексом и отделения полученных комплексов центрифугированием. Для наночастиц золота со средним диаметром 15; 24; 29; 34; 43 и 55 нм получены препараты с разным содержанием антител против С-реактивного белка. Измерено содержание антител в комплексах (30; 65; 102; 178; 130 и 194 антител на одной частице, соответственно) и количество антигенов, которое они могут связать. Процент антител, связавшихся с поверхностью частиц при монослойной иммобилизации, для данных препаратов наночастиц составил 48; 42; 43; 34; 25 и 23, а процент валентностей антител, сохранивших способность связывать С-реактивный белок, – 17; 22; 23; 22; 33 и 34. Таким образом, при увеличении диаметра частиц наблюдалось снижение доли связанных антител и повышение доли активных валентностей. Установлено, что при увеличении количества сорбированных антител с 1/4 до 1/2 монослоя связывающая способность комплексов увеличивается вдвое, однако при росте количества сорбированных антител еще в 2 раза связывающая способность увеличивается только в 1,5 раза, что, вероятно, связано со стерическими препятствиями при возрастающей поверхностной плотности сорбированных антител. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-14-00370.*

КОМПЛЕКСЫ БЕЛКА G С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА И ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Л.В. Баршевская, Д.В. Сотников, Н.А. Бызова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Уникальные физико-химические свойства нанодисперсного золота обусловили его востребованность как носителя для различных биомолекул. Получаемые препараты широко используются в диагностических, терапевтических и исследовательских целях. Несмотря на большое количество работ, посвященных получению комплексов белков с наночастицами, выбор наиболее эффективных препаратов и протоколов их получения остаётся эмпирическим. В данной работе предложен метод характеристики состава комплексов наночастиц с белками, основанный на мечении белков флуорескаминам (ФА) с последующей регистрацией флуоресценции. При взаимодействии ФА с первичными аминогруппами белка образуются интенсивно флуоресцирующие производные. Преимуществом ФА является то, что флуоресценция появляется только после взаимодействия с аминогруппой и поэтому измерения характеризуются низким фоновым сигналом. Реакция с аминогруппами протекает за несколько секунд. К тому же ФА устойчив лишь в органических растворителях, а в воде в течение 1–2 мин гидролизует и выпадает в осадок, что исключает необходимость отделять продукт реакции от несвязанной метки. Отсутствие дополнительных стадий обуславливает высокую производительность предложенного метода. В качестве объекта для оценки возможностей метода использовали иммуноглобулин-связывающий белок G, часто используемый в иммуноаналитических системах. Полученные данные свидетельствуют об оптимальном составе комплекса, в котором с одной золотой наночастицей со средним диаметром 25 нм связано около 130 молекул белка G. Комплекс белка G с наночастицами был использован для разработки иммунохроматографического анализа антибиотика сульфониламида в мёде. Визуальный и инструментальный пределы обнаружения составили 100 нг/мл и 0,3 нг/мл соответственно, что удовлетворяет установленным нормам МДУ сульфониамидов в пищевой продукции (0,1 мг/кг). Использование в тест-системе комплекса наночастиц золота с белком G подтверждает его эффективность для обеспечения высокочувствительного анализа, а универсальность данного маркера позволяет его применять для определения различных соединений. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20-76-10033.*

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ПО ПОВЫШЕНИЮ ПРОДУКЦИИ И РЕНТАБЕЛЬНОСТИ ПРОИЗВОДСТВА L-ТРЕОНИНА БАКТЕРИЯМИ *ESCHERICHIA COLI*

Т.В. Выборная, А.С. Федоров, Ф.В. Бондаренко, А.В. Шутов, Д.М. Бубнов

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва

Традиционно эффективным подходом по повышению продукции метаболитов является блокирование путей их биодegradации. Основным продуктом катаболизма L-треонина является 2-кетобутират. Ранее нами был сконструирован штамм продуцент треонина, в котором выключены известные пути синтеза 2-кетобутирата, с участием *IlvA* и *TdcB*. Несмотря на то, что в продуценте заблокирован синтез 2-кетобутирата, из которого единственным образом может быть синтезирован L-изолейцин, оказалось, что полученный штамм сохраняет прототрофность по изолейцину. Сделано предположение, что в силу сходства структур L-серина и L-треонина, некоторые сериндеаминазы могут осуществлять реакцию деаминации треонина, в результате которых образуется предшественник изолейцина, 2-кетобутират. Несмотря на делецию всех известных генов, осуществляющих первую реакцию синтеза изолейцина из треонина, *ilvA* и *tdcB*, кодирующих треониндеаминазы, а также *sdaA*, *sdaB*, *tdcG* кодирующих сериндеаминазы I, II, III, соответственно, сконструированный штамм ВКПМ В-12873 не является

полным ауксотрофом по изолейцину. Из литературных данных известно, что 2-кетобутират также может синтезироваться в клетке в результате реакции дезаминирования О-сукцинилглютамата, катализируемой ферментом MetB. Несмотря на то, что данная реакция считается нефизиологичной для клеток *E. coli*, мы проверили гипотезу о возможном способе биосинтеза 2-кетобутирата из метионина путем делеции гена *metB* в геноме штамма ВКПМ В-12873. Полученный штамм является ауксотрофом по метионину, однако сохраняет способность расти на минимальной среде без добавления изолейцина. Нами сделан вывод о существовании как минимум еще одного пути деградации треонина в клетках *E. coli*. С целью повышения рентабельности производства треонина также проведены эксперименты с рециклизацией биомассы штамма продуцента треонина. Разработана методика автолиза биомассы и оптимизирована методика ферментации штамма-продуцента треонина, позволяющая без ухудшения конверсии глюкозы в треонин заменить растительное сырье на биомассу, полученную после предыдущей ферментации, что решает проблему утилизации отходов производства, а также позволяет уменьшить себестоимость синтезируемой аминокислоты. Работа финансировалась «Курчатовским геномным центром» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/Cpf1 ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

Д.Д. Дербинов, А.А. Самарин, А.С. Яненко

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва

Бактерии рода *Corynebacterium glutamicum* используются в промышленном получении аминокислот на протяжении уже более 50 лет. На их основе получены штаммы-продуценты таких аминокислот как лизин и глутаминовая кислота. В настоящее время начаты работы по разработке штаммов-продуцентов валина на основе этой бактерии. Редактирование генома коринебактерий осложняется высоким GC составом и слабой гомологичной рекомбинацией. Поэтому использование новой технологии CRISPR/Cpf1 для редактирования геномов *Corynebacterium glutamicum* представляет значительный интерес для промышленной биотехнологии. Эта технология позволяет значительно упростить и ускорить процесс введения различных делеций и точечных замен в хромосомы будущих штаммов-продуцентов. На основе коммерческого плазмидного вектора pJYS3_crtYf создана серия плазмидных векторов, предназначенных для удаления ряда генов (*ilvA*, *brnQ*, *avtA*, *ppc*, *alaT*, *ldh*, *leuA*, *panB* и *panC*), влияющих на биосинтез валина в клетках коринебактерий. Технология введения делеций очень проста и занимает меньше времени по сравнению с классической схемой введения делеций с помощью интегративных суицидных векторов. Разработанные векторы использовались для создания модельных штаммов – продуцентов валина. Показано, что комбинации некоторых делеций позволяют увеличить продуктивность по валину с 0 до $14 \pm 1,4$ г/л валина. Апробированная технология будет использована в дальнейшем для создания на основе *Corynebacterium glutamicum* штамма-продуцента валина.

ТЕРМОИНАКТИВАЦИЯ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ГЕЛЕОБРАЗНЫХ СРЕДАХ КРАХМАЛА И ЖЕЛАТИНА

В.И. Лоншакова-Мукина¹, Е.Н. Есимбекова^{1,2}, В.А. Кратасюк^{1,2}

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

Бутирилхолинэстераза (ВChE) ЕС 3.1.1.8 – фермент из класса гидролаз, катализирующий реакцию гидролиза бутирилтиохолина до тиохолина и масляной кислоты. ВChE, наряду с ацетилхолинэстеразой, активно применяется для мониторинга ингибиторов холинэстераз в воздухе, воде, почве и биологических жидкостях. Тем не менее, существуют проблемы обеспечения высокой активности и стабильности ВChE при хранении и использовании, в том числе в качестве распознающего элемента в биосенсорах. Настоящая работа демонстрирует простой способ увеличения термической стабильности ВChE за счет использования природных полимеров. Активность ВChE определяли в присутствии разных концентраций желатина (от 0.4 до 3%), крахмала (от 1 до 4,2%) и без стабилизирующих добавок (контроль). Температурную инактивацию ВChE изучали, инкубируя ферменты в течение 5–30 мин при разных температурах в интервале от 50 до 64°C в 1,4% растворе желатина, 3% крахмале и в отсутствие стабилизирующих добавок (контроль). Активность ВChE определяли по методу Элмана. По изменению оптической плотности во времени, измеренной на спектрофотометре UV-2700 (Shimadzu, Япония) на длине волны 412 нм, вычисляли скорость гидролиза субстрата ВChE – S-бутирилтиохолина йодистого, по полученным результатам делали вывод о скорости реакции. Анализ термической инактивации тетрамерной формы ВChE в крахмальном и желатиновом гелях при 50–64°C показал, что кинетика термоинактивации имеет второй порядок, и включает два различных механизма инактивации ВChE, последовательно сменяющих друг друга и протекающих с разными скоростями (быстрый и медленный процессы). Значения ΔH^\ddagger для быстрой и медленной фаз термоинактивации ВChE в крахмальном геле составили 61 ± 3 и 22 ± 2 Ккал/моль, соответственно, значения ΔS^\ddagger составили 136 ± 12 и -2.03 ± 0.05 кал/(К·моль), соответственно. В желатиновом геле значения ΔH^\ddagger составили 58 ± 6 и 109 ± 11 Ккал/моль, значения ΔS^\ddagger составили 149 ± 16 и 262 ± 21 кал/(К·моль), соответственно. Согласно значениям активационных параметров крахмальный гель оказывает больший стабилизирующий эффект на ВChE при длительном воздействии высоких температур по сравнению с желатиновым гелем. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки, проект № 20-44-242001.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ШАПЕРОНОВ С ПРИОННОЙ ФОРМОЙ БЕЛКА Sup35 С ПОМОЩЬЮ ИНСЕРЦИОННОГО АНАЛИЗА

Н.А. Зайцева, А.Г. Матвеев, Г.А. Журавлева

Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Фактор [PSI⁺] – прион дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Он образуется из молекул белка Sup35, который в норме выполняет функцию фактора терминации трансляции. В случае перехода в прионную изоформу Sup35 теряет свою функциональность, а взаимодействие нативного Sup35 с такой изоформой приводит к его агрегации. Отсутствие эффективной терминации

трансляции в клетках с прионом [PSI+] приводит к нонсенс-супрессии. На присутствие прионов в клетке влияют белки-шапероны. Один из важнейших для поддержания [PSI+] шаперонов – Hsp104. Ранее было показано, что сверхэкспрессия HSP104 приводит к элиминации приона [PSI+]. При этом недавние работы по исследованию влияния Hsp104 и других шаперонов на прион [PSI+] частично не согласуются друг с другом. Например, избыток фактора сортировки шаперонов Cur1 приводил к потере [PSI+] по данным лаборатории L. Greene, а по данным лаборатории физиологической генетики СПбГУ – к усилению фенотипа данного приона. Поскольку в работах лаборатории L. Greene часто использовалась конструкция с инсерцией GFP внутри Sup35, мы предположили, что различия могут быть связаны с использованием разных конструкций для визуализации агрегации Sup35. В связи с этим мы проверили влияет ли наличие инсерций GFP в различные участки M-домена Sup35 на свойства [PSI+] и взаимодействие Sup35 с шаперонами. Мы обнаружили, что варианты Sup35NM, соединенные с GFP и Sup35C, приводят к усилению нонсенс-супрессии в штаммах [psi-] и могут поддерживать уже существующие агрегаты в штаммах [PSI+]. При этом интеграция GFP в M-домен снижает способность Sup35 индуцировать [PSI+] *de novo*. В дальнейших экспериментах мы показали, что белки Sup35-GFP способны включаться в агрегаты [PSI+], но инсерция GFP не оказывает существенного эффекта на взаимодействие [PSI+] с шаперонами. Таким образом, GFP в составе химерного белка, вероятно, мешает выполнению Sup35 своей роли в качестве фактора терминации трансляции. Однако нам не удалось обнаружить влияния инсерций GFP на взаимодействие Sup35 с системой шаперонов. Мы предположили, что присутствие различных вариантов Sup35 на плазмиде маскирует возможные эффекты шаперонов, поэтому в дальнейшем мы планируем получить штаммы с инсерциями GFP в гене SUP35 на хромосоме. *Работа поддержана РЦ РМукТ НП СПбГУ и грантами РФФИ 19-04-00173 и 20-34-70156.*

ФИЗИЧЕСКИЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ κ -КАРРАГИНАНА И ЖЕЛАТИНА ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ. МИКРОСТРУКТУРА И РЕОЛОГИЯ В ПРИСУТСТВИИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

Ю.Ф. Зуев¹, А.О. Макарова¹, О.С. Зуева², С.Р. Деркач³, С.А. Зиганшина⁴, А.Т. Губайдуллин⁵

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН; ²Казанский государственный энергетический университет; ³Мурманский государственный технический университет, ⁴Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского ФИЦ КазНЦ РАН; ⁵Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, Казань

Гидрогели представляют собой трехмерные гидрофильные полимерные сетки, способные абсорбировать и удерживать большое количество воды или биологических жидкостей в своей структуре. Гидрогели обладают многообещающими свойствами для широкого спектра биомедицинских приложений благодаря их биосовместимости, отличной транспортной проницаемости лекарственных препаратов и метаболитов, а также структурному сходству с природным внеклеточным матриксом.

В докладе представлены результаты комплексного исследования физических гидрогелей на основе κ -каррагинана и желатина под задачи доставки лекарственных и диагностических средств с помощью взаимодополняющих структурных методов и реологических экспериментов. Эксперименты по малоугловому рентгеновскому рассеянию выполнены на дифрактометре Nanostar фирмы Bruker AXS, оборудованном двумерным CCD-детектором HiStar. Изучение морфологии поверхности регистрировалось с использованием атомно-силового микроскопа Titanium (NT-MDT, Зеленоград, Россия). Реологические свойства гидрогелей исследованы на реометре MCR 102 (Anton Paar) с измерительной системой «плита-плита».

Охарактеризованы различные уровни структурной организации исследованных гидрогелей в состояниях золь и гель, в том числе в присутствии углеродных нанотрубок. Показано, что исследуемые гидрогели могут быть использованы для моделирования вязкой среды при изучении процессов диффузионного переноса белков.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проекта РФФИ 20-04-00157.

ПОЛИСАХАРИДНЫЕ ГИДРОГЕЛИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ, ВИТАМИНОВ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

О.С. Зуева¹, А.О. Макарова², Л.Р. Богданова², В.В. Сальников², Д.А. Файзуллин², П.В. Зеленихин³, О.Н. Ильинская³, Ю.Ф. Зуев²

¹Казанский государственный энергетический университет; ²Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН; ³Казанский федеральный университет

Представлены результаты комплексного исследования гелевых систем на основе полисахаридов для доставки лекарственных и диагностических средств для нескольких препаратов различного функционального происхождения, а именно ферментных препаратов биназы и липазы, витамина B9 (фолиевая кислота) и бриллиантового зеленого, как модели медицинского контрастного вещества. Полисахаридные гидрогели представляют собой биополимерную матрицу, которую можно успешно использовать для инкапсуляции биоактивных молекул, включая ферменты. Описаны методы модификации полисахаридных сетей при использовании различных сшивающих катионов, а также путем добавления наночастиц (углеродных нанотрубок), усиливающих прочностные характеристики гелевых систем. Представлен краткий обзор данных о структуре полисахаридных гидрогелей, стабилизируемых физическими связями, в качестве систем доставки для ферментативной терапии, витаминов и диагностического лечения. Гидрогели и полученные на их основе микрокапсулы широко используются для доставки лекарств, благодаря их биосовместимости и биodeградации. Показано, что биомедицинскому применению гидрогелей может препятствовать токсичность некоторых сшивающих катионов и присутствие углеродных нанотрубок, используемых для модификации систем доставки и придания им новых свойств.

ПОЛУЧЕНИЕ КОСТНОГО МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА 2 ЧЕЛОВЕКА И ОЦЕНКА ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НА МОДЕЛЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Д.Д. Лыкошин¹, М.А. Костромина¹, Ю.С. Лукина², В.В. Зайцев², И.И. Селезнёва³, Р.С. Есипов¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва; ²НМИЦ травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва; ³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Одним из перспективных подходов по созданию остеоиндуктивных материалов представляется иммобилизация на поверхности матрикса специфических факторов остеогенеза, таких как костный морфогенетический белок-2 (BMP-2). BMP-2 способствует росту и регенерации костной и хрящевой ткани, а также дифференцированию мезенхимальных клеток в остеобласты и миобласты. В лаборатории биофармацевтических технологий ИБХ РАН ранее был получен штамм-продуцент растворимой формы рекомбинантного костного морфогенетического белка 2 и разработан протокол его выделения и очистки. На культуре хондрогенных клеток мыши ATDC5 было показано, что полученный rhBMP-2 вызывает достоверное повышение уровня активности щелочной фосфатазы, продукции кальция и коллагена клетками по сравнению с контролем без rhBMP-2. Изучение транскрипционной активности генов-маркеров остеогенной дифференцировки на культурах клеток ATDC5 и стволовых клеток пульпы зуба человека (DPSC) при добавлении к ним rhBMP-2 (ИБХ РАН) продемонстрировало значительное увеличение экспрессии ключевых генов остеосинтеза: *Alpl* (в 6 раз), *Col3a1* (2.9 раз), *Smad-3* (74 раза), *Bmp-7* (2.3 раза), *Vdr* (9.7 раз) и *Bmp-6* (2.4 раза), *Smad-3* (9.1 раз), *Tgfb1* (8.1 раз) и *bglap* (3,9 раза). Сравнительную оценку биосовместимости и остеоиндуктивности материалов при включении в их состав rhBMP-2 проводили на модели подкожной имплантации крысам. В качестве материала в работе использовали фрагменты деминерализованной губчатой кости (ДКМ) человека, размером 10x5x5 мм. После эксплантации материала выполняли его гистологическое исследование, а также количественно измеряли содержание минерализованного кальция. Полученные данные свидетельствовали о выраженном остеоиндуктивном эффекте материалов, включающих рекомбинантный hBMP-2, в сравнении с контрольными группами. Отмечалось формирование структурированного неоколлагенового матрикса и «нового» волокнистого матрикса в зонах контакта с альгинатным гелем, содержащим rhBMP-2. Фрагменты ДКМ, заполненные альгинатным гелем, содержащим rhBMP-2, содержали больше минерализованного кальция (132 мг/г сухого веса), чем фрагменты без rhBMP-2 (30 мг/г сухого веса). Следующим этапом работы планируется изучение остеогенной активности материала-носителя с иммобилизованными ростовыми факторами и времени высвобождения rhBMP-2.

ДИЗАЙН УДОБНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

А.Г. Матвеевко, А.С. Михайличенко, Н.А. Зайцева, Г.А. Журавлева

Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Технологии редактирования генома бурно развиваются в последнее десятилетие, активно внедряясь как в прикладные, так и фундаментальные исследования. Во многом это связано с открытием системы CRISPR-Cas9, позволяющей осуществлять разрывы в ДНК с заданной последовательностью. Специфичная последовательность, называемая также последовательностью-мишенью, закодирована в направляющей РНК (gRNA), которая в большинстве гетерологичных клеточных систем экспрессируется с помощью промоторов малых ядерных РНК. В дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* с этой целью часто используется промотор SNR52. Интересной особенностью последовательности промотора SNR52 является наличие на 3'-конце неполного сайта узнавания и разрезания рестриктазы Ksp22I, который можно использовать для "бесшовного" клонирования последовательности-мишени, причём такое клонирование можно осуществить с помощью стандартных ПЦР, рестрикции и лигирования. Нами были сконструированы векторы для редактирования генома дрожжей *S. cerevisiae*, содержащие компоненты системы CRISPR-Cas9, в которые можно осуществлять клонирование мишеней с помощью Ksp22I. Во всех векторах мы использовали последовательность гена *Streptomyces pyogenes* Cas9 (SpCas9), слитого с сигналом ядерной локализации (NLS SV40), который экспрессируется под контролем промотора GPD, а также последовательность gRNA, экспрессируемая под контролем промотора SNR52. Мы дополнительно добавили последовательность, кодирующую His6 для контроля продукции белка Cas9 в дрожжах. Нами были получены векторы для экспрессии Cas9 и gRNA по-отдельности и вместе, а также векторы для одновременной экспрессии Cas9 и двух gRNA. Полученные векторы успешно были использованы для редактирования генов, непосредственно участвующих или влияющих на процесс трансляции. В частности, в штамме 74-D694 нам удалось внести точечные мутации в ген SUP35, кодирующий фактор терминации трансляции eRF3 и произвести дизрупции генов TEF1 и TEF2, кодирующих фактор элонгации трансляции eEF1A. Кроме того, мы получили штаммы, изогенные U-1A-D1628, с дизрупцией гена NAM7, кодирующего компонент системы NMD (nonsense-mediated RNA decay), и с полной делецией рамки считывания гена PSH1. Работа поддержана РЦ РМиКТ ИП СПбГУ и грантами РФФИ 18-14-00050 и РФФИ 20-34-70156.

РЕГУЛИРУЕМАЯ СУПЕР-ПРОДУКЦИЯ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ В БАКТЕРИЯХ *RHODOCOCCUS*

А.О. Шемякина, Е.Г. Гречишников, А.Д. Новиков, И.П. Токмакова, Т.И. Калинина, К.В. Лавров, А.С. Яненко

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Курчатовский геномный центр, Москва

Бактерии *Rhodococcus* являются перспективной платформой для применения в области биодеградации, биокатализа и биосинтеза различных соединений. Однако, их использование затруднено как из-за недостаточного количества экспрессионных штаммов, так и функционально охарактеризованных промоторов.

В настоящей работе мы изучили способность к экспрессии штамма *Rhodococcus rhodochrous* M33 и функционирование в нем набора рекомбинантных промоторов. Мы показали, что штамм поддерживает сверхэкспрессию целевого фермента (нитрилгидратазы) с использованием технологичных недорогих источников питания – ацетата и мочевины – без добавления факторов роста, что делает его подходящей платформой для экспрессии. Набор промоторов включал Ptuf (фактор элонгации Tu) и Psod (супероксиддисмутатаза) из *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, Pcp1 (изоцитратлиаза) из *Rhodococcus erythropolis* PR4 и Pnh (нитрилгидратаза) из *R. rhodochrous* M8. Уровни активности, возможности регуляции и зависимые от фазы роста

профили активности этих промоторов были изучены на производных штамма M33. Активности промоторов значительно различались ($P_{cr1} < P_{sod} \ll P_{tuf} < P_{nh}$), охватывая 103-кратный диапазон, и наиболее активные Pnh и Ptuf продуцировали до 30–50% целевого белка от фракции растворимых клеточных белков. Количественные оценки мРНК и целевого белка позволяют предположить уровень продукции Pnh близкий к теоретическому пределу экспрессии в бактериальной клетке. При этом в отличие от Ptuf (2-кратное изменение), возможности регуляции Pnh, Pcr1 и Psod были шире (6-кратное для Psod, 44-кратное для Pcr1 и 79-кратное для Pnh). Также был предложен метод отбора для лабораторной эволюции таких активных промоторов непосредственно в *Rhodococcus*. Промоторы обладали четырьмя различными профилями активности, включая три с пиком активности на разных фазах роста и один с постоянной активностью на протяжении всех фаз роста. Ptuf и Pcr1 не меняли свой профиль активности при разных условиях роста, тогда как профили Psod и Pnh менялись в зависимости от среды для выращивания.

Результаты позволяют осуществлять гибкое конструирование штаммов *Rhodococcus* с регулируемой супер-продукцией целевых рекомбинантных белков, достигающей уровня экспрессионной системы с промотором фага T7 в *E. coli*.

ФЕРМЕНТНЫЙ БИОТОПЛИВНЫЙ ЭЛЕМЕНТ НА ОСНОВЕ ГЛЮКОЗОКСИДАЗЫ И ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩЕГО ПОЛИМЕРА ПЭДОТ:ПСС С УЛУЧШЕННОЙ ПРОВОДИМОСТЬЮ СТАБИЛИЗИРОВАННОГО ПЭГДЭ

Ю.М. Парунова, М.В. Вишневская, П.М. Готовцев

НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Быстро развивающиеся области биоэлектроники и биологических интерфейсов с электронными датчиками, стимуляторами, имплантатами и сенсорами предъявляют повышенный спрос на материалы, которые одновременно являются биосовместимыми, стабильными и электропроводящими. Среди проводящих полимеров поли (3,4-этилендиокситиофен): поли (стирол-сульфонат) (ПЭДОТ:ПСС) является многообещающим материалом для биомедицинского применения из-за его стабильности и высокой проводимости [1]. Сшивание ПЭДОТ:ПСС часто необходимо для предотвращения расслоения и редиспергирования проводящих пленок ПЭДОТ:ПСС, помещенных в физиологические условия для длительного применения, однако сшивание может ограничивать его проводимость и биосовместимость. Целью работы была разработка потенциально имплантируемого биотопливного элемента (БТЭ) на основе стабилизированного ПЭДОТ:ПСС. Диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля (ПЭГДЭ) использовали в качестве эффективного сшивающего агента и проводящего наполнителя для ПЭДОТ:ПСС. Ранее [2] было показано, что реакция сшивания происходит через эпоксидное кольцо ПЭГДЭ, взаимодействуя с сульфоновыми группами цепей ПСС. В нашей работе было показано, что сшитые пленки ПЭГДЭ не диспергируются в водной среде, обладают повышенной электропроводностью. Анод БТЭ был изготовлен на основе электропроводящих карбонизированных волокон, ПЭДОТ:ПСС стабилизированного ПЭГДЭ и фермента глюкозооксидазы. В качестве материала катода использовали те же карбонизированные волокна с иммобилизованными на их поверхности наночастицами платины, полученными методом электровосстановления из гексахлорплатината калия [3]. Получившиеся анод и катод и ферментный БТЭ были протестированы в фосфатном буферном растворе. Электрохимические испытания показали, что БТЭ обладает мощностью 1,4 мВт при напряжении 340 мВ. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-29-23024мк.

1. Anatoly N. Reshetilov, Anna E. Kitova, Sergey E. Tarasov, Yulia V. Plekhanova, Alexander G. Bykov // *Application in Biomedical and Bioelectrochemical Systems*. RENSIT, 2020, 12(4):471–482.
2. Matteo Solazzo, Katarzyna Krukiewicz, Ainur Zhussupbekova, Karsten Fleischer, Manus J. Biggs and Michael G. Monaghan. // *J. Mater. Chem. B*, 2019, 7, 4811–4820.
3. Kyung Tae Kim, Sung-Ho Jin, Seung-Cheol Chang, Deog-Su Park. // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2013, Vol. 34, No 12, 3835–3839.

ВЫБОР ДЛИНЫ ДНК-ЗОНДА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦАХ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕЙ НУКЛЕАЗНУЮ ТРАНС-АКТИВНОСТЬ Cas12a

А.В. Иванов, И.В. Сафенкова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Белок Cas12a относится к бактериальной системе редактирования генома CRISPR-Cas12. Комплекс Cas12 с гайдовой (г) РНК обладает цис-активностью: специфично узнает и расщепляет целевую двуцепочечную (дц) ДНК. Активированный целевой дцДНК комплекс Cas12-гРНК приобретает транс-активность: неспецифично расщепляет зонд – одноцепочечную (оц) ДНК. На основании этого свойства был предложен высокочувствительный метод детекции ДНК – ДЕТЕКТ-R (Chen et al., Science, 2018), включающий в зонд пару флуорофор – гаситель. Для эффективного отделения и концентрирования аналита представляется перспективным перемещение зонда из раствора (как в ДЕТЕКТ R) на поверхность носителя. Однако влияние на транс-активность Cas12a расстояния между поверхностью носителя и оцДНК зондом не было изучено, что и стало целью настоящей работы. ДНК-зонд иммобилизовали на покрытых стрептавидином магнитных частицах (МЧ) двух типов – неправильной формы и сферических – со средним диаметром 1 мкм. Синтезировали девять фрагментов ДНК (зондов), состоящих из дц участка гена eGFP длиной 0, 20, 40, 80, 120, 160, 300, 500 и 1000 п.о. и отделенного от него ПЭГ-линкером оц 15 нт олиго-Т участка, несущего флуоресценцию. Со стороны дц конца располагался биотин для иммобилизации на МЧ. Длину дцДНК рассматривали как меру расстояния от поверхности МЧ до сайта транс-расщепления ДНК. LbCas12a инкубировали с гРНК, затем активировали целевой дцДНК и добавляли к суспензии МЧ-ДНК-зонд. После инкубации Cas12a с иммобилизованной ДНК проводили магнитную сепарацию и измеряли в надосадочной жидкости и осадке флуоресценцию, уровень которой отражал транс-активность Cas12a. Для МЧ неправильной формы наибольшая транс-активность наблюдалась для зонда, удаленного от поверхности на 160 п.о. Зонды, удаленные менее чем на 80 п.о., не подвергались расщеплению. Для сферических МЧ

расщепление происходило для всех зондов, однако наличие хотя бы 20 п.о. дцДНК, отделяющей оц участок зонда от поверхности, повышало транс-активность Cas12a до максимального уровня. Полученные результаты являются основой для разработки гетерогенных аналитических систем детекции нуклеиновых кислот на основе Cas12a.

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕССНОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДНК-ДЕТЕКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ФАЛЬСИФИЦИРОВАННЫХ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Д.С. Поправко, А.В. Иванов, Е.А. Зверева, И.В. Сафенкова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Фальсификация мясных продуктов – одна из важных проблем пищевой индустрии. Стандартным методом выявления фальсификатов является ПЦР, к существенным ограничениям которого относятся длительная и трудоемкая пробоподготовка, а также высокие требования к оборудованию и условиям проведения анализа. Методы изотермической амплификации, такие как рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА), позволяют провести амплификацию целевой ДНК значительно быстрее (за 15–20 мин) и при фиксированной температуре (39 °С). Цель исследования – разработка и характеристика системы на основе РПА для выявления фальсификатов мясных продуктов. Схема анализа предполагает использование пары праймеров, один из которых помечен флуоресцеином, а второй – биотином. В результате амплификации образуются двухцепочечные ДНК-фрагменты с двумя метками, выявляемые с помощью иммунохроматографической тест-полоски, в аналитической зоне которой иммобилизован стрептавидин, а на поверхности метки – наночастиц золота – находятся антитела против флуоресцеина. В качестве фальсифицирующих компонентов, часто добавляемых в более дорогую мясную продукцию, были рассмотрены курица и свинина. Проведен скрининг праймеров для амплификации специфичных участков гена цитохрома b курицы и свиньи. Выбраны последовательности, не дающие неспецифического сигнала на тест-полосках после РПА без добавления ДНК и отсутствующие у других видов животных, используемых в мясном производстве. Для оптимальных пар праймеров получены калибровочные зависимости выявления в экстрактах ДНК курицы и свиньи. Аналитические системы характеризовались пределами обнаружения 25 нг/мкл (ДНК курицы) и 8 нг/мкл (ДНК свиньи); продолжительность анализа – 30 минут. Для апробации разработанных систем использовали сырые и вареные продукты с 5%- и 20%-ным содержанием примесей курицы и свинины. Показано, что как полный цикл ДНК-экстракции с применением протеиназы К и изопропанола, так и 1-минутное перетирание пробы в Трис-буфере позволяют достоверно выявить фальсификаты. Разработанные тест-системы могут быть использованы для специфичного, быстрого и чувствительного визуального выявления примесей в мясопродуктах с минимальной пробоподготовкой и без использования дорогого оборудования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 19-16-00108.

ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ ИЗОЛЯТОВ *PANTOEA BRENNERI*

А.Д. Сулейманова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Нерастворимые фосфаты широко распространены в окружающей среде и являются малодоступными для растений соединениями, аккумулирующими фосфор. Известно, что фосфаты удобрений адсорбируются и осаждаются в первую очередь катионами Ca²⁺ и Al³⁺. Ранее из проб почвы республики Татарстан нами были выделены штаммы *Pantoea brenneri*. Было установлено, что штаммы обладают множественной PGP-активностью: способны к синтезу аммиака и цианидов, обладают протеолитической, хитиназной и целлюлазной активностью, синтезируют фитогормоны и сидерафоры, ингибируют рост фитопатогенных микроорганизмов. На данном этапе работы определяли способность штаммов к мобилизации почвенных фосфатов. Исследование проводили методом посева на селективные питательные среды: NBRIP, содержащую нерастворимый фосфат кальция или фосфат алюминия и PSM, содержащую фитат кальция в качестве единственного источника фосфора. Установлено, что все четыре исследуемых штамма *P. brenneri*, способны расти и образовывать зоны гидролиза на средах с фитатом и фосфатом кальция, но не алюминия. Считается, что фосфат кальция мобилизуется микроорганизмами лучше, чем другие нерастворимые фосфаты, поскольку в этом процессе значительную роль играет снижение pH среды, в то время как при растворении фосфатов железа и алюминия важны процессы хелатообразования с участием анионов, преимущественно, ди- и трикарбоновых кислот. Вероятно, в связи с этим, на среде, содержащей фосфат алюминия в качестве единственного источника фосфора, гало-зон обнаружено не было. Фитаты в почве являются не только резервуаром фосфора, но и связывают значительную часть микроэлементов, превращая их в комплексные нерастворимые конгломераты. Таким образом, исследуемые соединения, будучи потенциальными источниками макро- и микроэлементов для живых организмов, составляют нерастворимую фракцию почвы и являются потенциальным объектом для создания новых микробных биотехнологий для их утилизации. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана грантом РФФИ (проект № 21-76-000170).

РАЦИОНАЛЬНАЯ МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КОРИНЕБАКТЕРИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОДУЦЕНТА L-ВАЛИНА

М.Е. Шереметьева, Л.Е. Рябченко, К.Э. Ануфриев, Т.Е. Леонова, Т.В. Герасимова, А.С. Яненко

ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, НИЦ «Курчатовский институт»

L-Валин, наряду с L-изолейцином и L-лейцином (далее – валин, изолейцин, лейцин), относится к протеиногенным аминокислотам с разветвленной боковой цепью (BCAA, от англ. branched-chain amino acids). Будучи незаменимой аминокислотой, валин должен присутствовать в рационе человека и животных; он не только служит строительным материалом для белков, но регулирует белковый и энергетический обмен, участвует в нейротрансмиссии, является донором аминогруппы при образовании глутамата. Валин используется в пищевой промышленности, медицине и косметологии, но прежде всего в качестве кормовой добавки. Промышленный синтез валина, как правило, основан на конверсии растительного сырья штаммами-продуцентами.

тами с модифицированным геномом. Такие штаммы создаются при помощи рациональной метаболической инженерии – подхода, основанного на выборе наиболее подходящих генов-мишеней среди генов с известными функциями. Наше исследование посвящено применению методов метаболической инженерии для создания продуцента валина на базе почвенной бактерии *Corynebacterium glutamicum*, хорошо изученной с генетической и биохимической точек зрения, безопасной и простой в выращивании. Используя различные способы модификации генома, такие как обмен локусами при помощи интегративных суицидных плазмид и системы редактирования на основе CRISPR/Cpf1, мы получили ряд штаммов с модифицированными генами, отвечающими за биосинтез валина (ilvBNCDE), доступность предшественников (пируват) и кофакторов (НАДФН), образование побочных продуктов (изолейцин, лейцин, D-пантотенат и другие), импорт и экспорт ВСАА (brnQ и brnFE, соответственно), и провели анализ продуктивности данных штаммов. Сочетание наиболее эффективных модификаций позволило достичь уровня продукции около 70 г/л валина за 52 часа культивирования штаммов в лабораторных ферментерах. Перечень исследованных модификаций может использоваться для создания продуцентов других ВСАА и родственных соединений.

Конкурс молодых ученых

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ИЗ КЛЕТОК ЗЕЛеной МИКРОВОДОРОСЛИ *CHROMOCHLORIS ZOFINGIENSIS* НА ОСНОВЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПРОФИЛЕЙ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ПИГМЕНТОВ

Е.В. Заднепровская, Т.А. Козлова, С.И. Аллахвердиев

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

Каротиноиды обладают высоким уровнем антиоксидантной активности, в связи с чем имеют широкое применение в различных отраслях производства; особенно важны они для поддержания здоровья человека и животных. Одной из перспективных водорослей для производства коммерчески ценных ксантофиллов является *Chromochloris zofingiensis* (Donz) Fucikova & L.A. Lewis, с высокими показателями удельного роста клеток, высокой приспособляемостью к изменениям условий выращивания, сверхвысокой плотностью клеток, способностью накапливать значительные концентрации пигментов. Однако наличие плотных клеточных стенок осложняет экстракцию пигментов из биомассы данной водоросли.

Цель исследования – сравнить различные методы экстракции пигментов из клеток *Ch. zofingiensis* (IPPRAS C108) и выбрать наиболее эффективный из них. Водоросль выращивали в конических колбах объемом 0,5 л, на модифицированной среде Bold Basal Medium (BBM) при искусственном освещении 4,5 кЛк, температуре 23–25°C. Часть проб была установлена на шейкере, часть биомассы выращивалась при непрерывной продувке стерильным воздухом (0,1 л*мин⁻¹). Профили пигментов определяли с помощью ВЭЖХ (жидкостный хроматограф Shimadzu LC-10A), используя стандарты ксантофиллов.

Опыт включал в себя три экспериментальные линии. Первоначально все равные образцы биомассы *Ch. zofingiensis* подверглись механической обработке. Часть образцов далее была лиофилирована, а для оставшихся проб применялся метод ультразвуковой дезинтеграции клеточных стенок (10 минут на УЗ-гомогенизаторе – вторая линия; 40 минут – УЗ-ванна – третья экспериментальная линия). Затем все опытные образцы экстрагировались смесью органических растворителей (хлороформ: метанол = 2:1). Контрольные пробы не подвергались вышеуказанным манипуляциям, экстракция проводилась такой же смесью растворителей.

Установлено, с помощью ВЭЖХ анализа, что наилучшие показатели экстракции дали методы с применением УЗ-дезинтеграции клеточной оболочки микроводорослей (УЗ-ванна имеет ряд преимуществ и показала в 2–2,7 раз выше результаты, чем лиофилизация). Выяснено соотношение основных каротиноидов *Ch. zofingiensis*, которое составляет: α-каротин – 1,2%, β-каротин – 2,5–7%, лютеин – 36,0–37,8%, астаксантин – 2,09–4,54%. Также был проведен анализ профилей хлорофиллов и жирных кислот после разных методов экстракции.

ПОДАВЛЕНИЕ КАЛЬЦИНОЗА И СТРУКТУРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ ХИМИЧЕСКИ-СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ БИОПРОТЕЗОВ КЛАПАНОВ СЕРДЦА ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ МАТРИКС-СБЕРЕГАЮЩЕЙ ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННОЙ ОБРАБОТКИ

А.И. Звягина¹, В.В. Минайчев¹, А.И. Даль¹, З.И. Осморская², И.С. Фадеева¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Разработка функциональных биопротезов клапанов сердца с возможностью пожизненной имплантации является одной из важнейших задач современной биомедицины. Относительно молодым направлением в данной области исследований является разработка матрикс-сберегающих технологий получения (децеллюляризации и фиксации) биоматериалов, обеспечивающих условия для прикрепления и роста клеток на поверхности створок биопротезов, что в свою очередь способствует повышению их тромборезистентных и гемодинамических характеристик, а также обеспечивает возможность саморепарации и структурно-функционального ремоделирования. Создание подобных технологий может значительно снизить риск развития кальциноза и структурной дегенерации биоматериалов, которые являются основными причинами отказов биологических протезов клапанов через 12–15 лет функционирования. Целью данной работы является исследование биосовместимости, биостойкости и резистентности к кальцинозу ксеноперикардиальных биоматериалов, полученных с помощью рекомендуемых в литературе и авторских матрикс-сберегающих технологий предимплантационной обработки. В докладе будут освещены результаты сравнительного исследования структурной целостности ВКМ экспериментальных и используемых в клинике коммерческих биоматериалов, а также представлены результаты *in vitro* исследований их биосовместимости при непосредственном контакте с клетками и при предотвращении прямого контакта клеток с материалом. Также по результатам *in vivo* исследований будут

представлены данные по оценке устойчивости материалов к кальцификации и структурной дегенерации в модели долгосрочной (2 и 6 мес.) гетеротопической имплантации экспериментальным животным. Проведенные исследования показали, что повреждения внеклеточного матрикса в процессе агрессивной децеллюляризирующей обработки и последующей химической стабилизации лежат в основе механизма развития кальцификации и структурной дегенерации биоматериалов. Полученные результаты наглядно демонстрируют, что сохранение целостной структуры матрикса биоматериалов является необходимым условием для создания более долговечных, устойчивых к кальцинозу и усталостным разрывам биопротезов клапанов сердца. Работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН, при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 20-315-90101.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ Clr1, Clr2 и XlnR НА ЭКСПРЕССИЮ КАРБОГИДРАЗ У МИЦЕЛЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

В.Ю. Кислицин, А.М. Чулкин, А.М. Рожкова

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Грибы родов *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* широко используются в качестве продуцентов карбогидраз. *P. verruculosum* продуцирует комплекс целлюлаз с высокой β -глюкозидазной активностью. Экспрессия генов карбогидраз на транскрипционном уровне в грибах при наличии в среде индукторов (моно- и олигосахаридов) активируется транскрипционными факторами, но при высокой концентрации глюкозы блокируется механизмом катаболической репрессии. В грибах было выявлено несколько транскрипционных факторов, активирующих экспрессию карбогидраз: Clr1, Clr2, XlnR, AmyR, InuR и др. Набор генов, регулируемых каждым транскрипционным фактором, в мицелиальных грибах может значительно отличаться у разных организмов. Например, Xyr1 (XlnR) у *T. reesei*, *A. niger* и *P. oxalicum* активирует транскрипцию генов целлюлаз и гемицеллюлаз, тогда как у *Neurospora crassa* и *A. nidulans* его гомолог регулирует транскрипцию только гемицеллюлаз. Другой белок, Clr1, у *N. crassa* активирует транскрипцию генов, необходимых для деградации целлюлозы и гена *clr2*, основного транскрипционного активатора целлюлаз. Но у *A. nidulans* и *A. niger* ClrB, ортолог Clr2, играет незначительную роль в регуляции транскрипции целлюлаз. Между тем, для повышения продуктивности гриба-продуцента методами генетической инженерии важно знание функций активаторов у данного организма. Поэтому для установления влияния транскрипционных факторов Clr1, Clr2 и XlnR у *P. verruculosum* были клонированы их гены, после чего они были экспрессированы под конститутивным промотором. В результате конститутивная экспрессия гена *clr1* повысила целлюлогидролазную активность в 1,8 раза на 3 сутки, а β -глюкозидазную – в 4 раза на 6-ые сутки. Ксиланазная активность уменьшилась в 2 раза, эндоглюканазная активность не изменилась. При конститутивной экспрессии гена *clr2* целлюлогидролазная активность возросла в 2,4 раза на 4 сутки ферментации, β -глюкозидазная – в 2,8 раза к концу ферментации, а ксиланазная активность уменьшилась в 2 раза, эндоглюканазная не изменилась. Таким образом, оба транскрипционных фактора Clr1 и Clr2 активируют у *P. verruculosum* экспрессию целлюлогидролаз. Конститутивная экспрессия гена *xlnR* повысила удельную ксиланазную активность в 2,3 раза, эндоглюканазную – в 1,4 раза, целлюлогидролазная и β -глюкозидазная активности значительно не изменились. Работа поддержана грантом РФФИ № 18-29-07070.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ Фуллеренолов. РОЛЬ КИСЛОРОДОСОДЕРЖАЩИХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ. БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МОНИТОРИНГ

Е.С. Ковель^{1,2}, А.С. Сачкова³, Н.С. Кудряшева^{1,4}

¹Институт биофизики СО РАН и ²Институт физики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск; ³Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск; ⁴Сибирский федеральный университет, Красноярск

Фуллеренолы – водорастворимые биологически активные наночастицы, полигидроксильированные производные фуллеренов, перспективные агенты для разработки лекарственных препаратов. В работе проведен анализ токсичности и антиоксидантной активности двух групп фуллеренолов с различным количеством кислородсодержащих заместителей: (1) $C_{60}O_y(OH)_x$, $C_{60},70O_y(OH)_x$, где $x + y = 24-28$ и (2) $C_{60},70O_y(OH)_x$, $Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$, $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40-42$. Для мониторинга токсичности растворов фуллеренолов использовали люминесцентные клеточные и ферментативные биотесты (соответственно светящиеся морские бактерии и их ферментативные реакции), где главный тестируемый параметр физиологической активности – интенсивность биолюминесценции. Для характеристики токсичности фуллеренолов определяли их концентрации, ингибирующие биолюминесценцию тестовых систем. Антиоксидантную активность фуллеренолов изучали в растворе модельного окислителя (1,4-бензохинона); по уменьшению общей и окислительной токсичности растворов рассчитывали коэффициенты детоксикации (соответственно DGT и DOxT). Все фуллеренолы оказывали токсическое действие при высоких концентрациях ($>0,01$ г/л); их антиоксидантная активность проявлялась при низких и сверхнизких концентрациях ($<0,001$ г/л). Установлено, что количественные характеристики токсичности и антиоксидантной активности фуллеренолов (эффективные концентрации, диапазоны концентраций, DGT и DOxT) зависят от количества кислородсодержащих заместителей. Фуллеренолы с меньшим количеством кислородсодержащих заместителей ($x+y=24-28$) характеризовались меньшей токсичностью и большей антиоксидантной активностью. Различия в свойствах фуллеренолов связаны с их каталитической активностью (обусловленной электронно-акцепторными свойствами), способностью нейтрализовывать радикальные формы кислорода и содержанием этих форм в водных растворах. В работе продемонстрирован высокий потенциал люминесцентных биотестов для сравнения токсичности и антиоксидантной активности углеродных наноструктур. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда науки в рамках научных проектов № 18-29-19003; №20-44-243001.

qPCR ДЕТЕКЦИЯ *PECTOBACTERIUM PARMENTIERI*: ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ОБНАРУЖЕНИЯ ПАТОГЕНА И ОЦЕНКИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

А.А. Лукьянова, П.В. Евсеев², К.А. Мирошников²

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Мягкая гниль и черная ножка картофеля – взаимосвязанные заболевания, развитие которых на растениях, и клубнях ведет к серьезным экономическим потерям, связанным с ухудшением всхожести посевного материала, гибелью растений и порчей товарного картофеля в результате развития гнили. Причиной этих заболеваний является инфицирование растений бактериями семейства *Pectobacteriaceae*. В частности, одним из представителей этой группы является *Pectobacterium parmentieri* (Ppa). Этот вид был впервые описан в 2016 году как сестринская группа относительно ранее известного патогена васоби *P. wasabiae* (Pwa). Для контроля распространения пектобактериальных инфекций необходимо проводить оценку зараженности картофеля. Кроме того, информация о видовом разнообразии пектобактерий позволила бы использовать обработку растительного материала смесями бактериофагов, показавшую себя как хорошее средство для предотвращения бактериальных гнилей. В случае Ppa такая система выявления еще не разработана. Ранее были опубликованы методы детекции на основе qPCR близкородственного патогена Pwa. Одна такая система была разработана на основе амплификации гена фитазы *arpA*, а другая использует YD *great region*, однако обе эти системы были разработаны до выделения Ppa в качестве отдельного вида и не позволяют различить Pwa и Ppa. Целью данной работы была разработка и валидация pPCR системы детекции Ppa. Поиск участков генома для амплификации был проведен с использованием разработанного в лаборатории алгоритма поиска видоспецифичных последовательностей. В результате был выбран ген белка, содержащего анкириновые повторы. Были сконструированы праймеры и зонд для амплификации участка в 218 п.о. Точность идентификации была проверена на наборе из 109 штаммов, включавшем в представителей как всех наиболее распространенных видов *Pectobacteriaceae*, так и изоляты сопутствующей микробиоты картофеля. Амплификация происходила только с изолятами Ppa. Эффективность ПЦР была близка к 100%, а предел детекции – 10² копий/мл. Кросс-амплификации с ДНК картофеля показано не было. Патоген был успешно обнаружен на искусственно инфицированных клубнях. Разработанная qPCR система позволяет детектировать Ppa с высокой точностью и чувствительностью, и может быть использована для оценки зараженности растительных образцов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК *IN VITRO*

В.В. Минайчев^{1,2}, И.С. Фадеева^{1,2}, И.В. Смирнов², А.Ю. Тетерина², Р.С. Фадеев¹, П.В. Михеева², М.И. Кобякова^{1,2}, А.И. Звягина¹, В.С. Акатов¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино; ²Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва

Материалы на основе различных кальцийфосфатных соединений (КФС) являются самыми распространенными среди синтетических остеопластических материалов. Особую актуальность сегодня приобретает разработка подходов к синтезу КФС приближенных по своей структуре, составу и биологическим свойствам к КФС нативной костной ткани. Одним из таких подходов является низкотемпературная химическая трансформация (НХТ). Целью данной работы было исследование влияния различных КФС, полученных методом НХТ, на жизнеспособность клеток *in vitro*. В работе использовались следующие КФС: дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД), октакальций фосфат (ОКФ) и гидроксиапатит (ГАп). Исследованные КФС были синтезированы в институте металлургии и материаловедения им. А. А. Байкова РАН. ДКФД синтезировался методом химического осаждения. ОКФ и ГАп последовательно синтезировались из ДКФД с применением низкотемпературной химической трансформации по схеме ДКФД→ОКФ→ГАп. Исследование влияния КФС на жизнеспособность клеток проводилось с использованием клеточной линии человеческой остеосаркомы MG-63. Клетки культивировались с ДКФД, ОКФ, ГАп в концентрациях 2, 1, 0,5 и 0,25 мг/мл в течение 72 часов. Жизнеспособность клеток после инкубации КФС оценивали по интенсивности восстановления метаболического индикатора AlamarBlue. Показано, что все исследованные КФС не оказывали существенного цитотоксического действия на клетки. Наименьший цитотоксический эффект оказывал ДКФД, который не влиял на жизнеспособность клеток даже в максимальной концентрации 2 мг/мл. ОКФ и ГАп незначительно снижали жизнеспособность клеток до 80% относительно контроля при концентрации 2 мг/мл. При последующем уменьшении концентрации все исследованные КФС не оказывали влияния на жизнеспособность клеток MG-63. Таким образом, полученные данные указывают на перспективность использования подхода НХТ для создания новых КФС-остеопластических материалов. Однако, остается открытым вопрос об остеогенных свойствах и провоспалительных свойствах данных КФС, а также их физико-химических трансформаций в физиологических средах, что является дальнейшими этапами в цикле работ. Работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН, при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ (СП-1275.2019.4) и РНФ в рамках проекта № 21-73-20251.

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ИНТЕГРИНА $\alpha\beta 3$ МЕТОДОМ CRISPR/Cas9 SAM-AКТИВАЦИИ

Е.В. Сухинина, А.Г. Першина *Сибирский государственный медицинский университет, Томск*

Переносчики, направляемые лигандом $\alpha\beta 3$ интегрина – RGD-последовательностью – предлагаются для доставки в опухоль химиотерапевтических препаратов, нуклеиновых кислот, радионуклидов, пептидов и белков. Стандартный подход к исследованию эффективности адресных препаратов к $\alpha\beta 3$ интегрину основан на использовании клеточных линий с разным уровнем экспрессии интегрина. Однако эти клеточные линии различаются и по другим биологическим характеристикам. Применение модифицированных линий с повышенной экспрессией $\alpha\beta 3$ позволит делать более обоснованное заключение об эффективности таргетного препарата, так как в этом случае контрольная (не модифицированная) и опытная клеточные линии

будут различаться только по одному параметру. Целью работы было получить линии клеток карциномы молочной железы мыши 4T1 и аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 с повышенной экспрессией интегрин $\alpha\beta 3$. Для активации экспрессии применяли метод SAM-активации (synergistic activation mediator – медиатор синергичной активации), разработанный в лаборатории Feng Zhang и основанный на системе CRISPR/Cas9. Интеграция за счет использования лентивирусной трансдукции в геном клетки трансгенов, кодирующих компоненты SAM-комплекса, обеспечивает стабильную активацию экспрессии целевого гена. Нами сконструировано 11 рекомбинантных плазмид, кодирующих sgRNA к промоторным областям генов ITGAV и ITGB3 *H. sapiens* и itgav и itgb3 *M. musculus*; наработаны 13 типов лентивирусных частиц, содержащих ДНК компонентов SAM-комплекса – dCas-VP64, MS2-p65-HSF1 и 11 различных sgRNA к промоторным областям генов, кодирующих αv и $\beta 3$ субъединицы интегрин мыши и человека. После трансдукции клеток данными лентивирусами и отбора устойчивых к соответствующим антибиотикам клонов, методами qRT-PCR и вестерн-блота было подтверждено увеличение экспрессии генов αv и $\beta 3$ субъединиц интегрин. Таким образом, нами получены две геномно-модифицированные линии клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231_27 и карциномы молочной железы мыши 4T1_27 с повышенной экспрессией $\alpha\text{v}\beta 3$ интегрин.

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

М.Н. Терешин, А.В. Крюкова, Б.З. Елецкая, Т.Д. Мелихова, Д.А. Макаров, В.Н. Степаненко, И.В. Мягих

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

Высокоспецифичные протеазы представляют собой удобный инструмент для удаления аффинных меток или для контролируемого расщепления сшитых белков. Одним из широко применяемых для этих целей ферментов является энтеропептидаза человека (HEP), а именно – её легкая цепь (L-HEP). L-HEP является сериновой протеазой и расщепляет пептидную связь после целевой последовательности DDDDR или DDDDK. Традиционным путем применения L-HEP для контролируемого отщепления белков носителей и других меток является гидролиз в растворе. Однако использование растворенной формы протеазы имеет ряд недостатков, снижающих экономическую эффективность соответствующих процессов: наличие нескольких дополнительных стадий, необходимость тщательной доочистки реакционной смеси, невозможность повторного использования фермента. В связи с этим получение иммобилизованных форм высокоспецифичных протеаз, в частности, энтеропептидазы, является актуальной задачей. Однако и в данном случае возникает ряд трудностей. К примеру, низкая стабильность полученных препаратов или значительное снижение ферментативной активности, по сравнению с растворимой формой. Основные результаты. На Опытном биотехнологическом производстве ИБХ РАН была получена иммобилизованная форма L-HEP. В качестве матрицы использовался коммерческий сорбент Sepharose CL-4B. Легкая цепь энтеропептидазы была получена нами ранее рекомбинантным путем. Для иммобилизации использовался широко применяемый бромциановый способ. На модельном белке, содержащем сайт распознавания L-HEP, было показана эффективность полученного ферментативного препарата. При времени контакта раствора модельного белка с иммобилизованной L-HEP 3 минуты степень гидролиза составляла не менее 90%. Степень гидролиза оценивалась денситометрическим путем: по соотношению интенсивности полос продуктов расщепления и исходного гибридного белка на полиакриламидном геле. Была показана возможность неоднократного повторного использования иммобилизованной L-HEP. После 20 циклов использования наблюдалось снижение эффективности гидролиза в пределах 15%. Планируется дальнейшее изучение операционных свойств полученного ферментативного препарата.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ ВИРУСА SARS-CoV-2 С ПОМОЩЬЮ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ

И.О. Целых, Д.В. Данилов, А.А. Шишова

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва

Глобальное развитие пандемии COVID19 объединило ученых в поиске и разработке новых профилактических и терапевтических препаратов, а также диагностических платформ, которые могли бы оказаться эффективными средствами в борьбе с патогеном SARS-CoV-2. Для борьбы с SARS-CoV-2 применяются не только противовирусные соединения, но и иммунобиологические препараты такие как вакцины и антитела. Рекомбинантные моноклональные антитела представляют новый класс терапевтических препаратов, разрабатываемых в биофармацевтической промышленности. Их главное преимущество – низкая токсичность и способность специфично связываться с целевой мишенью. Целью данной работы стало получение панели моноклональных антител на основе одноцепочечных переменных фрагментов, способных специфично связываться с вирусом SARS-CoV-2. В ходе работы был получен комбинаторный репертуар генов легких (λ , κ) и тяжелых цепей антител из периферических мононуклеарных клеток крови иммунного донора. В дальнейшем весь репертуар был лигирован в фагмиду pHEN2, и трансформирован в клетки *E. coli* TG1. Представленное разнообразие индивидуальных вариантов составило 1.4×10^8 . После чего была наработана фаговая библиотека одноцепочечных антител (scFv), представляющая собой популяцию бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности в составе химерного белка антигенсвязывающий домен антитела. Селекцию целевых вариантов антител проводили с помощью процедуры био-пэннинга – аффинного обогащения библиотеки вариантами антител, специфичными к целевым антигенам. В качестве целевых антигенов использовали S-белок коронавируса SARS-CoV-2, ответственного за проникновение вируса в клетку, и инактивированный вирус SARS-CoV-2. После четырех раундов селекции была отобрана панель моноклональных фагов, для которых при помощи секвенирования была подтверждена принадлежность гена интереса к генам иммуноглобулинов. Для простоты наработки целевые белки были лигированы в плазмиду pQE60 и нарабатывались в клетках *E. coli* JM109, после чего были выделены при помощи метал-аффинного сорбента. Для полученных препаратов scFv-антител был проведен функциональный анализ на предмет связывания с интересующими антигенами. Высокоаффинные и специфичные варианты антител были успешно использованы в иммуоферментном анализе.

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

Устные доклады

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ФОТОСИСТЕМЫ 1 ХЛОРОФИЛЛ *f*-СОДЕРЖАЩИХ ОРГАНИЗМОВ

К. Като¹, Т. Шинода², Р. Нагао¹, Ф. Акита¹, Н. Миязаки¹, Д.-Р. Шен¹, Т. Томо², С.И. Аллахвердиев^{3,4}

¹Национальный университет Окаямы, Окаяма, Япония; ²Токийский университет науки, Токио, Япония; ³Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва; ⁴Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино

Фотосинтетический аппарат является эффективным и слаженно работающим механизмом, обуславливающим превращение энергии света в энергию химических связей. Хлорофиллы (Хл) – ключевые пигменты фотосинтеза, необходимые для сбора и передачи энергии, которая требуется на образование органических веществ. Для эффективного использования широкого диапазона спектра солнечной энергии существуют различные виды Хл, отличающиеся по своей молекулярной структуре. В бактериальных сообществах распределение света крайне неравномерно, а под поверхностью интенсивность дальнего красного света превышает интенсивность фотосинтетически активной радиации. Для того, чтобы иметь возможность использовать дальний красный свет для окисленного фотосинтеза, некоторые цианобактерии синтезируют Хл *f* в результате процесса фотоакклимации на дальнем красном свете. Однако долгое время местоположение и точные функции Хл *f* в процессе переноса электронов оставались под вопросом. С помощью метода криоэлектронной микроскопии мы проанализировали структуры фотосистемы 1 цианобактерии *Halomicronema hongdechloris*, выращенной в условиях белого и дальнего красного освещения. Выявлено наличие семи молекул Хл *f* в периферийной области кора фотосистемы 1, образующихся при культивировании *H. hongdechloris* на дальнем красном свете. Под действием дальнего красного света изменяется экспрессия генов и происходят перестройки в структурах некоторых субъединиц фотосистемы 1. Обнаружено, что все семь молекул Хл *f* участвуют в переносе энергии с периферийной области к молекулам реакционного центра. Работа выполнена при финансовой поддержке RFBR-JSPS (грант 19-54-50002ЯФ), и частично Российского научного фонда (грант 19-14-00118).

1. Kato et al., *Nature Comm.* (2020) v. 11, p. 238-248

РОЛЬ БЕЛКОВОГО ОКРУЖЕНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛОВ В ТОНКОЙ НАСТРОЙКЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ И РЕДОКС-СВОЙСТВ КОФАКТОРОВ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Т.Ю. Фуфина¹, Г.К. Селиханов^{1,2}, О.А. Третчикова¹, А.Г. Габдулхаков², Л.Г. Васильева¹

¹ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»; ²Институт фундаментальных проблем биологии РАН; ³Институт белка РАН, Пущино

Солнечная энергия трансформируется в химическую энергию и запасается в клетках живых организмов, способных к фотосинтезу. Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* является структурным аналогом более сложно устроенной фотосистемы-2 высших растений и водорослей. Это интегральный пигмент-белковый комплекс, состоящий из трех белковых субъединиц, с которыми нековалентно связаны десять кофакторов, представленных четырьмя молекулами бактериохлорофилла (БХл), двумя молекулами бактериофеофитина, двумя хинонами, атомом негемового железа и молекулой каротиноида. Кофакторы организованы в две псевдо-симметричные цепи переноса электрона, А и В, из которых только цепь А функционально активна. Фотохимическая реакция в РЦ начинается с поглощения кванта света и перехода первичного донора электрона, димера БХл Р, в возбужденное состояние с последующей передачей электрона от Р* на ближайший акцептор, мономерный БХл, и далее по цепи кофакторов. Квантовая эффективность первых стадий фотохимического разделения зарядов в РЦ, происходящих в пико- и наносекундном диапазоне времени, чрезвычайно высока (99%). К настоящему времени получены данные, свидетельствующие о том, что белок РЦ не только связывает кофакторы внутри мембраны на определенном расстоянии и в определенной ориентации относительно друг друга, но также колебания и конформационные изменения белка способствуют протеканию прямых реакций и предотвращают обратные реакции. Исследование механизмов первичных процессов фотосинтеза является важным как для углубленного понимания фундаментальных основ фотосинтеза, так и для создания потенциала при конструировании эффективных искусственных преобразователей солнечной энергии. Для изучения роли белка в обеспечении эффективности фотохимического процесса в РЦ в данной работе используется широкий набор методов, в том числе оптическая спектроскопия высокого временного разрешения, направленный мутагенез и кристаллизация РЦ, электрохимическое титрование, другие биохимические, биофизические и молекулярно-биологические подходы. В докладе будут представлены данные по расшифровке кристаллической структуры РЦ *Rhodobacter sphaeroides* с аминокислотным замещением F(M197)N, позволяющие объяснить ряд свойств этого мутантного комплекса.

ЛЕКТИНЫ РАСТЕНИЙ: РАЗНООБРАЗИЕ, ОСОБЕННОСТИ И ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ

Т.А. Горшкова^{1,2}, Н.В. Петрова¹

¹Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН, Казань; ²Институт физиологии, ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар

Лектины – белки, содержащие углевод-связывающие домены, но не осуществляющие каталитических реакций с углеводами. Такие белки присутствуют в различных царствах живого, но некоторые их семейства особенно распространены в растениях. Лектины растений широко используются в прикладном плане – от использования в качестве инструментов для выделения гликозилированных белков животных, как конканавалин А, до применения в качестве ядов, как рицин. При этом биологические функции и механизмы действия лектинов в самом растении изучены слабо. Из многих сотен лектинов, кодируемых в геноме каждого растения, они известны лишь для единиц, да и то, в основном, по аналогии со сходными белками жи-

вотных. Шире других известна защитная функция лектинов, связанная с распознаванием углеводных мотивов различных патогенов, но большинство генов лектинов экспрессируется и в отсутствии инфицирующих организмов. Некоторые лектины могут накапливаться в тканях растений (в основном, в семенах), но многие присутствуют в минорных количествах. Изучение представленности генов белков с лектиновыми доменами в геномах льна и кукурузы выявило сотни генов, которые группируются в полтора десятка семейств. Транскриптомный анализ экспрессии этих генов в сочетании с кластерным анализом для большого количества образцов позволили выявить приуроченность экспрессии многих генов к клеткам, формирующим клеточную стенку определенного типа. Для растений характерно расширенное представительство лектинов, содержащих киназный домен, что напрямую связывает эти белки с функционированием сигнальных систем. Лимитирующим звеном в понимании функций растительных лектинов служит слабая характеристика тонкой углеводной специфичности большинства представителей. Разрабатываются подходы для изучения специфических взаимодействий лектинов и полисахаридов из клеточных стенок различных типов. *Работа поддержана грантом РФФ 20-64-47036.*

ЭФФЕКТЫ ФЛЮИДИЗАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ПЕРВИЧНЫМИ АЛИФАТИЧЕСКИМИ СПИРТАМИ У ЦИАНОБАКТЕРИЙ

К.С. Миронов, Д.А. Лось *Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва*

Цианобактерии представляют собой прокариотические фотосинтезирующие микроорганизмы, которые находят широкое применение в биотехнологии, а также изучении фундаментальных механизмов фотосинтеза и стрессовой адаптации. В настоящее время известно несколько штаммов цианобактерий, модифицированных генетически для производства биоспиртов. Между тем эффекты алифатических первичных спиртов на клетки цианобактерий изучены достаточно слабо.

Нами было проведено исследование действия первичных алифатических спиртов: от метанола до нонан-1-ола — на клеточные мембраны, а также на экспрессию генов десатураз жирных кислот для модельной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Мы обнаружили, что наиболее «ярким» представителем данной группы веществ по действию на клеточные мембраны, а также на экспрессию генов, представляется гексан-1-ол. Мы продемонстрировали, что клеточная гибель, вызванная данным спиртом связана с его сильнейшим эффектом мембранного флюидизера, а также со способностью репрессировать гены десатураз жирных кислот, что приводило к изменению степени ненасыщенности клеточных мембран цианобактерий [1].

Данный спирт был нами использован для изучения транскриптомики ответа на действие спиртов у *Synechocystis*. Мы провели сравнение полученных данных для гексан-1-ола с опубликованными ранее данными по бензиловому спирту и бутан-1-олу. Оказалось, что все спирты индуцировали примерно одну и ту же группу генов, около 20, т.н. генов «общего стрессового ответа», повышение экспрессии которых в клетках цианобактерий сопровождается формированием ответа на действие различных стрессовых факторов. Особенности экспрессии некоторых из них были детально изучены. Исследование транскриптомики ответа клеток на действие спирта также выявило ряд взаимодействующих по принципу антисмысловых пар РНК-РНК, роль которых до сих пор не ясна [2]. *Работа проводилась при финансовой поддержке РФФ № 19-74-10100 и № 21-74-30003.*

1. Mironov K. S. et al. Membrane physical state and stress regulation in *Synechocystis*: fluidizing alcohols repress fatty acid desaturation // *The Plant Journal*. – 2018. – Т. 96. – №. 5. – С. 1007-1017.
2. Mironov K. S. et al. Alcohol stress on cyanobacterial membranes: New insights revealed by transcriptomics // *Gene*. – 2021. – Т. 764. – С. 145055.

БИОХИМИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕИНКИНАЗЫ SRPK ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS* sp. PCC 6803

А.А. Зорина¹, О.И. Клычников², А.В. Леусенко¹

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Бактерии обладают удивительной способностью к адаптации, используя при этом разнообразные стратегии выживания. Данные стратегии могут включать глобальные перестройки всего метаболизма клеток, отражающуюся в изменении их морфологии, размере, росте. Значительный вклад в адаптацию бактерий вносят пост-трансляционные модификации белков. Исследования их у бактерий начались с предположения, что у них нет многих признаков, присущих сложным организмам. На данный момент уже не вызывает сомнений, что особая группа ферментов (серин-треониновые протеинкиназы – СТПК) играет значительную роль в формировании внутренней среды прокариотической клетки. Важно заметить, что исследование функционирования сигнальных систем бактерий, к которым относятся СТПК, не является исключительно фундаментальным вопросом. Понимание биологических основ и разработка методических приемов воздействия открывает дорогу для использования живых организмов в качестве биологических фабрик по синтезу хозяйственно-полезных веществ. В своей работе мы стремились получить целевой белок протеинкиназы и в условиях *in vitro* изучить некоторые особенности его работы. Так, в реакции *in vitro* нами было показано, что фермент обладает активностью, соответственно может непосредственно влиять на протекание различных внутриклеточных процессов. Из «предложенных» субстратов протеинкиназа была способна модифицировать только один – казеин. Это свидетельствует об определенной избирательности фермента. Также нам удалось показать, что исследуемый белок для своей работы требует присутствия катионов марганца, а не магния, что наблюдается гораздо чаще. Добавление катионов кальция в реакцию лишь незначительно сказалось на активности фермента. Кроме этого, мы оценивали активность протеинкиназы по отношению к казеину при разных значениях pH, установив, что в диапазоне физиологических значений 6.5–8.0 активность не менялась. Таким образом, активность ранее неизученного белка и определив параметры, влияющие на его активность. Эти результаты будут служить фундаментом дальнейшей работы. *Работа авторов проводится при частичной поддержке РФФИ (грант № 20-04-00757).*

НОВЫЙ МЕХАНИЗМ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ВИРУСАМ

Н.А. Спеченкова^{1,2}, И.А. Фесенко², Н.О. Калинина^{1,2}, Т.П. Супрунова¹, М.Э. Тальянский^{1,2}

¹ООО Международная лаборатория «Резистом»; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Использование двуцепочечных РНК (дцРНК) является одним из наиболее перспективных методов придания устойчивости к вирусам растений путём индукции РНК-интерференции. Идентификация генов, контролирующих восприимчивость растений к вирусам, является важным этапом разработки оптимизированных программ защиты растений. Ранее нами было проведено детальное изучение роли основных метаболитов метионинового цикла (МЦ) в устойчивости/восприимчивости растений картофеля к стрессам, с использованием протеомного, транскриптомного и метаболомного подходов. В частности, было установлено, что синтез белков, участвующих в цикле метилирования РНК (основных ферментов МЦ), подавлен в восприимчивом сорте Чикаго в условиях теплового стресса и вирусной инфекции PVY (Y вирусом картофеля) [Fesenko et al. 2020]. И напротив, у устойчивого сорта Гала представленность основных ферментов МЦ повышалась в ответ на вирусную инфекцию независимо от температуры. Предполагается, что повышение представленности различных наборов ферментов, связанных с МЦ, приводят к увеличению накопления S-аденозилметионина (SAM), ключевого компонента МЦ, который является универсальным донором метильной группы в реакциях трансметилирования. В отличие от сорта Гала, у сорта Чикаго уровень SAM значительно снижен, что коррелирует с его высокой восприимчивостью к PVY при повышенной температуре. Соответственно в этих условиях показатели индекса метилирования SAM:SAH (где SAH – S-аденозилгомоцистеин), свидетельствующие об изменениях интенсивности процессов метилирования в клетке, составляют $73,61 \pm 3,78$ для сорта Гала и $3,62 \pm 0,23$ для сорта Чикаго, а уровень эндогенного метионина у сорта Гала возрастает в среднем в 2 раза [Spechenkova et al. 2021]. В совокупности эти данные позволяют предполагать, что МЦ и его основная функция трансметилирования играют важную роль в устойчивости или восприимчивости растений к инфекции PVY. Таким образом, гены ферментов МЦ могут выступать в роли генов-мишеней для индукции РНК-интерференции. Работа финансируется в соответствии с Соглашением о предоставлении гранта Фонда «Сколково» № Г18/19 от 26.04.19.

METALLOTOLERANT AND DROUGHT RESISTANT *BACILLUS* sp. AND *ARTHROBACTER* sp. ENHANCE BIOCHEMICAL PROPERTIES AND METAL ACCUMULATION IN INDIAN MUSTARD (МЕТАЛЛОТОЛЕРАНТНЫЕ И ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫЕ БАКТЕРИИ *BACILLUS* sp. И *ARTHROBACTER* sp. УЛУЧШАЮТ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ПОВЫШАЮТ АККУМУЛЯЦИЮ МЕТАЛЛОВ У ИНДИЙСКОЙ ГОРЧИЦЫ)

A. Kumar¹, Tripti¹, М.Г. Малева¹, Г.Г. Борисова¹, О.В. Воропаева¹, М. Rajkumar²

¹Уральский федеральный университет, Екатеринбург; ²Bharathiar University, Coimbatore, India

Metal contamination and drought are two important factors, which adversely affect plant and microbiota growth in anthropogenically impacted soil. Two bacterial isolates *Bacillus* sp. strain 16a and *Arthrobacter* sp. strain 16b identified by 16s rRNA gene sequencing, showed multiple plant growth promoting attributes (ACC deaminase, siderophore production, phosphate solubilization, ammonia production, hydrogen cyanide and indole acetic acid production), were isolated from the multi-metal contaminated rhizosphere soil of *Tussilago farfara*. Both strains showed higher tolerance for Cu, Ni, Cd, Pb and Zn on solid agar medium, however it showed maximum tolerance for Cu under liquid medium. Moreover, both strains showed high potential to tolerate drought conditions up to -0.73 MPa when supplemented with polyethylene glycol (PEG-6000) under 200 mg/L of Cu concentration in liquid medium. Application of both the strains significantly increased the root and shoot length, fresh and dry biomass and Cu accumulation in roots of mustard under Cu rich condition (100 and 200 mg/kg soil) as compared to only Cu contaminated soil. However, at 200 mg Cu/kg soil, maximum result for biomasses, chlorophyll content, and antioxidant enzyme activity (superoxide dismutase, catalase, and ascorbate and glutathione peroxidases) were observed for strain 16a whereas it was maximum for strain 16b at 100 mg Cu/kg. Both strains mobilized the Cu in soil, resulted in enhanced Cu accumulation in roots, which possibly triggered higher production of non-protein, and protein soluble thiols thus chelate Cu in root and promote meager transfer in shoot, therefore prevent detrimental effect on plant growth. Altogether, *Bacillus* sp. strain 16a showed higher potential for the growth, development and Cu accumulation in mustard plant and can help in phytostabilization of moderately drought and Cu contaminated sites. The work was funded by RFBR and DST according to the Research Project No. 19-516-45006.

AMELIORATION OF BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND PHYTOREMEDIATION POTENTIAL OF SUNFLOWER USING METAL TOLERANT PLANT GROWTH PROMOTING ENDOPHYTE *PSEUDOMONAS LURIDA* STRAIN E0026 (УЛУЧШЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И ФИТОРЕМЕДИАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА ДОБАВЛЕНИЕМ МЕТАЛЛОУСТОЙЧИВЫХ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИХ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ ШТАММА *PSEUDOMONAS LURIDA* E0026)

Tripti¹, A. Kumar¹, О.В. Воропаева¹, М.Г. Малева¹, К.А. Паниковская¹, Г.Г. Борисова¹, М. Rajkumar², L.B. Bruno²

¹Уральский федеральный университет, Екатеринбург; ²Bharathiar University, Coimbatore, India

Industrialization has resulted in severe metal pollution of the environment and thus adversely affected soil properties, growth of plants, soil and plant microflora and human health, creating an alarming situation for the world. Plant growth promoting endophytes (PGPE) showed its importance in recent remediation practices over old methods because of its cost effectiveness, ease of application, less secondary contaminants generation, non-requirement of skilled labor and instruments. In the present study, endophytes were isolated from the roots of nickel hyperaccumulator plant *Odontarrhena obovata* L. growing on century old copper smelter contaminated serpentine soil and checked for its metal tolerance capacity and PGP attributes viz siderophore production, inorganic phosphate solubilization, indole-3-acetic acid and ACC deaminase production. Further, 16 strains were identified by biochemical test and 16s rRNA gene sequencing. Finally, one endophytic strain which showed high metal tolerance, drought and antibiotic resistance with high concentration of multiple PGP attributes and able to survive under variable pH supplemented with Cu was applied to study its effect on

growth, development and biochemical changes in sunflower plant (*Helianthus annuus* L.) at sublethal Cu concentration (100 mg/kg). It was found that the plants experienced a negative effect of Cu on both biochemical and morphophysiological characteristics, which was diminished by application of the isolated metal tolerant strain EOO26. The strain increased the accumulative potential of sunflower in relation to copper, accumulated and sequestered mainly in the roots. Metal-tolerant PGPE had a positive effect on the redox balance of sunflower, which was manifested in a decrease in prooxidant activity and an increase in the activity of antioxidant enzymes and the synthesis of non-enzymatic antioxidants. It was concluded that the *H. annuus* is highly resistant to copper, which makes it a suitable crop for growing on Cu contaminated soil. At the same time, inoculation with metal-tolerant PGP endophyte strain EOO26 can help to phytoremediate the soil and promotes the growth of the aboveground parts of plants. *The work was funded by RFBR and DST according to the research Project No. 19-516-45006.*

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ДЫХАТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ПРОРОСТКОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ НА ЭТАПЕ ВСХОДОВ И ПРОРАСТАНИЯ

Е.А. Полякова^{1,2}, О.А. Федотова¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН; ²Иркутский государственный университет, Иркутск

Митохондрии выполняют важную роль в адаптации растений. В них локализован конечный этап дыхания, в результате которого синтезируется АТФ. Транспорт электронов по дыхательной цепи осуществляется через основной цитохромный путь (ЦП), и через альтернативный путь (АП), который связан с функционированием НАД(Ф)Н-дегидрогеназ II типа и альтернативной оксидазы (АО). Транспорт электронов через ЦП приводит к образованию протонного градиента и синтезу АТФ, в то время как через АП нет. Несмотря на то, что АП не участвует в образовании АТФ ему отводят важную роль в регуляции дыхания, так как АП способствует уклонению от аденилатного контроля. «Внешние» НАДН- и НАДФН-дегидрогеназы II типа по сравнению с АО являются мало изученными, и вопрос о их функциональной значимости при высоких температурах является весьма актуальным, в том числе на начальных этапах развития растений. Целью работы явилось изучение влияния теплового воздействия и стресса на дыхание, содержание водорастворимых углеводов и вклад в дыхание «внешних» НАД(Ф)Н-дегидрогеназ и АО в проростках яровой пшеницы на этапе всходов и прорастания. 4-суточные проростки (нахождение листа в колеоптиле) более устойчивее к тепловому стрессу (50°C) и быстрее адаптируются к тепловому воздействию (37°C) по сравнению с 8-суточными (стадия выхода второго листа). При 37°C отмечено повышение сахаров и снижение интенсивности общего дыхания в побегах 4-суточных и листьях 8-суточных проростков. При этом содержание сахаров и скорость дыхания была гораздо выше в побегах. «Внешние» НАД(Ф)Н-дегидрогеназы и АО вносят вклад в адаптацию проростков к высокой температуре. При тепловом закаливании отмечено сопряжение «внешней» НАДН-дегидрогеназы с АО. Однако при тепловом стрессе активность «внешних» НАДН- и НАДФН-дегидрогеназ зависит от этапа развития яровой пшеницы: в побегах активность высокая и не сопряжена с АО, а в листьях, наоборот, активность снижена. Таким образом, функционирование «внешних» НАДН- и НАДФН-дегидрогеназ II типа в митохондриях при высоких температурах тканеспецифично, а вклад в развитие теплоустойчивости и функциональная значимость у этих дегидрогеназ при высоких температурах, вероятно, также отличаются. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МК-1720.2020.4.*

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ И ПРОТЕОМА ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ИНОКУЛЯЦИИ БАКТЕРИЯМИ РОДА *VACILLUS* И *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Л.Г. Яруллина¹, В.О. Цветков², Г.Ф. Бурханова¹, Е.А. Черепанова¹, Е.А. Заикина¹, А.В. Сорокань¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН; ²Башкирский государственный университет, Уфа

Основу экологически безопасных препаратов для защиты растений от стрессов биотической и абиотической природы составляют стимулирующие рост растений бактерии (СРРБ). На основе бактерий рода *Vacillus* разработаны многие биопрепараты для защиты растений от фитопатогенов. Особенностью таких биопрепаратов является неспецифическая активация защитных механизмов растений. Системная устойчивость растений к болезням основана на экспрессии множества защитных генов, важную роль в развитии которой отводят сигнальным молекулам, прежде всего, пероксиду водорода, салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотам. Цель данного исследования – изучение влияния различных штаммов бактерий рода *Vacillus* в сочетании с сигнальными молекулами на содержание пероксида водорода, активность антиоксидантных и гидролитических ферментов, транскрипционную активность генов PR-белков и изменение протеома в связи с устойчивостью картофеля (*Solanum tuberosum* L.) к возбудителю фитофтороза – оомицету *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и засухе. Исследования проводили на 15-дневных растениях картофеля восприимчивого к фитофторозу сорта Ранняя Роза, выросших из микроклубней. Растения опрыскивали суспензией различных штаммов бактерий рода *Vacillus* (10⁸ кл/мл). Спустя 5 суток растения инфицировали зооспорами *P. infestans* (10⁵ спор/мл). Часть растений культивировали в условиях моделируемой засухи. Выявлено снижение степени пораженности листьев *P. infestans* под влиянием обработки бактериями *V. subtilis* и *V. thuringiensis* в зависимости от штамма. Максимальное снижение степени инфицированности листьев *P. infestans* (35%) наблюдалось при обработке картофеля штаммом *V. subtilis* 26Д в сочетании с ЖК, что коррелировало с накоплением H₂O₂, активацией каталазы, повышением транскрипционной активности гена PR-6. Протеомный анализ выявил в листьях картофеля различия в активации 19 белков в диапазоне pI от 4,0 до 9,0 с м.м. от 30 до 125 кДа. Обработка *V. subtilis* 26Д наиболее существенно изменяла спектр полипептидов как у здоровых, так и у инфицированных растений. Показано, что наиболее значимым фактором, определяющим изменение протеома картофеля на фоне засухи, является сочетание *V. subtilis* с ЖК. *Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ и БРФИ в рамках научного проекта № 20-516-00005.*

Стеновые доклады

ВЛИЯНИЕ ДЕТЕРГЕНТОВ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПОГРУЖЕННОГО МАКРОФИТА *EGERIA DENSA*

Г.Г. Борисова, Д.А. Щукина, Г.И. Ширяев, Т.С. Иванова, М.Г. Малева

Уральский федеральный университет, Екатеринбург

Увеличение масштабов использования синтетических поверхностно-активных веществ (СПАВ) в хозяйственной и промышленной деятельности вызывает необходимость изучения их токсического действия на живые организмы. Цель исследования – оценить ответные реакции погруженного макрофита *Egeria densa* Planch. (эгерия густая) на действие детергентов (на примере моющего средства «Fairgy») в градиенте концентраций. Для оценки токсического действия СПАВ растения помещали на 24 часа в модельные системы с дистиллированной водой с добавлением «Fairgy» (0,5; 1,0 и 5,0%). В качестве контроля использовали растения, инкубированные в дистиллированной воде без моющего средства. Выявлена линейная зависимость интенсивности выхода электролитов из клеток *E. densa* от концентрации «Fairgy» в растворе. При концентрации 5,0% выход электролитов увеличивался в 26 раз от контроля. Под действием детергентов содержание общего азота и фосфора в побегах *E. densa* снижалось в среднем на 40%, а суммарное содержание хлорофиллов – в 2 раза по сравнению с контролем. У модельных растений, инкубированных с детергентами, наблюдалось увеличение содержания пероксида водорода в градиенте концентраций «Fairgy». При этом в листьях *E. densa* увеличивалось содержание малонового диальдегида, основного продукта перекисного окисления липидов. Наибольшее его количество (на 73% выше контроля) отмечено при концентрации 5,0%. Развитие проокислительных реакций, как правило, сопровождается активизацией системы антиоксидантной защиты. Однако содержание таких низкомолекулярных антиоксидантов как каротиноиды, фенольные соединения и пролин в листьях растений, инкубированных в среде с «Fairgy», существенно снижалось (в среднем на 40%). Таким образом, с увеличением концентрации моющего средства, значительную долю в составе которого занимают анионные СПАВ, активизировались проокислительные реакции и, соответственно, увеличивался окислительный стресс, что позволяет сделать вывод о возрастании фитотоксичности детергентов в градиенте концентраций. Исследованные параметры можно рекомендовать в качестве надежных биохимических маркеров при оценке токсичности СПАВ.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОРХИДЕИ *PLATANThERA BIFOLIA*, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА ЗОЛОТВАЛАХ СРЕДНЕГО УРАЛА

М.Г. Малева, Г.Г. Борисова, Е.И. Филимонова, П.Е. Новиков, Н.В. Лукина, М.А. Глазырина

Уральский федеральный университет, Екатеринбург

Функционирование тепловых электростанций приводит к формированию техногенных ландшафтов. Для субстрата золоотвалов характерны неблагоприятные физико-химические свойства и пониженное содержание макро- и микроэлементов. Вместе с тем, на ранних стадиях формирования фитоценозов отвалы золы могут заселяться редкими видами растений, включая некоторых представителей *Orchidaceae* Juss. Цель работы – выявить биохимические особенности орхидеи *Platanthera bifolia* (L.) Rich. (любка двулистная), колонизирующей золные субстраты. Отбор растительного и почвенного материала проводили в период цветения орхидеи (середина июля 2018–2019 гг.) на золоотвале Среднеуральской ГРЭС и трех участках золоотвала Верхнетагильской ГРЭС (Свердловская область). В качестве контроля использовали естественный ненарушенный фитоценоз. Ключевой характеристикой при анализе фотосинтетической активности растений, которые находятся в стрессовых условиях, является состояние пигментного аппарата. Содержание хлорофилла а в листьях орхидеи, произрастающей на золоотвалах, в большинстве случаев уменьшалось, в то время как количество хлорофилла b и каротиноидов варьировало в меньшей степени. Отношение хлорофиллов к каротиноидам у растений на золных субстратах снижалось. Многие неблагоприятные факторы вызывают окислительный стресс у растений, маркером которого служит малоновый диальдегид (МДА), как один из основных продуктов ПОЛ. Содержание МДА в листьях орхидеи на золоотвалах было выше на 15% по сравнению с контролем. Важную роль в защите клеток растений от активных форм кислорода играют ферментативные антиоксиданты, включая фенольные соединения, аскорбиновую кислоту и пролин. Содержание фенолов в листьях орхидеи на золных субстратах по сравнению с контролем возрастало в среднем на 13%, а на некоторых участках – на 33%. Обратная тенденция выявлена при оценке накопления пролина и аскорбата: их содержание на золоотвалах было ниже на 24%, чем в естественном фитоценозе. Выявление биохимических особенностей орхидей на техногенно нарушенных субстратах необходимо для разработки мер по их натурализации и интродукции. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ и Правительства Свердловской области (проект № 20-44-660011) и Министерства науки и высшего образования РФ в рамках ГЗ УрФУ FEUZ-2020-005.

Конкурс молодых ученых

ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТОПЛИВА

А.М. Бозиева¹, М.А. Синетова¹, Е.В. Куприянова¹, С.К. Жармухамедов², С.И. Аллахвердиев^{1,2}

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва; ²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино

В настоящее время во всем мире разрабатываются и масштабно внедряются различные технологии использования биомассы фототрофных микроорганизмов в энергетических и сырьевых целях. В этом отношении цианобактерии и микроводоросли привлекают внимание как потенциальные продуценты биотоплива «третьего» поколения. Согласно современным тре-

бованиям биотоплива должно быть высокоэффективным, возобновляемым и экологически чистым. Интерес к фототрофным микроорганизмам обусловлен их способностью к более быстрому накоплению биомассы в сравнении с традиционными сельскохозяйственными культурами. Согласно имеющимся в литературе данным, выращивание цианобактерий является менее затратным, и их высокая продуктивность позволяет получить с единицы площади больше энергии, чем при выращивании сельскохозяйственных культур. Однако, поиск более перспективных и высокопродуктивных штаммов цианобактерий по-прежнему остается актуальным. Важными показателями для клеток штаммов потенциальных продуцентов биотоплива являются высокая скорость роста и накопления биомассы, высокая фотосинтетическая активность клеток. Для исследования нами были выбраны следующие малоизученные штаммы коллекции цианобактерий и микроводорослей IPPAS ИФР РАН: *Dolichospermum* sp. IPPAS B – 1213, *Cyanobacterium* sp. IPPAS B – 1200, *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B – 353, штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L взят в качестве контрольного. Для каждого из выбранных штаммов рассчитаны показатели относительной скорости роста и времени удвоения биомассы, определен пигментный состав и охарактеризована фотосинтетическая активность клеток, исследовано влияние pH окружающей среды на скорость выделения кислорода. Подобраны оптимальные температурные условия для культивирования клеток штамма *Dolichospermum* sp. IPPAS B – 1213. Результаты экспериментов свидетельствуют о высоком ростовом и фотосинтетическом потенциале клеток исследованных штаммов, что является важным требованием для цианобактерий, потенциальных продуцентов биотоплива. Таким образом, полученные данные позволяют обоснованно предполагать, что клетки выбранных штаммов могут быть достаточно эффективными продуцентами биотоплива. Ответ на данный вопрос мы планируем получить в дальнейших исследованиях. Работа поддержана Российским научным фондом, грант 19-14-00118.

РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ РИЗОСФЕРЫ ОРХИДЕИ, УЛУЧШАЮТ БИОХИМИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАПСА В ГОРШЕЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

О.В. Воропаева, М.Г. Малева, Н.В. Чукина, О.С. Синенко, Г.Г. Борисова, П.Е. Новиков, Трипти
Уральский федеральный университет, Екатеринбург

Ризобактерии, обладающие ростостимулирующей активностью (PGPR) и металлоторолерантностью, наряду с микоризой, могут способствовать колонизации редких видов орхидей на техногенных субстратах. Однако роль бактериальных сообществ в их адаптации изучена недостаточно. Все большую актуальность приобретают исследования, направленные на разработку экологически безопасных бактериальных биоудобрений (ББУ), которые могли бы служить альтернативой химическим препаратам. Широкие перспективы открывает использование биочара и металлоторолерантных PGPR в качестве такой биоудобавки. Из ризосферной почвы орхидеи *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser, произрастающей на серпентинитовом отвале вскрышных пород после добычи асбеста, первоначально было выделено 60 штаммов бактерий, проведен скрининг на их устойчивость к тяжелым металлам и PGP-активность (синтез ауксинов, солюбилизация фосфатов, азотфиксация и др.) и выбран наиболее перспективный штамм рода *Pseudomonas* sp. для дальнейшего тестирования. Цель работы – изучение физиолого-биохимических характеристик рапса (*Brassica napus* L.) при добавлении в почву, содержащую 5% биочара (по объему), жидкой культуры выбранного штамма PGPR (108 КОЕ/л). Растения выращивали в горшечной культуре при естественном освещении, фотопериоде 14:10 (день:ночь) и температуре 25±2°C. Эксперимент включал две линии: без металла и с добавлением меди в концентрации 200 мкМ. Добавление ББУ снижало интенсивность перекисного окисления липидов, вызванного действием меди, и процент выхода электролитов из клеток листьев рапса. Отмечено существенное увеличение содержания флавоноидов в присутствии ББУ и в отсутствие металла (в 1,8 раза). Добавление Cu не влияло на их количество. Суммарное содержание хлорофиллов (a+b) возрастало в 2,4 раза в отсутствие меди, в то время как при ее добавлении снижалось. При этом содержание каротиноидов, напротив, увеличивалось. Интенсивность ассимиляции CO₂ и величина надземной биомассы рапса при добавлении ББУ увеличивались в среднем на 40% (как в присутствии, так и в отсутствие ионов меди). Таким образом, в целом ББУ улучшало биохимические и продукционные показатели рапса. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ и Правительства Свердловской области (проект № 20-44-660011), а также РФФИ и ДНТ (проект № 19-516-45006).

НОКАУТ НЕГАТИВНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ В *ARABIDOPSIS THALIANA* МЕТОДОМ CRISPR/CAS9

Э.А. Хуснутдинов, М.А. Панфилова, А.С. Сухарева, Е.В. Михайлова
Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа

Транскрипционные факторы — белки, играющие важную роль в регуляции экспрессии генов. Антоцианы — пигменты, задействованные в обеспечении устойчивости растений к стрессам, обладающие антиоксидантными свойствами. Повышенного накопления антоцианов можно достигнуть путем нокаута генов-репрессоров антоцианового биосинтеза. Известно, что сверхэкспрессия генов транскрипционных факторов MYB60 (R2R3MYB) и CAPRICE (R3MYB) приводит к снижению биосинтеза антоцианов. Следовательно, снижение их экспрессии или нарушение функции может приводить к повышению накопления антоцианов. Для функциональных участков данных генов спейсеры гидовых РНК были подобраны и клонированы в вектор pDIRECT_23A (Addgene plasmid # 91138). Полученные генно-инженерные конструкции были перенесены в *Agrobacterium tumefaciens* штамма Agl0. Соцветия *A. thaliana* были трансформированы методом погружения цветков. Полученные семена высевались в почву и 4 раза обрабатывались фосфинотрицином в концентрации 120 мг/л с добавлением Silwet. Селективный агент вызывал у нетрансформированных растений пожелтение и отмирание листьев. В случае трансформации конструкцией 23A-60MYB выжило 2% проростков, а в случае трансформации конструкцией 23A-CAPRICE — 1,5%. Выжившие растения отличались повышенной аккумуляцией антоцианов. При этом степень пигментации различалась: например, у одного растения были пигментированы листья целиком, тогда как у другого - только жилки. У двух растений антоциановая окраска была слабой и со временем исчезла. Это может быть связано как с химерностью растений, так и с уни-

кальностью каждого случая редактирования. Повысить эффективность трансформации можно, применяя в генно-инженерных конструкциях промоторы, специфичные для яйцеклеток. Полученные данные говорят о возможности использования генов MYB60 и CAPRICE в качестве мишеней для геномного редактирования с целью получения растений богатых антоцианами. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-74-10053.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ДВУХВАЛЕНТНОЙ МЕДИ СПОСОБНЫ ЭФФЕКТИВНО ПОДАВЛЯТЬ АКТИВНОСТЬ КАРБОАНГИДРАЗЫ

М.В. Родионова¹, С.К. Жармухамедов², С.И. Аллахвердиев^{1,2}

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва; ²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино

Карбоангидраза – это металлофермент, имеющий в активном центре ион двухвалентного металла с тремя аминокислотными остатками в качестве лигандов и молекулой воды/гидроксид-ионом, координирующей металл. У многих организмов этот фермент участвует в ключевых физиологических процессах, связанные с величиной pH, CO₂-гомеостазом и передачей сигналов, а также задействован в различных биосинтетических реакциях. Кроме того, карбоангидразы принимают участие в процессе дыхания и транспорта CO₂/HCO₃⁻, а также секреции электролитов в тканях. У растений, водорослей и некоторых бактерий карбоангидразы играют важную роль в процессе фотосинтеза. Карбоангидразы высших растений поставляют субстрат для Рубиско и ФЕП-карбоксилазы, участвуют в ускорении диффузии CO₂ через плазматическую мембрану и оболочку хлоропласта, в том числе и в виде HCO₃⁻. Известно, что фотосистема 2 также имеет два источника карбоангидразной активности. Комплексы меди(II) были исследованы на способность ингибировать карбоангидразную активность фотосистемы 2, а так же α-карбоангидразы эритроцитов быка. Было показано, что комплексы меди(II) способны эффективно подавлять карбоангидразную активность фотосистемы 2, что сопровождается снижением ее фотохимической активности. Обнаружено, что карбоангидразная активность фотосистемы 2 подавлялась сильнее, чем активность модельной α-карбоангидразы эритроцитов быка. Работа была поддержана Российским научным фондом (грант 19-14-00118).

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЕСИКАЦИИ ЛИСТЬЕВ ДИКОЙ И КУЛЬТИВИРУЕМОЙ РАЗНОВИДНОСТЕЙ *SALSOLA (KALI) KOMAROVII*

О.С. Синенко¹, О.Л. Бурундукова², И.С. Киселева¹

¹Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург; ²Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток

Солянка Комарова (*Salsola (Kali) komarovii* (Pjijin) Akhani & Roalson) сем. Амарантовых произрастает в прибрежно-морской зоне на Дальнем Востоке. С древних времен используется в Японии как салатная овощная культура с высоким содержанием витаминов. Современные биохимические исследования обнаружили большой потенциал солянки, как безопасного противовоспалительного средства. У растений, выращенных из семян, взятых из природной среды и культурной формы, изучали фотосинтетическую активность. Растения выращивали в теплице в горшечной культуре при температуре +24 – +28°C, естественном уровне освещения и влажности. Содержание хлорофиллов (хл а, хл b), и каротиноидов определяли спектрофотометрически в 80% ацетоновых экстрактах, расчет содержания пигментов проводили по Lichtenthaler. Параметры интенсивности фотосинтеза измеряли при помощи инфракрасного газоанализатора Li-COR 6400 (Li-COR, США) измерения проводили в камере для хвойных, при интенсивности освещения 1600 мкМ/м²с, подобранной экспериментально, по стандартной методике производителя. Уровень перекисного окисления липидов оценивали спектрофотометрически по количеству ТБК-реагирующих продуктов. Условия засухи моделировали путем десикации изолированных побегов. Было отмечено, что интенсивность ассимиляции CO₂ у окультуренной формы в 1,5 раза выше, чем у растений из природных местообитаний как в пересчете на сырую, так и на сухую массу. Более высокая интенсивность фотоассимиляции соотносится с более высоким содержанием фотосинтетических пигментов у культурных растений по сравнению с природными: хл а на 24 %, хл b на 34% и каротиноидов на 17%. При этом устойчивость растений к обезвоживанию, оцененную по уровню перекисного окисления липидов, незначительно различалась (менее 10%). Солянка Комарова – С4 вид с полуальковатыми листьями с сальзолоидным типом строения мезофилла. Центральная часть сукукулентных листьев содержит водоносную ткань с большим запасом воды, что обусловило высокий уровень устойчивости к обезвоживанию. Вероятно, при селекции культурной формы солянки в качестве пищевой культуры происходил отбор растений с большей биомассой и скоростью роста, соответственно, с более высоким содержанием фотосинтетических пигментов и интенсивности фотосинтеза.

ВЛИЯНИЕ ТИАМЕТОКСАМА НА ПЕРВИЧНЫЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ПИГМЕНТОВ ГЕНОТИПОВ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS L.*)

В.В. Хабатова¹, Д.А. Тодоренко², Д. Хао^{2,3}, О.В. Слатинская², Э.С. Аллахвердиев^{2,4}, А.Д. Иванов⁵, С.Н. Раденович^{6,7}, Д.Н. Маторин², С. Алвазел⁸, Г.В. Максимов^{2,5}, С.И. Аллахвердиев^{1,8,9}

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва; ³Университет МГУ-ППИ, Шеньчжень, КНР; ⁴НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва; ⁵НИТУ «МИСиС», Москва; ⁶Maize Research Institute, Zemun Polje, Сербия, Белград; ⁷Белградский университет, Факультет физической химии, Сербия, Белград; ⁸Кафедра зоологии, Научный колледж, Университет Короля Сауда, Эр-Рияд, Саудовская Аравия; ⁹Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино

Известно, что инсектициды используются для борьбы с насекомыми-вредителями растений, но попадают на поверхность растения или в почву, из которой поступают в различные ткани растения. Инсектициды класса неоникотиноидов широко

распространены и эффективно используются в сельском хозяйстве благодаря высокой активности, низкой эффективной дозе, степени поглощения и транспорта вещества в тканях растения.

В настоящее время механизм воздействия неоникотиноидов на растения исследован недостаточно. Цель нашей работы заключается в исследовании структуры, содержания и первичных фотосинтетических реакций пигментов листа (хлорофилл, каротиноид) двух генотипов кукурузы (инбредная линия – zpp1 225 и гибрид – zр 341) при обработке растения неоникотиноидом тиаметоксамом.

С помощью методов стационарной флуориметрии и спектроскопии комбинационного рассеяния обнаружено, что эффект тиаметоксама зависит от условий обработки растения и генотипа кукурузы. В случае орошения почвы и поступления тиаметоксама в корневую систему растения (воздействие на 4-й и 8-й день после посадки растения, а контроль за эффектом проводился на 10-й и 12-й день) установлено, что первичные фотохимические реакции в фотосистеме II обоих генотипов не изменяются в течение всего вегетационного периода. Доказано, что гибрид zр341 более восприимчив к действию тиаметоксама, демонстрируя снижение первичных фотосинтетических процессов в хлорофилле (например, параметры JР-теста), а также изменения содержания хлорофилла и конформации молекулы каротиноида.

По мнению авторов, результаты, полученные при совместном использовании выбранных оптических методов, являются основой для формирования технологии диагностики и мониторинга действия пестицидов на растения.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

Устные доклады

УЧАСТИЕ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ SFPQ И NONO В РАННИХ СТАДИЯХ РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ-1

Ю.Ю. Агапкина¹, О.А. Шадрина¹, Т.Ф. Кихай¹, М.О. Силкина¹, У.Д. Белова¹, М.Б. Готтих^{1,2}

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

Исследование роли клеточных белков в репликации вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) крайне важно для понимания патогенеза ВИЧ-инфекции, а также для развития стратегии создания новых анти-ВИЧ препаратов – ингибиторов взаимодействия вирусных белков с клеточными партнерами. Такие ингибиторы могут стать альтернативой ингибиторам вирусных ферментов, приводящих к возникновению лекарственно-устойчивых штаммов вируса. Белки SFPQ и NONO обладают высокой степенью структурной гомологии, являются основными компонентами ядерных белково-нуклеиновых комплексов параспеклей и участвуют в ответе на повреждения ДНК, регуляции транскрипции и сплайсинга. Показано их участие в подавлении ВИЧ-инфекции за счет удержания вирусных несплайсированных мРНК в параспеклях. При этом в экспериментах по поиску клеточных партнеров ВИЧ-1 белки SFPQ и NONO были обнаружены в составе прединтеграционного комплекса, что предполагает их участие и в ранних стадиях репликации вируса, однако механизм этого участия не известен. Целью настоящей работы было исследование участия белков SFPQ и NONO в ранних стадиях репликативного цикла ВИЧ-1: обратной транскрипции, интеграции и постинтеграционной репарации. Для этого был использован репликативно-некомпетентный вектор на основе ВИЧ-1, в его составе вирусные гены заменены на ген люциферазы светлячка, и уровень экспрессии люциферазы при трансдукции клеток этим вектором коррелирует с эффективностью ранних этапов жизненного цикла ВИЧ-1. Мы обнаружили, что уровень люминесценции изменяется в ответ на изменение внутриклеточного уровня белков SFPQ и NONO. С помощью ПЦР в реальном времени мы детектировали количество обратно-транскрибированной, интегрированной и репарированной форм вирусной ДНК, и определяли, на какую стадию оказывается эффект. Также установлено, что рекомбинантный SFPQ не связывается с обратной транскриптазой, но взаимодействует с интегразой, при этом для NONO такого взаимодействия не обнаружено. Показано, что в присутствии SFPQ каталитическая активность интегразы снижается. Сравнительный анализ гомологичных структур SFPQ и NONO и исследование связывания серии делеционных мутантов интегразы с SFPQ позволили определить структурные детерминанты взаимодействия этих белков. Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00437.

РЕГУЛЯЦИЯ ПОСТИНТЕГРАЦИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ВИЧ-1

А.Н. Анисенко^{1,2,3}, А.А. Нефедова¹, М.Б. Готтих^{2,3}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, ²Химический факультет и ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Интеграция ВИЧ-1 – один из ключевых этапов в жизненном цикле ВИЧ-1, приводит к образованию разрывов в геномной ДНК. Для успешной продукции новых вирусных частиц эти повреждения должны быть восстановлены с привлечением клеточных систем репарации. Ранее мы продемонстрировали участие факторов NHEJ-пути (non homologous end joining): Ku70, Ku80 и DNA-PKcs, – в постинтеграционной репарации (PIR), несмотря на отсутствие двуцепочечных разрывов ДНК в сайтах интеграции вирусной кДНК. PIR инициируется путем привлечения Ku70/Ku80/DNA-PKcs комплекса к местам повреждений ДНК за счет прямого взаимодействия между интегразой ВИЧ-1 и клеточным белком Ku70. В ходе этого процесса DNA-PKcs активируется и фосфорилирует ряд факторов, вовлеченных в PIR. Также мы установили, что родственная киназа ATM из семейства PI3K-киназ также вовлечена в регуляцию PIR. Ее активация, как и в случае DNA-PKcs, зависит от наличия взаимодействия между интегразой ВИЧ-1 и Ku70: мутантный псевдовирус на основе генома ВИЧ-1, несущий мутации в составе интегразы, препятствующие взаимодействию с Ku70, нечувствителен к низкомолекулярным ингибиторам DNA-PKcs и ATM. Эксперименты по совместному ингибированию обеих киназ позволили нам показать, что эти киназы функционируют независимо друг от друга. Среди прочего мы установили, что активация этих киназ происходит одновременно с интеграцией вирусной кДНК (7-14 hpi) и приводит к фосфорилированию таких известных репарационных мишеней как H2AX и DNA-PKcs (автофосфорилированные формы). Работа поддержана грантом РФФИ 19-74-10021/

НАПРАВЛЕННАЯ ИНТЕГРАЦИЯ ПЕПТИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ СЛИЯНИЯ ИЗ gp41 В ГЕН CXCR4 ПОЛНОСТЬЮ ЗАЩИЩАЕТ Т-КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА ОТ ИНФЕКЦИИ ВИЧ-1

А.Ю. Масленникова¹, Н.А. Круглова², Д.С. Комков², Д.В. Мазуров²

¹Группа клеточных и генных технологий и ²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена, РАН, Москва

Невозможность эрадикации ВИЧ с помощью современной антиретровирусной терапии требует разработки новых подходов лечения, основанных на генетических технологиях. Исследования последних лет показывают, что пептиды из трансмембранного оболочечного белка ВИЧ gp41 ингибируют слияние вируса с клеткой более эффективно не в растворимой форме, а когда закорены на мембране. Некоторые мембранно-связанные gp41 пептиды, закодированные в лентивирусном векторе, находятся на стадии клинических испытаний. Однако подобные терапевтические подходы на основе CRISPR/Cas9 не были разработаны в силу низкой эффективности нокина в лимфоцитах человека. В нашей работе мы клонировали семь пептидов из HR2 домена gp41 в наиболее короткую молекулу-носитель CD52 в целях минимизации размера трансгена и увеличения нокина (см метод SORTS, опубликованный в SciRep 2019). Полученные лентивирусные конструкции были стабильно экспрессированы в ВИЧ-чувствительных клеточных линиях, из которых были отобраны три наиболее активных пептида МТ-

C34, 2P23 и HP23L. На основе данных пептидов была разработана CRISPR/Cas9 платформа для моно- или биаллельного нокина в область старт-кодона гена CXCR4. Путем нокина защитный пептид был слит с N-концом CXCR4 или экспрессирован отдельно в липидных рафтах. На модельной лимфоидной линии СЕМ/R5 было показано, что комбинация из двух различных пептидов лучше защищала клетки от инфекции ВИЧ, чем один пептид. Клетки СЕМ/R5 с биаллельным нокином МТ-С34 и 2P23 были полностью защищены от инфекции Х4- и R5-тропным ВИЧ и были способны выживать и размножаться при сокультивировании с родительскими клетками, зараженными репликационно-компетентным ВИЧ-1. Путем введения ряда модификаций в донорную ДНК, в частности, удлинения плечей гомологии со 100 до 500 п.о., замены ПЦР донора на плазмиду и добавления сайтов связывания транскрипционных факторов и/или Cas9 удалось увеличить уровень HDR с 3-4% до 35%. Таким образом, разработанная CRISPR/Cas9 платформа позволяет одновременно экспрессировать защитный пептид и модифицировать клеточный ген-мишень и может быть адаптирована для получения CD4 лимфоцитов человека, резистентных к заражению ВИЧ-1. *Работа поддержана грантами РФФИ №18-29-07052 и Министерства науки и высшего образования РФ №075-15-2019-1661.*

НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ И ВАКЦИН ПРОТИВ КОРОНАВИРУСОВ

Л.А. Дыкман, С.А. Староверов, А.С. Фомин, К.П. Габалов

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

Наночастицы золота активно используют для диагностики и профилактики вирусных заболеваний, в том числе вызванных коронавирусами. На сегодняшний день разработаны методы получения антител и прототипы вакцин против четырех типов коронавирусов. Это вирус трансмиссивного гастроэнтерита, вирус инфекционного бронхита птиц, вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и SARS-CoV-2 коронавируса. Мы использовали сферические наночастицы золота (средний диаметр 15 нм) в качестве носителя и адьюванта для получения антител против коронавируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС). Животных иммунизировали поверхностным антигеном вируса ТГС, конъюгированным с наночастицами золота. Полученные антитела обладали более высоким титром, чем антитела, продуцируемые в ответ на нативный вирус (1:15018 против 1:6826). Иммунизация комплексом антиген-наночастицы золота приводила к значительному увеличению респираторной активности перитонеальных макрофагов и уровня провоспалительных цитокинов IFN- γ , IL-1 β и IL-6 в плазме иммунизированных животных. Микроанатомические изменения (увеличение количества фолликулов) свидетельствуют об активации В-зависимой зоны селезенки и, как следствие, о развитии иммунологической реакции гуморального типа. Полученные данные указывают на то, что наночастицы способствуют презентации антигена органам ретикулоэндотелиальной системы. Эти результаты могут быть использованы для разработки вакцин против этой инфекции путем применения антигена ТГС, конъюгированного с наночастицами золота в качестве носителя и адьюванта. Наночастицы золота можно использовать в качестве адьювантов для повышения эффективности вакцин за счет стимуляции антигенпрезентирующих клеток и обеспечения контролируемого высвобождения антигена. Таким образом, наночастицы золота, обладающие адьювантными свойствами, могут быть отличным инструментом при разработке эффективных вакцин против инфекционных заболеваний, в том числе вызванных коронавирусами.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-14-00077).

ЭЛИМИНАЦИЯ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ CRISPR/Cas9 ОТ ОРГАНИЗМА *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

С.А. Брезгин^{1,2}, А.П. Костюшева¹, Н.И. Пономарева^{1,3}, В.Г. Воля¹, А.В. Никифорова⁴, И.А. Гоптарь⁴, Д.С. Костюшев¹, В.П. Чуланов^{1,3}

¹НМИЦ фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний МЗ РФ; ²ГНЦ Институт иммунология ФМБА России;

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ; ⁴НИИ медицины труда им. Н.Ф. Измерова, Москва

Системы CRISPR/Cas могут подавлять репликацию вируса гепатита В (ВГВ) за счет разрушения основной формы генома вируса. Ранее было продемонстрировано, что при доставке CRISPR/Cas в составе плазмид или вирусных векторов происходит снижение всех параметров ВГВ >90–99%. Тем не менее, внедрение CRISPR/Cas систем в клиническую практику для лечения ВГВ-инфекции затруднено отсутствием эффективных методов доставки CRISPR/Cas и внецелевым разрезанием генома человека. В данной работе было изучено действие высокоспецифичной системы *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas9 (StCas9) в виде короткоживущих рибонуклеопротеиновых комплексов на возможность полной элиминации ВГВ из клеток человека. В рамках работы был получен белок StCas9 с гистидиновой меткой 6 \times His и транскрибированные *in vitro* РНК-проводники. Комплексы StCas9 с РНК-проводниками были доставлены в клетки HepG2 с геномом ВГВ с помощью нуклеофекции либо трансфекции с реагентом CRISPRfectamine. Доставку StCas9 белка анализировали методом окрашивания с анти-6 \times His антителами. Противовирусное действие оценивали с помощью ПЦР, иммуноцитохимии (НВсAg) и определения НВсAg. Полуколичественное определение всех форм генома ВГВ проводили с помощью Саузерн-блоттинга. Генетическое целевое и внецелевое редактирование анализировали методом NGS. Результаты: к 3 суткам после однократной трансфекции StCas9 происходило полное исчезновение РНК, снижение до 99% общей ДНК и до 89% НВсAg и НВсAg ВГВ. В оставшихся матрицах ДНК ВГВ детектировались частые мутации по типу делеций. Важно отметить, что несмотря на практически полную элиминацию ВГВ, к 5 суткам после трансфекции StCas9 происходила реактивация ВГВ. Результаты Саузерн-блоттинга и ПЦР-анализа свидетельствуют о том, что конверсия формы-предшественника в основную форму генома ВГВ, а также ре-инфекция *de novo* являются важными факторами, обуславливающими персистенцию ВГВ. Комплексы StCas9 обеспечивают практически полную элиминацию ВГВ без регистрируемых внецелевых эффектов. Элиминация ВГВ-инфекции невозможна за счет разрушения основной формы генома ВГВ, поскольку конверсия и инфекция *de novo* определяют персистенцию ВГВ. *Работа выполнена в рамках гранта РФФИ №20-15-00373.*

НОВЫЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2 ПОСЛЕ ЕСТЕСТВЕННОЙ ИНФЕКЦИИ И ВАКЦИНАЦИИ

И.Н. Исакова-Сивак, В.А. Матюшенко, И.В. Кудрявцев, Е.А. Степанова, А.Д. Гошина, А.К. Чистякова, П.И. Прокопенко, И.А. Сычев, Л.Г. Руденко

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

Оценка уровней противовирусного иммунитета у пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию, а также у лиц, привитых вакцинами от COVID-19, является актуальным вопросом мониторинга иммунологического статуса населения, а также эффективности применяемых на практике вакцин. Чаще всего иммунный ответ оценивают по уровню сывороточных антител, связывающихся со спайк-белком вируса SARS-CoV-2, или способных нейтрализовать живой вирус в экспериментах *in vitro*. Известно, что уровни IgG и вирус-нейтрализующих антител существенно снижаются в течение 6-9 месяцев после заболевания или после иммунизации, однако данное снижение может не отражать реального защитного потенциала иммунной системы в связи с формированием иммунологической памяти к данному возбудителю в виде долгоживущих В- и Т-клеток памяти. Основной целью настоящей работы явилась разработка методологических подходов для выявления ключевых субпопуляций Т-клеток памяти, специфичных вирусу SARS-CoV-2, у людей, перенесших COVID-19, а также у лиц, привитых вакциной Sputnik V. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» и включало в себя добровольцев, подписавших соответствующее информированное согласие. Мононуклеары периферической крови (МПК) добровольцев стимулировали живым вирусом SARS-CoV-2, очищенным на градиенте плотности сахарозы, в условиях лаборатории уровня биобезопасности BSL-3. В качестве биологического контроля использовали стимуляцию вирусом гриппа подтипа H1N1. Для проведения цитометрического учета стимулированные МПК окрашивали антителами либо на поверхностные CD69 и CD134, либо на внутриклеточный IFN γ . Вирус-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты выявляли в рамках пула клеток центральной и эффекторной памяти, а для CD4⁺ Т-клеток также определяли принадлежность к определенному типу «поляризованных» Т-хелперов. В ходе исследования было показано, что естественная инфекция и вакцинация вызывают образование вирус-специфических CD4⁺ Т-клеток памяти, при этом, в отличие от вируса гриппа, практически не происходит формирования субпопуляции цитотоксических Т-клеток эффекторной памяти к вирусу SARS-CoV-2, что указывает на особые механизмы воздействия данного патогена на иммунную систему людей. *Работа поддержана грантом РНФ №21-75-30003.*

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОЦЕССА ИНФИЦИРОВАНИЯ *S. AUREUS* БАКТЕРИОФАГОМ vB_SauM-515A1-ОСНОВНЫМ КОМПОНЕНТОМ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОКТЕЙЛЕЙ

М.А. Корниенко¹, Г.Ю. Фисунов¹, Н.С. Купцов¹, Р.Б. Городничев¹, К.М. Климина¹, Е.Н. Ильина¹, А.В. Летаров², Е.А. Шитиков¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва

Сегодня очевиден кризис современной медицины, вызванный распространением бактериальных возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью. Перспективной альтернативой терапии антибиотиками является применение препаратов вирулентных бактериофагов (фагов). Цель исследования заключалась в характеристике процесса инфекции клинического изолята *Staphylococcus aureus* вирулентным фагом семейства *Herelleviridae* методом транскрипционного анализа.

Материалы и методы. Фаг vB_SauM-515A1 выделен из коммерческого препарата АО НПО «Микроген» на штамме-хозяине *S. aureus* SA515 (spa-типе t008; ST8). Бактериальную культуру инфицировали фагом (МОИ=10) и отбирали пробы через 5, 15 и 30 мин. Секвенирование РНК проводили на платформе Illumina. Дифференциальный анализ экспрессии генов выполняли с помощью edgeR (FDR \leq 0,01; FC \geq 2).

Результаты. По данным электронной микроскопии бактериофаг vB_SauM-515A1 относился к семейству *Herelleviridae* и соответствовал типичным представителям вирулентных фагов согласно кривой единичного цикла роста. Полный цикл размножения на штамме-хозяине занимал 60 мин., из них первые 30-40 мин. – это латентный период. Согласно данным РНК секвенирования, доля парных прочтений, картирующихся на геном хозяина, снижалась с 74% на 5 минуте до 20% на 30 минут, тогда как для бактериофагов увеличилась с 10% до 56% соответственно. Экспрессию генов фага регулировали 58 ранних и 12 поздних промоторов, а также 41 Rho-независимый терминатор. На ранних стадиях инфекции наиболее активно экспрессировались фаговые гены модуля «захвата хозяина», на поздних стадиях – модуля лизиса и ряд генов модуля морфогенеза. Только 22,8% (630/2767) генов *S. aureus* являлись дифференциально экспрессирующимися (ДЭГ). Наибольшие изменения в метаболизме *S. aureus* происходили на 5 мин, а именно: подавление биосинтеза азотистых оснований, активация систем рестрикции-модификации и репарации бактериальной ДНК, гиперэкспрессия рибосомальных генов.

Впервые на основании данных полногеномного РНК секвенирования охарактеризован транскрипционный ландшафт типичного представителя стафилофагов семейства *Herelleviridae*, а также установлены основные изменения, возникающие в клетке *S. aureus* в ходе ее инфицирования данным бактериофагом.

МОДУЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ КОРОНАВИРУСНОГО ГЕНОМА В БИОСФЕРЕ

А.Н. Лукашев, Ю.А. Вакуленко, М.Н. Рузина, А.А. Девяткин

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

Рекомбинация является ключевым свойством практически всех РНК вирусов. Благодаря рекомбинации вирусы существуют в биосфере как высоко динамичное облако генетической информации. Понимание закономерностей рекомбинации необходимо для оценки генетической пластичности геномов, которая обеспечивает возникновение новых вирусов, таких как SARS-CoV-2. Семейство Coronaviridae включает четыре рода, называемых альфа-, бета-, гамма- и дельта-коронавирусы. Отдельные случаи рекомбинации были описаны у многих коронавирусов, заражающих человека и животных, однако систе-

матический анализ паттернов рекомбинации как с точки зрения вовлеченных участков генома, так и степени генетической дивергенции между партнерами не проводился. Обычные методы обнаружения рекомбинации, основанные на филогенетических несоответствиях, могут не работать в случае слишком большого количества рекомбинационных событий, которые «размывают» филогенетический сигнал. Для анализа естественной рекомбинации у коронавирусов был разработан набор биоинформатических инструментов, основанных на попарных дистанциях и менее чувствительный к потере филогенетического сигнала. У альфа-, бета- и дельта-коронавирусов рекомбинация наблюдалась внутри одного рода во всех областях генома, но с относительно невысокой интенсивностью. Исключением был ген шиповидного белка (S), ответственный за связывание с клеточным рецептором и вход вируса в клетку. Этот ген интенсивно рекомбинировал относительно других областей генома, в том числе между далеко родственными вирусами. Гамма-коронавирусы птиц, напротив, интенсивно рекомбинировали во всех участках генома даже между дивергентными вирусами, и существуют в биосфере как глобальное облако генов. Профили рекомбинации внутри гена S соответствовали модульной структуре шиповидного белка: признаки рекомбинации были более выражены между доменами спайка (N-концевая, C-концевая часть S1 и S2), чем внутри доменов. У бета-коронавирусов (в том числе у SARS-CoV-2) наиболее мобильной частью генома был не целый ген S, а C-концевая часть его домена S1. Вариативность возможных событий рекомбинации и их неравномерное распределение по геному предполагает, что совместимость генов, а не механистические или экологические ограничения, формируют наблюдаемый профиль естественной рекомбинации у коронавирусов. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 19-15-00055.*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА SARS-CoV-2 С БЕЛКАМИ 14-3-3 ЧЕЛОВЕКА

К.В. Тугаева¹, Д.Э. Хокинс², Дж.Л. Смит², О.В. Бэйфилд², Д.С. Кер², А.А. Сысоев¹, О.И.Клычников³, А.А. Антсон², Н.Н. Случанко¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва;

²Йоркская лаборатория структурной биологии, химический факультет Йоркского университета, Великобритания;

³Кафедра биохимии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Лечение COVID-19 в настоящее время ограничивается отсутствием одобренных эффективных лекарств, что требует поиска новых терапевтических мишеней. Ключевым фактором повышенной по сравнению с другими коронавирусами человека патогенности SARS-CoV-2 считается нуклеокапсидный (N) белок. Ранее было показано, что перемещение гомологичного N белка SARS-CoV между ядром и цитоплазмой регулируется фосфорилированием N и его взаимодействием с белками 14-3-3 в цитоплазме клетки-хозяина. Фосфопептид-связывающие димерные белки-регуляторы семейства 14-3-3 входят в топ-1% экспрессируемых белков человека во многих тканях, включая ткани, подверженные инфекции SARS-CoV-2. Целью данной работы было изучение молекулярного механизма взаимодействия между SARS-CoV-2 N и 14-3-3. Полифосфорилированный N (pN) был получен при совместной экспрессии с протеинкиназой A в клетках *E. coli*, что привело к фосфорилированию более 20 остатков Ser/Thr, включая сайты, обнаруживаемые *in vivo*. С помощью набора биохимических методов мы показали, что только фосфорилированный N взаимодействует с 14-3-3, причем взаимодействие с разной эффективностью наблюдается со всеми семью изоформами 14-3-3 человека. Наблюдаемая стехиометрия комплекса указывала на связывание димера 14-3-3 с димером pN и на существование одного 14-3-3-связывающего фосфосайта в каждой субъединице pN. Создание серии укороченных вариантов N и анализ их взаимодействия с 14-3-3 позволили определить остаток S197 как ключевой сайт, узнаваемый 14-3-3. Он находится в функционально значимом SR-богатом регионе N и высококонсервативен, что указывает на универсальность взаимодействия 14-3-3 с N белками многих зоонозных коронавирусов. Вариант pN S197L, несущий мутацию, описанную в нескольких человеческих популяциях, слабо взаимодействовал с 14-3-3, что подтверждало роль S197 в связывании с 14-3-3 и открывало возможность проведения дальнейших структурных исследований.

Работа поддержана грантом РФФ 19-74-10031.

РОЛЬ ЗАМЕН, ИЗМЕНЯЮЩИХ ЛОКАЛЬНЫЙ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ЗАРЯД ПОВЕРХНОСТНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА E, В МИКРОЭВОЛЮЦИИ ВКЭ

А.Г. Литов, Л.Ю. Романова, О.А. Белова, А.Е. Полиенко, А.Д. Аверьянова, М.П. Федина, Г.Г. Карганова

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва

Арбовирусы – это вирусы, которые передаются позвоночным с помощью членистоногого-переносчика, что обуславливает необходимость репродукции таких вирусов в принципиально различных хозяевах. В связи с этим особый интерес представляют эволюционные процессы в популяциях арбовирусов. С этой точки зрения для вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) особый интерес представляют точечные замены, повышающие локальный положительный заряд поверхностного гликопротеина E (ЛПЗ-замены). Ранее было показано, что такие замены закреплялись у ВКЭ при адаптации к клещам и культурам клеток разного происхождения. Помимо этого, они оказались связанными с конкретным фенотипом вируса. Вирусы с подобными заменами имеют сниженную нейротропность для лабораторных мышей при сохранении нейровирулентности, мелкую бляшку при титровании вируса под агаровым покрытием и характеризуются повышенным связыванием с глюкозаминогликанами. Подобные вирусы так же неоднократно выделялись из клещей, собранных в природе. В наших работах было охарактеризовано множество подобных вариантов, имеющих точечные ЛПЗ-замены в разных доменах белка E, полученных нами при адаптации ВКЭ к различным системам, в том числе в клещах и культурах клеток клещей. Кроме того, нами была детально изучена адаптация ВКЭ к культурам клеток. На первом её этапе в популяции вируса появляется большой набор вариантов с разными ЛПЗ-заменами в них. Однако при продолжении адаптации большинство подобных вариантов элиминируются из популяции, и лишь некоторые из них, по-видимому, наиболее приспособленные к условиям культивирования, становятся мажорными. Тем не менее, некоторые минорные варианты с фенотипом, значительно отличающимся от фенотипа основной популяции, могут сохраняться в ней длительное время, и вновь становиться мажорными при смене усло-

наполнения диагностических систем на основе ИФА или иммуночипов. Результатом нашей работы является разработка эффективной кассеты экспрессии, способной обеспечить высокий уровень продукции рекомбинантного белка NS1 вируса Денге или любого другого флавивируса. Мы использовали комплекс сигнальных последовательностей и эффективного промотора для компартиментализации экспрессии в эндоплазматическом ретикулуме растительных клеток.

Работа поддержана грантом Президента РФ МК-569.2020.4

ПОДХОДЫ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ДНК ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ СКВАМОЗНЫХ КАРЦИНОМ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИЕЙ ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ТИПА 16

Е. Баюрова^{1,2}, Д. Авдошина¹, А. Карлсен^{2,3,4}, А. Кондрашова¹, Т. Городничева⁵, Н. Лебедева^{2,6}, М. Носик³, А. Эльмуратов⁷, М. Вонский^{8,9}, А. Рунов^{8,9}, И. Гордейчук^{1,2,10}, Д. Скрастина¹¹, А. Курлянда¹², Ю. Янсонс^{11,12}, М. Исагулянц^{1,2,12,13}

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН;

²НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ; ³Институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова МЗ РФ; ⁴Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования МЗ РФ; ⁵ЗАО «Евроген»;

⁶Московский областной центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями; ⁷ООО «Генотек»; ⁸ВНИИ метрологии им. Д.И. Менделеева; ⁹НМИЦ им. В.А. Алмазова МЗ РФ; ¹⁰Институт трансляционной медицины и биотехнологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; ¹¹Латвийский центр биомедицинских исследований и обучения, Рига, Латвия; ¹²Медицинский университет Страдиня, Рига, Латвия;

¹³Департамент микробиологии, биологии рака и клеточной биологии, Каролински институт, Стокгольм, Швеция

Пандемия SARS-CoV-2 продемонстрировала потенциал генетических противовирусных вакцин. Вирусы папилломы человека – основные этиологические агенты плоскоклеточных карцином (SCC), что мотивирует терапевтическую ВПЧ вакцинацию. Идеальные мишени – онкобелки E6 и E7. Целями работы было определить доминантный тип ВПЧ и сиквенс его E6/E7 белков, разработать ДНК-иммуногены на их основе и оценить их терапевтический потенциал на мышинной модели SCC. Исследовали 189 цервикальных мазков и 40 FFPE образцов SCC, в тч пациентов с ВИЧ и ТВ инфекцией. ДНК проанализировали на наличие 12 типов ВПЧ высокого карциногенного риска. ДНК E6/E7 ВПЧ16 из 32 мазков отсекали методом Сэнгера и из 7 FFPE блоков методом NGS. На основе сиквенсов создали белковый консенсус E6 и E7, синтезировали их оптимизированные гены. Клонированием в pVax1 получили pVaxE6 и pVaxE7. Группам мышей C57Bl/6 (n=5) вводили sc 2×10000 клеток TC-1luc2, экспрессирующих E6/E7 (дар TC Wu) и через 5 дней иммунизировали pVaxE6, pVaxE7, pVaxE6+pVaxE7 раздельно или в смеси, ДНК, кодирующую ревертазный домен ТЕРТ (pVaxrtTERT) или pVax1. За ростом опухолей следили визуализацией биолюминесценции *in vivo* (BLI) и морфометрически. Через 18 дней мышей умерщвляли, инфильтрацию TC-1luc2 в органы оценивали *ex vivo* BLI. Иммунный ответ спленоцитов на *in vitro* стимуляцию E6/E7 пептидами оценивали проточной цитофлуориметрией. Срезы FFPE органов, окрашенных H&E, исследовали на наличие метастаз. Наиболее распространен ВПЧ16, обнаруженный у 4% здоровых, 36% ВИЧ+ и 43% ВИЧ/ТВ+ лиц. На основе 25 E6/E7 и 7 полноразмерных ВПЧ16 сиквенсов составили консенсусы E6 и E7. Кодирующие их синтетические гены охарактеризовали по экспрессии мРНК. Терапевтическая ДНК-иммунизация E6 и rtTERT препятствовала росту раковых клеток, снижая размер опухолей на 30% и инфильтрацию опухолевых клеток в органы мыши на 50%, хотя ДНК E6 не вызвала детектируемого иммунного ответа. E7 и E7 в составе E6+E7, введенных раздельно, индуцировал IFN-g ответ CD8+ Т-клеток, но не имел терапевтического эффекта. Таким образом, были разработаны ДНК-иммуногены на основе E6/E7 ВПЧ16, способные сдерживать рост опухолей в мышинной модели SCC. Их эффективность может быть увеличена комбинацией с ДНК-иммуногеном на основе ТЕРТ. *Благодарность РФФИ 17-54-30002, 20-04-01034 и LZR-2018/2-0308.*

Стендовые доклады

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО АППАРАТА БАКТЕРИОФАГА В1М VB-61, ВХОДЯЩЕГО В СОСТАВ БИОПЕСТИЦИДА «МУЛЬТИФАГ»®

Р.М. Бузиков¹, О.А. Казанцева¹, Т.А. Пилипчук², Л.Н. Валентович², Э.И. Коломиец², А.М. Шадрин¹

¹ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино; ²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Бактериофаг VB-61 более активно лизирует культуру *P. syringae* в отсутствие двухвалентных ионов с образованием бляшек размером 7-9мм. Более 50% частиц фага сорбируется на клетках псевдомонад за первые 3 минуты. Вирионы стабильны в широком диапазоне pH (5–10), прогрев частиц фага 10 минут при 60°C лишь незначительно снижал титр фага. Полученные результаты показывают широкий диапазон условий, при которых вирионы VB-61 сохраняют активность, что является важной характеристикой бактериофага, входящего в промышленный препарат. Размер генома бактериофага VB-61 составляет ~39kbp (GC~56%). При аннотации генома удалось охарактеризовать более половины ОРФ фага. По архитектуре генома VB-61 напоминает бактериофаг T7, геном которого содержит два гена ингибиторов РНК-полимеразы бактерии-хозяина: Gr2 и Gr5.7, а также Gr0.7 – серин-треонин киназу, модифицирующую большое количество белков-мишеней в зараженной бактериальной клетке, в.т.ч. и бактериальную РНК-полимеразу. Гомолога киназы Gr0.7 в геноме VB-61 обнаружить не удалось. Длина гомолога T7-Gr2 (VB-61Gr2) составляет всего 45 аминокислотных остатков (а.о.), в то время как длина T7-Gr2 равна 64 а.о. Тем не менее, укороченный вариант T7-Gr2, длиной 46 а.о. (14-59) был способен ингибировать рост культуры бакте-

рии-хозяина. С другой стороны, VB-61Gr2 содержит делеции в областях петель соединяющих $\beta 1$ - и $\beta 2$ - слои (3 а.о.), а также $\alpha 1$ -спираль и $\beta 4$ -слой, что может указывать на отличия во взаимодействиях между этими транскрипционными факторами и молекулами РНК-полимераз бактерий-хозяев. Второй транскрипционный фактор бактериофага VB-61 (VB-61Gr5.7) – гомолог T7-Gr5.7, необходимого для специфического ингибирования транскрипционной активности ранних промоторов бактериофага T7, что позволяет инфицировать клетки, находящиеся на стационарной фазе роста. Идентичность аминокислотных последовательностей белков T7-Gr5.7 и VB-61Gr5.7 составляет 57%, что с большой вероятностью указывает на важность такого рода ингибиторов транскрипции для успешного размножения бактериофага на бактериях-хозяевах. Возможно, способность VB-61 продуктивно заражать клетки на стационарной фазе роста обуславливает крупный размер колоний на газоне бактерии-хозяина. *Исследование выполнено при поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-516-00015 и № Б20Р-078*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКЗОСОМ ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ САМОРЕПЛИЦИРУЮЩЕЙСЯ РНК (срРНК)

Е.А.Елпаева^{1,2}, А.В. Бродская^{1,2}, В.В. Высочинская^{1,2}, А.В.Васин^{1,2}

¹НИИ группа им. А.А. Смородиной МЗ РФ; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Использование самореплицирующихся РНК (срРНК) для создания генетических вакцин и терапевтических препаратов имеет целый ряд преимуществ перед мРНК, ДНК или нереплицирующимися вирусными векторами, прежде всего за счет пролонгированного характера экспрессии кодируемого антигена. Важную роль при разработке срРНК препаратов играет выбор средства их внутриклеточной доставки. Одним из перспективных носителей для срРНК являются экзосомы – природные везикулы, используемые для межклеточной коммуникации. В работе был сконструирован вектор на основе венецульского энцефаломиелита лошадей, кодирующий ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP). Методом *in vitro* транскрипции с помощью набора mMessage mMachine T7 Transcription Kit получены срРНК (10кВ) и мРНК (1кВ), кодирующие EGFP. Для оценки возможности и эффективности использования экзосом в качестве средства целевой внутриклеточной доставки срРНК были использованы клеточные линии ВНК-21 и А549. В качестве контрольного носителя для срРНК и мРНК использовали липофектамин (Lipofectamine MessengerMAX). Для загрузки срРНК в экзосомы тестировали несколько способов: совместная инкубация срРНК и препарата экзосом, соникация смеси срРНК и экзосом, использование коммерческих трансфицирующих агентов для включения срРНК в экзосомы. Морфологию экзосом оценивали ДЛС и электронной микроскопии. Оценку результатов доставки срРНК проводили с использованием флуориметрических методов детекции предварительно меченой РНК и методом ОТ-ПЦР. Показано, что все образцы РНК включаются в экзосомы с использованием липофектамина с долей потерь до 50%. Не было получено положительных результатов по доставке РНК методом электропорации и нуклеофекции в клетки без использования экзосом или липофектамина, даже в присутствии ингибитора РНКаз. При применении липофектамина образцы РНК в комплексе с ингибитором РНКаз, эффективно (~60%) доставлялись в клетки. Во всех образцах клеток, трансфицированных РНК в составе экзосом, показано наличие нефрагментированной и не подверженной деградации экзогенной мРНК. Для проверки стабильности и функциональности РНК, доставляемой в клетку экзосомами, требуются дальнейшая оптимизация протоколов включения срРНК в экзосомы и трансфекции.

Конкурс молодых ученых

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ДЕТЕКЦИИ РНК ГРИППА А И КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2 С ПОМОЩЬЮ КОМБИНАЦИИ Cas13a-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ И ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Д.Н. Антропов¹, Е.С. Журавлев¹, А.Б. Комиссаров², Л.К. Курбатов³, Д.С. Новопашина¹, Г.А. Степанов¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²НИИ группа им. А.А. Смородиной МЗ РФ, Санкт-Петербург; ³НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

В условиях ежегодных вспышек вирусных эпидемий, большое значение приобретает разработка новых и усовершенствование существующих способов детекции генетического материала вирусных возбудителей. В данной работе, в качестве подхода к высокочувствительному выявлению вирусного материала в образцах была выбрана комбинация изотермической амплификации фрагментов вирусных РНК и их последующая детекция с помощью Cas13a-интерференции. В качестве модельных объектов были выбраны грипп А, вызывающий ежегодные сезонные вспышки заболевания, и коронавирус SARS-CoV-2, являющийся причиной текущей эпидемии COVID-19. Для изотермической амплификации фрагментов вирусных РНК использовали комбинацию ферментов, включающую ревертазу M-MuLV, фрагмент Клёнова ДНК полимеразы *E. coli*, РНКазу H и РНК-полимеразу фага T7. Данная комбинация ферментов позволила увеличить концентрацию необходимого для детекции фрагмента РНК за 15-120 минут до 6-8 порядков. Для моделей РНК гриппа А и коронавируса SARS-CoV-2 была показана возможность сочетания предложенного протокола изотермической амплификации со специфической Cas13a-опосредованной детекцией. Для комбинации данных методов общее время детекции с получением специфического флуоресцентного сигнала может составлять менее 1 часа. Предложенный в данной работе протокол детекции вирусных РНК может в дальнейшем стать основой для разработки клинического метода диагностики вирусных заболеваний человека. *Работа выполнена в рамках Госзадания ИХБФМ СО РАН Нацпроекта Наука. 0245-2019-0001.*

КЛЕТОЧНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРЫВИСТОЙ ТРАНСКРИПЦИИ SARS-CoV-2

С.О. Галкин^{1,2}, А.Н. Анисенко^{1,2,3}, О.А. Шадрина^{2,3}, М.Б. Готтих^{2,3}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, ²Химический факультет, ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

SARS-CoV-2, являющийся этиологическим агентом нового коронавирусного заболевания COVID-19, принадлежит к несистемной группе одноцепочечных (+) РНК вирусов. Основная проблема при изучении молекулярных основ репликации подобных патогенов заключается в невозможности работы с полноразмерным вирусом в лабораториях, не имеющих соответствующих разрешений. Целью данной работы является создание псевдовиральной системы для исследования базовых этапов жизненного цикла коронавируса: репликации РНК-генома и прерывистой транскрипции. Репликация и транскрипция SARS-CoV-2 осуществляются РНК-зависимым РНК-полимеразным комплексом (RdRp), компоненты которого закодированы в ORF1a/b. RdRp комплекс необходим для наработки геномной полноразмерной РНК и продукции укороченных субгеномных РНК (sgРНК). sgРНК образуются в ходе прерывистой транскрипции: RdRp комплексы с синтезируемой РНК диссоциируют от РНК матрицы в сайтах регуляции транскрипции (IGR), перемещаются в 5'-концевую область генома, и завершают синтез sgРНК. К сожалению, до сих пор не существует удобной модели для поиска потенциальных вирусных и клеточных регуляторов процессов репликации и транскрипции генома SARS-CoV-2. В данной работе разработан репликон, состоящий из 5'-UTR SARS-CoV-2, генов устойчивости к пуromицину и люциферазы светлячка (Fluc), соединенных последовательностью, кодирующей Т2А-пептид, IGR SARS-CoV-2, необходимого для протекания прерывистой транскрипции, гена люциферазы Renilla (Rluc), а также 3'-UTR SARS-CoV-2. В отсутствие репликативного аппарата SARS-CoV-2 с реплика генома синтезируется лишь ген устойчивости к пуromицину и Fluc, однако при коэкспрессии репортера с белками из ORF1a/b протекают процессы вирусной репликации и прерывистой транскрипции, что приводит к увеличению уровня продукции Fluc, а также эффективному синтезу Rluc. Соотношение Rluc/Fluc может быть использовано для оценки эффективности процесса прерывистой транскрипции. С использованием этой системы нами определен минимальный набор вирусных белков из ORF1a/b, необходимых для протекания прерывистой транскрипции. Созданная система может быть применена для высокопроизводительного скрининга клеточных факторов, влияющих на репликацию и синтез sgРНК SARS-CoV-2, и потенциальных ингибиторов этих процессов. Работа поддержана грантом РФФИ 20-04-60216.

ПЕРВИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА PHENUIVIRIDAE, ДЕТЕКТИРОВАННЫХ В КЛЕЩАХ IxODES PERSULCATUS

А.В. Деревенцова¹, А.С. Климентов², О.А. Белова¹, И.С. Холодилов¹, Л.А. Беспятова³, С.В. Бугмырин³, А.Я. Иванникова¹, А.Е. Полиенко¹, Е.П. Иешко³, Л.Ю. Романова¹, А.Н. Лукашев⁴, А.П. Гмыль¹, Г.Г. Карганова^{1,5}

¹ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва; ² Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва; ³ Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск; ⁴ Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского и ⁵ Институт трансляционной медицины и биотехнологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Phenuiviridae – семейство оболочечных вирусов с геномом, представленным тремя сегментами одноцепочечной РНК отрицательной и амбисенс полярности. До недавнего времени, переносимые клещами представители этого семейства считали непатогенными для человека и позвоночных животных. После того, как была охарактеризована тяжелая лихорадка с синдромом тромбоцитопении, интерес к переносимым клещами фенуивирусам значительно возрос. Большинство исследований, как правило, ограничиваются молекулярно-генетической характеристикой. Исследование многообразия фенуивирусов позволит изучить их эволюцию. Так же предполагается, что они могут являться или стать арбовирусами и влиять на распространение уже известных патогенных для человека вирусов за счет интерференции и комплиментации. Ранее в клещах *Ixodes persulcatus*, собранных на одной территории в республике Карелия, с использованием универсальной пан-флебовирусной тест-системы были детектированы три новых представителя семейства Phenuiviridae. На основании филогенетического анализа, вирус Gomselga был классифицирован в род Phlebovirus, в него преимущественно входят вирусы, переносимые насекомыми. Некоторые представители этого рода способны вызывать заболевания человека и позвоночных животных различной степени тяжести. Вирусы Pedaselga и Kizhi были классифицированы в род Ixovirus. Целью данной работы была первичная характеристика вирусов Gomselga, Pedaselga и Kizhi. Для оценки эпидемиологических свойств детектированных нами вирусов семейства Phenuiviridae, были созданы и апробированы real-time ПЦР тест-системы для выявления и дифференциации вирусов Pedaselga, Gomselga и Kizhi с возможностью проводить анализ в одной пробирке. Также было проведено высокопроизводительное секвенирование вируссодержающих клещевых суспензий. Были определены последовательности всех трех сегментов вируса Gomselga. Для вируса Kizhi определена последовательность полного L сегмента генома и часть S сегмента генома (кодирует нуклеокапсидный белок). Для вируса Pedaselga определена часть последовательности L сегмента генома и полного S сегмента. В дальнейшем планируется получение рекомбинантных структурных белков исследуемых вирусов, для поиска антител к ним у людей и животных.

БАКТЕРИОФАГИ vB_BcM_Sam46 И vB_BcM_Sam112, ПРЕДСТАВИТЕЛИ НОВОГО РОДА «SAMARAVIRUS» С НЕОБЫЧНОЙ ДОМЕННОЙ СТРУКТУРОЙ МАЛОЙ ТЕРМИНАЗЫ

О.А. Казанцева, Э.Г. Пилигримова, А.М. Шадрин

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино

Одной из проблем здравоохранения является контаминация пищевых продуктов различными патогенами и продуктами их жизнедеятельности, такими как токсины. Группа бактерий *Bacillus cereus*, также именуемая как *B. cereus sensu lato* (sl),

включает хорошо известные патогенные виды: *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto* (ss), *B. cytotoxicus* и *B. thuringiensis*. В данной работе мы описываем новые вирулентные фаги vB_BcM_Sam46 и vB_BcM_Sam112 (Sam46 и Sam112, соответственно), проявляющих литическую активность в отношении группы *Bacillus cereus*. Sam46 и Sam112 были выделены из образцов почвы, собранной в г. Самара. По морфологическому анализу фаги имеют морфотип миовируса. Геномы Sam46 и Sam112 содержат дцДНК с длиной 45419 п.н. и 45037 п.н., соответственно, и одинаковым GC-составом 41,6%. Высокий уровень идентичности полногеномных последовательностей Sam46 и Sam112 (96,0%) указывает на принадлежность фагов к одному виду. Интересной особенностью Sam46 и Sam112 является необычная структура их малой субъединицы терминазы, запускающей упаковку ДНК. Малая субъединица терминазы фагов обладает двухдоменной структурой: типичным С-концевым доменом Terminase_2 (107–230 а.о.) и N-концевым доменом FtsK_gamma (11-70 а.о.), последний ранее не был описан как часть малой субъединицы терминазы. Домен FtsK_gamma является хорошо изученным компонентом моторных белков бактерий, таких как белок FtsK *E. coli* и белок SpoIIIЕ *B. subtilis*, участвующие в делении бактериальных клеток и сегрегации хромосом. Согласно филогенетическому анализу домены FtsK_gamma Sam46 и Sam112 родственны FtsK_gamma доменам *B. cereus* и *B. subtilis*, распознающие и связывающие октамерные асимметричные последовательности, известны как SRS (SpoIIIЕ Recognition Sequence). По-видимому, малая субъединица терминазы фагов может связываться с SRS-сайтами ДНК хозяина, что приводит в конечном итоге к упаковке в головку фага бактериальной ДНК вместо вирусной ДНК, и таким образом способствует горизонтальному переносу генов. Согласно филогенетическому анализу, Sam46 и Sam112 образуют отдельную кладу и, в соответствии с критериями таксономической классификации фагов, являются членами нового рода, для которого мы предложили название 'Samavirus'.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-04-00300.

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2 К НЕЙТРАЛИЗАЦИИ СЫВОРОТКАМИ ПЕРЕБОЛЕВШИХ ЛЮДЕЙ

Н.А. Круглова¹, А.Э. Синявин^{2,3}, Д.В. Мазуров¹

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена РАН;

²НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ; ³Отдел молекулярной нейрориммунной сигнализации,

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

Пандемия COVID-19 стала огромным вызовом для человечества. Большое количество лабораторий по всему миру присоединились к коллективной борьбе с SARS-CoV-2, изучению его биологии и разработке диагностических и терапевтических методов. Важным показателем, коррелирующим с устойчивостью человека к инфекции SARS-CoV-2, является уровень нейтрализующих антител в сыворотке, появляющихся после перенесенного заболевания или вакцинации. Для детекции таких антител было разработано большое количество различных систем на основе псевдовиральных частиц, покрытых S-белком коронавируса. Замена реального вируса на псевдовиральные частицы делает подобные системы безопасными и доступными для большинства лабораторий. Однако, с помощью этих систем можно измерять уровень инфекции, вызванной только свободными частицами. В нашем исследовании была создана псевдовиральная система на основе ВИЧ-1, включающая репортерный вектор, сигнал от которого детектируется исключительно в зараженных клетках и отсутствует в клетках-производителях вирусных частиц. С помощью этой системы был измерен уровень инфекции при сокультивировании клеток-производителей 293Т и чувствительных клеток-мишеней 293Т/ACE2. При сравнении инфекции свободными вирусными частицами и инфекции при сокультивировании клеток была обнаружена гораздо более слабая чувствительность последней к нейтрализации сыворотками переболевших COVID-19 доноров. Поскольку псевдовиральная система не может в полной мере моделировать инфекцию реальным вирусом, подобные эксперименты были проведены с настоящим вирусом SARS-CoV-2 на клетках VeroE6 и показали практически полную устойчивость к нейтрализации при сокультивировании клеток. Подобное наблюдение указывает на то, что в условиях полной блокировки инфекции свободными вирусными частицами в культуре VeroE6 вирус SARS-CoV-2 способен передаваться напрямую между клетками. Значение прямой межклеточной передачи SARS-CoV-2 *in vivo* неизвестно, как и механизмы такой передачи. Однако такой путь мог бы существенно влиять на патогенез COVID-19 и способы борьбы с ней, поэтому требует более детального изучения. *Работа выполнена при поддержке гранта № 075-15-2019-1661 Министерства науки и высшего образования РФ.*

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ СИСТЕМЫ «АРБИТРИУМ» БАКТЕРИОФАГА B83 (vB_BtS_B83)

В.А. Кулябин, А.М. Шадрин

ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушино

Бактериофаги являются одним из наиболее распространенных кластеров организмов в биосфере. Инфицируя прокариот, фаги реализуют несколько стратегий развития, так вирулентные фаги проникают в прокариотическую клетку, запуская транскрипцию генов, необходимых для репликации и сборки фагов, приводящих к лизису бактерии. Умеренные фаги интегрируют свой геном в ДНК клетки-хозяина, находясь интактно в качестве профага. Переход из лизогенного в литический цикл развития затрагивает различные степени регулирования переключения экспрессии генов с помощью транскрипционных факторов. Для координации принятия решения выбора пути развития, бактериофаги, инфицирующие прокариот рода *Bacillus*, используют пептидную коммуникационную систему, называемую «арбитражем». Во время литической инфекции, зараженная клетка производит пептид, который проникает в другие клетки-хозяев. При высокой концентрации пептида предпочтение отдается в сторону выбора лизогенного пути. Управление экспрессии генов регулируется «системой арбитража», которая включает в себя: AimR, AimP, AimX и CI. В этой работе мы даем первичную характеристику системы арбитража фага vB_BtS_B83, отличием которого является то, что в лизогенном состоянии он реплицируется в виде плазмиды. B83 – хвостатый фаг, индуцированный митомицином С из штамма *B. thuringiensis* VKM B-83. Детали механизмов индукции бакте-

риофагов, опосредованных системой «арбитраж» в настоящее время мало изучены. Также остается открытым вопрос о саморегуляции транскрипционных факторов и влияния сопутствующих белков на процесс организации внутри системы. В данной работе проведен анализ регуляторных белков системы «арбитраж», а также промоторов бактериофага vB_BtS_B83. Был произведен биоинформатический анализ последовательностей генов фага B83, в результате которого был установлен расширенный список генов составляющих систему арбитража vB_BtS_B83: gp37, gp38, gp41, gp42 и gp46. Данные гены были клонированы в плазмиду pET33 и получены рекомбинантные белки в системе E. coli BL21(DE3) pET33. Был проведен анализ ДНК-связывающей активности данных транскрипционных факторов, а также их влияние на транскрипционную активность некоторых промоторов бактериофага.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00300.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ СЕГМЕНТИРОВАННЫХ ФЛАВИПОДОБНЫХ ВИРУСОВ

Е.В. Охезин, А.Г. Литов, И.С. Холодилов, О.А. Белова, Г.Г. Карганова

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва

В 2014 году в клещах был впервые идентифицирован вирус Джангмен. Геном данного вируса состоит из четырёх сегментов РНК положительной полярности с полиА на 3'-конце. Последовательность первого сегмента при этом кодирует полимеразу, родственную полимеразе флавивирусов, а третий сегмент – флавивирус-подобную хеликазу. Вторым и четвёртым сегменты кодируют белки, уникальные для данной группы вирусов. На основании этого данные вирусы в настоящий момент отнесены к группе неклассифицированных вирусов, родственных роду Flavivirus. За последние годы было открыто большое количество сегментированных флавибодобных вирусов, что позволило филогенетически разделить данные вирусы на две группы – Джангменвируса и вирусы группы Гуайко Кулекс. В состав группы Джангменвируса входят вирусы Алоншан, Янгоу и собственно вирус Джангмен. Вирусы данной группы, в основном, выделяются из членистоногих (комаров и клещей), однако имеются данные, позволяющие предполагать, что, по крайней мере, вирусы Джангмен и Алоншан могут вызывать заболевания человека. Ранее мы показали, что вирус Алоншан распространён на территории Российской Федерации от Калининграда и Карелии до Республики Тыва. Поскольку Джангменвирусы открыты относительно недавно, их молекулярная биология в целом достаточно плохо изучена. В нашей лаборатории были проведены биоинформатические исследования, которые стали первым этапом в изучении молекулярной биологии данных вирусов. На основании полученных нами полных последовательностей геномов вирусов Алоншан, а так же последовательностей из базы GenBank мы смогли провести анализ синонимичности кодонов в уже известных открытых рамках считывания данных вирусов. Это позволило предположить наличие нового мембранного белка во втором сегменте Джангменвирусов. Помимо этого, мы исследовали 5' и 3' нетранслируемые области на наличие консервативных структур РНК. В 5'НТО сегментов 1,2 и 3 нами были найдены консервативные структуры, содержащие AAGU тетралуп. В 5'НТО сегмента 4 найдена структура, содержащая UGAA тетралуп. Кроме того, нами были обнаружены консервативные структуры в 3' нетранслируемых областях 2 и 4 сегментов.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И РАЗДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЭКЗОСОМ И ВИРИОНОВ ВГА ПРИ ВИРУСНОМ ЗАРАЖЕНИИ КЛЕТОК A549

Л.В. Пурвиньш

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; НИИ гриппа им. А.А. Смородиной МЗ РФ, Санкт-Петербург

Экзосомы – внеклеточные мембранные везикулы диаметром 40-100 нм. Они входят в состав клеточного секрета наряду с микровезикулами и апоптотическими тельцами и являются ключевым средством межклеточной коммуникации. С их помощью происходит перенос широкого спектра биологически активных молекул, включая липиды, белки, мРНК и микроРНК. Одним из важных факторов, влияющих на количество и состав секретуемых белков и везикул, является заражение клеток вирусами. Секретия инфицированными клетками везикул играет важную роль в регуляции сложных взаимоотношений в системе «вирус-хозяин» и может быть адаптирована для выполнения как про-, так и противовирусных функций. Для анализа строения и биохимического состава экзосом, а также их роли в развитии различных заболеваний необходимы полностью воспроизводимые, стандартизованные протоколы получения высокоочищенных препаратов экзосом из различных биологических жидкостей и культуральной среды. Существующие методики для выделения экзосом не являются универсальными для всех биологических жидкостей и требуют оптимизации для каждого из исследуемых образцов. В настоящей работе мы оптимизировали протокол выделения препаратов, содержащих экзосомы и вирусные частицы, из культуральной среды после инфицирования клеток ВГА. Дальнейшее разделение экзосом и вирионов проводили с помощью аффинной хроматографии с использованием моноклональных антител к гемагглютинину вируса гриппа А. В процессе разделения вирусные частицы оставались связанными с антителами, а клеточные экзосомы, не имеющие на поверхности гемагглютинина, элюировались с колонки. Эффективность данного метода была оценена с помощью электронно-микроскопического и электрофоретического анализа получаемых хроматографических фракций. Таким образом, были разработаны и оптимизированы подходы для получения экзосом из инфицированных вирусом гриппа А клеток. Полученные высокоочищенные препараты клеточных экзосом пригодны для дальнейшего исследования их состава и сравнения с экзосомами от здоровых клеток. Кроме того, использование экзосом от инфицированных клеток необходимо для понимания их роли в патогенезе заболевания.

Исследование поддержано Российским научным фондом, грант 20-15-00228.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS PUMILUS NOVOMOSKOVSK* И *BOLOKHOVO*

А.В. Скорынина, О.А. Казанцева, Э.Г. Пилигримова, А.М. Шадрин

Лаборатория биологии вирусов бактерий, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрабина, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино

Изучение и характеристика бактериофагов является важным шагом на пути решения проблемы резистентности бактерий. Накопление данных о специфичности, устойчивости, условиях и особенностях действия фагов позволит разрабатывать новые средства борьбы с бактериальными контаминациями во многих областях: медицине, промышленности и сельском хозяйстве. В данной работе описываются новые бактериофаги Novomoskovsk и Bolokhovo, поражающие *B. pumilus*. Этот вид бактерий обычно рассматривается как непатогенный и используется в качестве источника генетического материала ферментов для биотехнологических производств. Однако некоторые штаммы этого вида способны заражать растения, контаминировать производства, вызывать пищевые отравления и другие инфекции у человека и животных. Отличительной особенностью *B. pumilus* является их высокая устойчивость к ультрафиолету и способность образовывать биоплёнки, что значительно затрудняет борьбу с ними. Бактериофаги Novomoskovsk и Bolokhovo были изолированы из образцов почвы Тульской области. Проведена оценка их специфичности и стабильности. По данным просвечивающей электронной микроскопии и филогенетического анализа оба бактериофага отнесены к семейству Siphoviridae морфотип В, род Andromedalikevirus. По результатам нуклеотидного выравнивания, учитывая 95% порог идентичности последовательностей ДНК в качестве критерия для разграничения вида, Novomoskovsk и Bolokhovo можно отнести к отдельным видам рода Andromedalikevirus. Биоинформатический анализ выявил пектинлиазные домены в вирион-ассоциированных белках обоих фагов. Предполагается, что пектинлиазный домен участвует в деполимеризации биоплёнок. Такая особенность предоставляет фагам, как антибактериальным агентам, дополнительное преимущество.

РОЛЬ СУБЪЕДИНИЦ КОМПЛЕКСА ДНК-ЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ DNA-PK В ТРАНСКРИПЦИИ ВИЧ-1

О.А. Шадрин^{1,2}, М.Б. Готтих^{1,2}

¹Химический факультет и ²НИИ физико-химической биологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В регуляции репликации ВИЧ-1 на разных стадиях участвуют многие клеточные белки. Ранее было высказано предположение о влиянии белкового комплекса ДНК-зависимой протеинкиназы DNA-PK, состоящего из ДНК-связывающего гетеродимера Ku (Ku70/Ku80) и каталитической субъединицы протеинкиназы DNA-PKcs, на эффективность транскрипции с промотора ВИЧ-1, но механизм установлен не был. В связи с этим нами было проведено исследование влияния отдельных субъединиц DNA-PK на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Мы установили, что нокаут Ku70 и Ku80 приводит к снижению эффективности транскрипции с промотора ВИЧ-1 в репортерных векторах в клетках 293Т, а их суперэкспрессия – к повышению. При этом эффекта от нокаута каталитической субъединицы DNA-PKcs не наблюдалось. Анализ РНК-связывающих свойств гетеродимера Ku позволил предположить взаимодействие Ku с РНК, участвующей в регуляции элонгации транскрипции ВИЧ-1, – 7SK РНК. Мы впервые показали взаимодействие Ku с 7SK РНК как на уровне рекомбинантного очищенного белка, так и в клетках 293Т. Также было показано взаимодействие Ku с белками, присутствующими в комплексе с 7SK РНК – HEXIM1 и Cdk9, что позволяет рассматривать Ku как новый компонент комплекса 7SK РНК. Мы проверили, на какую стадию транскрипции ВИЧ-1 влияет Ku, и оказалось, что подавление Ku значительно снижает количество фосфорилированной по Ser5 инициаторной формы РНКП II на промоторе ВИЧ-1, что, с одной стороны, свидетельствует о важности Ku для инициации транскрипции, а с другой, не позволяет объяснить влияние Ku на транскрипцию ВИЧ-1 его включением в комплекс 7SK РНК. Мы предположили, что существует другой фактор, регулирующий инициацию транскрипции ВИЧ-1, уровень которого зависит от уровня Ku в клетке. При анализе данных протеома клеток 293Т дикого типа и с нокаутом Ku70 был обнаружен белок AP4, уровень которого был повышен в 2 раза при нокауте Ku70 и который подавляет инициацию транскрипции ВИЧ-1. Мы получили вариант репортерного вектора, содержащего промотор ВИЧ-1 с делецией сайта связывания фактора AP4. Оказалось, что нокаут субъединиц Ku не влияет на транскрипцию с него. Таким образом, нами впервые было показано, влияние Ku на транскрипцию ВИЧ-1 определяется его влиянием на уровень транскрипционного фактора AP4. Работа поддержана грантом РФФИ №17-14-01107-П.

АЛКАЛОИДЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ВИРУСНОГО СЛИЯНИЯ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

Е.В. Шекунов, С.С. Ефимова, О.С. Остроумова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Постоянная эволюция оболочечных вирусов и приобретение ими резистентности к уже существующим медикаментам вызывает острую необходимость создания новых лекарственных препаратов. Одним из потенциальных методов лечения может стать применение ингибиторов, блокирующих фазу слияния вирусной частицы с мембраной клетки-хозяина. В качестве потенциальных кандидатов на роль ингибиторов могут быть выбраны алкалоиды, обладающие противовирусной активностью. К преимуществам этих соединений можно отнести их биологическую активность, шлейотропность, широкое структурное разнообразие и доступность. В связи с этим, целью нашего исследования стал отбор потенциальных ингибиторов слияния среди растительных алкалоидов и выяснение зависимости их ингибирующей способности от липидного состава мембраны. Методом измерения утечки флуоресцентного маркера кальцеина из одноламеллярных везикул оценена эффективность применения алкалоидов в качестве потенциальных ингибиторов слияния. В роли модельной системы “вирус-клетка” использовали индуцированное слияние между “липосома-липосома”. Слияние индуцировали добавлением 20 мМ и 40 мМ CaCl₂ для системы фосфохолиглицерин/холестерин (ФГ/Хол) (80/20 мол%) и ФГ/фосфохолин/Хол (40/40/20 мол%) соответственно. Установлено, что наиболее выраженным ингибирующим эффектом, в отношении слияния ФГ/Хол везикул, характеризуются пиперин, горденин, люпинин, 3-изобутил-л-метилксантин и таберсонин. Полученные данные согласуются с

результатами оценки размера липосом методом динамического светорассеяния. Обнаружена корреляция ингибирующей способности алкалоидов с выраженностью их действия на кооперативность фазового перехода отрицательно-заряженных липидов, что указывает на возможность их липидопосредованного действия. Введение в состав везикул фосфохолина сопровождается изменением ряда эффективности алкалоидов. Наиболее выраженный эффект проявляют пиперин, люпинин и таберсонин. По результатам исследования можно сделать вывод, что алкалоиды обладают мембранопосредованным ингибирующим действием в отношении кальций индуцированного слияния липидных везикул. Ингибирующее действие алкалоидов зависит от липидного состава целевой мембраны и, скорее всего, связано с различным разупорядочиванием мембранообразующих липидов. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-14-00110.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИРУСНЫХ ТРАНСАКТИВАТОРНЫХ БЕЛКОВ TAT (ВИЧ-1) И Zta (ВЭБ)

А. Шмакова^{1,2}, К. Матаева¹, А. Карпухина^{1,3}, И. Цимайло⁴, Д. Джермини¹, Е. Васецкий^{1,3}

¹UMR 9018, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris Saclay, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ²Институт экспериментальной кардиологии, НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва; ³Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва; ⁴Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) связаны с повышенным риском злокачественных новообразований. Оба вируса кодируют трансактиваторные белки, необходимые для патогенеза вирусной инфекции: белок Tat ВИЧ-1 и белок Zta ВЭБ. Они имеют схожие характеристики: могут секретироваться из инфицированных клеток, проникать в соседние клетки, регулировать вирусную транскрипцию и транскрипцию генов клетки-хозяина, также оба белка ассоциированы с онкогенезом в В лимфоцитах. Поскольку Tat и Zta могут быть обнаружены одновременно в клетках крови и сыворотке, целью настоящего исследования было выяснить, могут ли они взаимодействовать друг с другом. Мы исследовали взаимодействие этих вирусных белков, используя коиммунопреципитацию, и обнаружили, что Tat и Zta взаимодействуют в человеческих В и Т лимфоцитах, и сыворотке крови. Взаимодействие Tat и Zta также наблюдалось в сыворотке ВИЧ-инфицированного пациента. Восстановление флуоресценции расщепленного YFP продемонстрировало, что это взаимодействие происходит преимущественно в ядре, что указывает на то, что оно может оказывать влияние на геном клетки-хозяина. Мы проанализировали действие Tat и Zta на первичные В лимфоциты с помощью секвенирования РНК и обнаружили, что совместное действие Tat и Zta отличается от простой комбинации двух белков. Гены, активируемые только действием Tat или Zta, запускающие иммунный ответ, презентацию антигенов в В лимфоцитах (компоненты МНС, HSP), не изменяют свою экспрессию при комбинации двух белков по сравнению с контролем. Кроме того, только комбинация Tat и Zta, но не действие одного из белков, индуцировала IL-12, который может истощить ответ Т лимфоцитов при злокачественных новообразованиях В лимфоцитов, и IL-17A, который способствует росту В-клеточных лимфом. Эти данные указывают на то, что взаимодействие Tat и Zta может обеспечивать преимущество в избегании иммунного ответа и росте трансформированных В-клеток. Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что Tat ВИЧ-1 и Zta ВЭБ взаимодействуют непосредственно в В, Т лимфоцитах и сыворотке крови, это взаимодействие может быть обнаружено у ВИЧ-инфицированных пациентов. Функциональные эффекты этого взаимодействия еще предстоит выяснить, но они могут быть связаны с иммунным избеганием инфицированных В-клеток.

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОЧИСТКИ РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ gAAV ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ *IN VITRO*

А.А. Шмидт^{1,2,3}, С.Г. Васильева^{1,2}, Д.В. Цвиркун³, А.Ю. Хаматова³, В.А. Логинов^{1,2}, Е.А. Лунев^{1,2,3}, О.А. Веляев^{1,2}, В.В. Скопенкова^{1,2,3}, М.В. Бардина^{1,2,3}, Т.В. Егорова^{1,2}

¹Институт биологии гена РАН; ²ООО «Марлин Биотех»; ³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН, Москва

Векторы на основе рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (recombinant adeno-associated viruses, rAAV) являются важным инструментом для доставки целевых генов в культуры клеток и ткани организма. Многообразие серотипов rAAV с тропизмом к разным типам клеток позволяет применять данные векторы для широкого спектра лабораторных задач, в том числе геномного редактирования, исследований в *in vitro* и *in vivo* моделях, тестирования препаратов генной терапии. Использование панели серотипов rAAV в лабораторной практике диктует необходимость разработки универсальных методов наработки и очистки векторов, основанных на общих физических свойствах вирусных частиц AAV. Целью данной работы является сравнение эффективности протокола продукции, очистки, а также концентрирования и стерилизации препаратов rAAV с генами-репортерами 1, 2, 6, 9 и DJ серотипов, используемых в нашей лаборатории для экспериментов *in vitro*. Сборку вирусных частиц проводили методом транзитной тройной трансфекции адгезивных клеток НЕК293Т на чашках Петри (147,8 см²). Очистка AAV включала последовательные стадии преципитации вирусных частиц полиэтиленгликолем 8000, экстракции хлороформом, ультрацентрифугирования в градиенте плотности йодиксанола и диализа. Затем препарат AAV концентрировали центрифугированием через 100 кДа мембрану до примерного титра 2E+13 ГК/мл (геномных копий/мл) и стерилизовали. Титр вируса определяли методом количественной ПЦР в реальном времени с зондом к инвертированным повторам. В результате стадий продукции, очистки, концентрирования и стерилизации средний выход вирусных частиц 1, 2, 6, 9 и DJ серотипов составил 4,7E+09 (n=2), 5,9E+08 (n=3), 5,9E+09 (n=2), 3,5E+10 (n=5) и 2,1E+10 ГК/см² (n=4) соответственно. Полученные rAAV с репортерным геном были протестированы в различных экспериментах *in vitro*. Препараты rAAV-6 и DJ эффективнее других заражали мышинные нейроны и зиготы, серотип 9 был использован для заражения мышинных кардиомиоцитов. rAAV-DJ также показал свою эффективность для заражения мышинных и человеческих миоцитов. Таким образом, нами была показана эффективность разработанного универсального протокола очистки rAAV на примере 5 разных серотипов и продемонстрировано их применение в исследованиях *in vitro*.

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

Устные доклады

СЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ pH В КЛЕТКАХ НА ОСНОВЕ ГЕНОМНЫХ ИНТЕРКАЛИРОВАННЫХ МОТИВОВ

Н.А. Петрунина¹, А.В. Тураев¹, В.В. Лебедев¹, А.В. Аралов², Т.С. Зацепин³, М.А. Лагарькова¹, Г.Е. Позмогова¹, А.М. Варижук¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ³Сколковский институт науки и технологий, Москва

Геномные интеркалированные мотивы (iM) устойчивы в диапазоне концентраций протонов, оптимальном для формирования гемипротонированных цитозиновых пар. За счёт этого они могут выступать в роли биосенсоров в живой клетке, поскольку обладают высокой чувствительностью даже к малым изменениям pH. В работе рассматривались биосенсоры, состоящие из геномных и модельных олигодеоксирибонуклеотидных последовательностей (ОДН) iM, меченных флуорофором с одного конца и гасителем или донором с другого. По соотношению кривых плавления и отжига iM (т.е. по термическому гистерезису) было показано, что скорость отклика iM на изменение температуры коррелирует со скоростью отклика на изменение pH, которая определялась методом остановленного потока. Кинетика отклика iM на изменение pH описывалась биэкспоненциальной функцией, что указывает на двухэтапный процесс образования конформеров: формируется кинетически предпочтительный («быстрый») и термодинамически предпочтительный («стабильный») конформер, с последующей постепенной перегруппировкой «быстрого» в «стабильный». Данное исследование позволило провести предварительный отбор быстрых сенсоров. По результатам *in vitro*-экспериментов, в том числе на клетках методом флуоресцентной микроскопии, из серии геномных сенсоров-кандидатов с различными метками был отобран лидер на основе ОДН из гена ATXN2L (FAM-ATX-BHQ) и выбрана модельная ОДН с известной вторичной структурой (FAM-C5T1-M0-TAMRA). Рассмотренные сенсоры имеют тенденцию концентрироваться в ядрах клеток. Одним из ограничений использования сенсоров на основе iM является их чувствительность к изменениям температуры, ионной силы и возможная деградация сенсора нуклеазами. Через 3-4 дня после трансфекции применимость сенсоров ставится под сомнение, так как происходит перераспределение флуорофоров в клетках. Первое поколение предложенных нашей группой сенсоров [1] не предусматривает защиты от нуклеаз; сенсоры второго поколения на основании последовательности C5T1 несут модификации в петлях, препятствующие деградации iM, а также улучшающие кинетические характеристики (скорость отклика сенсора на изменение pH).

1. A.V. Turayev, et al, "Genomic DNA i-motifs as fast sensors responsive to near-physiological pH microchanges" // Biosensors and Bioelectronics, 175 (2021) 112864

МЕТОД УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ДИАГНОСТИКЕ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ХИЛОМИКРОНОВ

Д.И. Строкогов

Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Новосибирск

В настоящее время изучение нарушений метаболизма хиломикроннов является актуальной проблемой. Согласно современным данным, эти нарушения представляют собой значимый фактор риска развития атеросклеротического поражения сосудов. Существующие методы измерения хиломикроннов в видимом диапазоне длин волн несовершенны, т.к. либо не обладают достаточной скоростью измерения, либо не способны определять характеристики хиломикроннов с достаточной точностью. Переход в ультрафиолетовую область измерения расширяет возможности детекции и характеристики более мелких частиц, которые недоступны для обнаружения, и тем более для определения их характеристик в видимом диапазоне. Также использование ультрафиолетового диапазона перспективно для исследования оптических и, следовательно, морфологических свойств субмикронных частиц в связи с тем, что короткая длина волны более чувствительна к неоднородностям частиц, чем длина волны видимого диапазона света. Поэтому нами впервые был предложен метод измерения светорассеяния с угловым разрешением в проточной цитометрии в ультрафиолетовом диапазоне длин волн.

Возможности измерения светорассеяния с угловым разрешением ультрафиолетового света были продемонстрированы на примере характеристики хиломикроннов крови человека. В нашей работе впервые стало возможным характеризовать частицы размером менее 200 нм с помощью проточной цитометрии, что особенно важно для характеристики хиломикроннов, которые оптически малы по сравнению с длиной волны видимого света. Характеристики хиломикроннов, такие как размер и показатель преломления, были определены на уровне одиночных частиц, т.е. для каждого хиломикрона, на основе измерений светорассеяния с угловым разрешением. Причем скорость измерения каждого хиломикрона занимает менее 1 мс. Измерения с помощью ультрафиолетового лазера значительно сместили границу детекции частиц в область малых размеров.

Таким образом, впервые в проточной цитометрии появилась возможность измерять хиломикронны крови по их угловой зависимости рассеяния ультрафиолетового света на длине волны 360 нм. Данная работа открывает новые возможности в изучении динамики элиминации хиломикроннов, что позволит обеспечить своевременное обнаружение нарушения метаболизма жиров, а также мониторинг индивидуального подхода к лечению заболеваний.

РАЗРАБОТКА КОНСТРУКЦИЙ АНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ РЕЦЕПТОРНОГО АНАЛИЗА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Т.С. Серченя, И.В. Горбачева, О.В. Свиридов

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Бета-лактамы являются основой современной химиотерапии в медицине и ветеринарии. Поэтому высокочувствительные системы детекции этих противомикробных препаратов в продуктах питания животного происхождения являются актуальным и необходимым инструментом для обеспечения биобезопасности продовольствия. Новым и перспективным методом является биоанализ на основе лиганд-рецепторной реакции, который обеспечивает высокую чувствительность, выявление активных реакционноспособных форм антибиотиков и широкую групповую специфичность. В нашей работе получены основные реагенты и созданы конструкции аналитических систем рецепторного анализа бета-лактамов в микропланшетном формате и на хроматографических тест-полосках. Синтезированы и исследованы методами УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии и рецепторного анализа 15 конъюгатов пенициллинов и цефалоспоринов с сывороточным альбумином и овальбумином, несодержащих линкеров между молекулами антибиотика и белка. Установлено, что биоаналитические свойства конъюгатов на твердой фазе зависят в большей степени от природы и количества присоединенного антибиотика, чем от метода и сайта конъюгирования. Показано, что бета-лактамыный цикл конъюгированных антибиотиков остается интактным и доступен для лигандсвязывающего центра рецептора – рекомбинантного пенициллинсвязывающего белка (ПСБ) как при модификации аминогруппы в боковой цепи молекулы антибиотика, так и карбоксильной группы вблизи бета-лактамыной группировки. В рецепторноаналитических системах конъюгаты ампициллина, амоксициллина и цефалексина иммобилизовали в лунках микропланшета или на мембране тест-полоски. В ходе анализа с конъюгированным антибиотиком связывался ПСБ в составе его комплекса с моноклональным антителом, которое детектировали ферментной меткой в микропланшетах или наночастицами золота на тест-полосках. Взаимодействие твердофазного конъюгата с рецептором конкурентно ингибировалось антибиотиками бета-лактамыного ряда, внесенными в жидкую фазу. Аналитическая чувствительность в отношении пенициллина G составила 0,05 и 1 нг/мл соответственно для микропланшетной и рецепторнохроматографической тест-систем. Разработанные конструкции могут служить моделями наборов реагентов для количественного или экспрессного анализа бета-лактамыных антибиотиков в пищевой продукции.

ВЛИЯНИЕ 157 ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ НА РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА ГЕПАТИТА D

В.Г. Воля¹, А.П. Костюшева¹, С.А. Брезгин¹, Н.И. Пономарева^{1,2}, Dieter Glebe³, Д.С. Костюшев¹, В.П. Чуланов^{1,2}

¹НМИЦ фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний МЗ РФ; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия ³Institute of Medical Virology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

Введение: вирус гепатита D (HDV) вызывает одну из тяжелых форм хронических заболеваний печени. В настоящее время отсутствуют препараты прямого противовирусного действия для лечения HDV. Системы CRISPRa позволяют активировать транскрипцию генов за счет работы белка dCas9, соединенного с активатором транскрипции. dCas9 направляется к регуляторным элементам в геноме при помощи РНК-проводников. Системы CRISPRa позволяют анализировать эффекты гиперэкспрессии внутриклеточных факторов на репликацию HDV, тем самым являются мощным инструментом для поиска новых мишеней для терапии инфекционных заболеваний и изучения взаимодействий между вирусом и клеткой. Материалы и методы: были созданы ПЦР-продукты, кодирующие один из 157 РНК-проводников, под контролем промотора U6. РНК-проводники нацелены на промоторы генов-мишеней, которые относятся к семействам сенсоров нуклеиновых кислот, РНКаз, эффекторных молекул, факторов модификации нуклеиновых кислот и др. РНК-проводники с системой CRISPRa трансфицировали в клетки HepG2 с плазмидой, кодирующей геномную и антигеномную формы HDV. Активацию целевых генов оценивали с помощью ПЦР по анализу уровней мРНК. Противовирусное действие анализировали по измерению общей РНК HDV на 5 сутки после трансфекции. Результаты: показано, что около 65 внутриклеточных факторов оказывало умеренное противовирусное действие, снижая уровни внутриклеточной РНК HDV до 50%, среди них POLR3K, IFITM1, IFIT2, SEBPZ, SERPINB9, PIAS3, RSAD2, PLSCR1, MND A, TRIM56, IGF2BP1, YTHDC1, HNRNPA1L2, HNRNPUL2, HNRNPUL1, LFN14, EIF3L, OAS3, RNase1, 4-5, 6,8 и 9, 10, Mett13. Ряд факторов (MND A, HNRNPUL2, RNase 10, Mett13 и др.) обеспечивал снижение уровней РНК HDV на 80% и более. Действие большинства наиболее эффективных факторов, включая MND A, HNRNPUL2 и Mett13, впервые описано на модели HDV. Заключение: определены внутриклеточные факторы, активация которых вызывает мощное противовирусное действие. Наибольшим противовирусным эффектом на модели HDV обладали факторы MND A, HNRNPUL2, RNase 10, Mett13. Выявленные гены потенциально могут быть использованы для создания препаратов для лечения HDV-инфекции. Работа была поддержана грантом РФФИ-DFG №20-515-12010 и GL595/9-1; дизайн РНК-проводников выполнялся в рамках РФФИ №20-015-00442.

ОРТОСТЕРИЧЕСКИЕ И АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА И ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИХ СТЕРОИДОГЕННОГО ЭФФЕКТА ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ

К.В. Деркач¹, А.А. Бахтюков¹, В.Н. Сорокоумов^{1,2}, А.О. Шпаков¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН; ² Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Лигандами ортостерического сайта рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГ) являются ЛГ и его структурный гомолог хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Они с высокой аффинностью связываются с ортостерическим сайтом рецептора, расположенным в его внеклеточном домене, и стимулируют сопряженные с ним гетеротримерные G-белки и β -аррестины, запуская широкий спектр внутриклеточных каскадов в клетках-мишенях. Применение ЛГ и ХГЧ является одним из подходов для коррекции андрогенного дефицита и гипогонадотропных состояний у мужчин и для осуществления контро-

лируемой индукции овуляции при вспомогательных репродуктивных технологиях у женщин. Однако использование коммерческих препаратов гонадотропинов в медицине ограничено рядом побочных эффектов, среди которых быстрое развитие резистентности к ним тканей, низкая селективность к внутриклеточным эффекторам, существенные отличия от природных форм гонадотропинов по фармакодинамике и иммуногенности. В соответствии с этим одним из альтернативных путей регуляции ЛГ-зависимых физиологических процессов является применение аллостерических агонистов рецептора ЛГ. Наиболее перспективными в этом отношении являются производные тиено[2,3-d]пиримидина (ТП), которые легко проникают в расположенный внутри трансмембранного домена аллостерический сайт, специфично с ним связываются и активируют рецептор и сопряженные с ним Gs-белки. Нами разработано несколько активных аналогов (ТП01, ТП03, ТП04, ТП21–ТП23), которые при внутривнутреннем и пероральном введении самцам крыс стимулируют стероидогенез в клетках Лейдига, повышая продукцию тестостерона, а также улучшают качество сперматозоидов. В отличие от гонадотропинов, стероидогенные эффекты ТП устойчивы во времени (в течение 10 дней введения), не вызывают снижения экспрессии рецепторов ЛГ в семенниках и развития их резистентности к эндогенным гонадотропинам. При длительном введении ТП эффективны у самцов крыс с метаболическим синдромом и сахарным диабетом 2 типа, превосходя по стероидогенному эффекту ХГЧ. Метформинотерапия в значительной степени усиливает стероидогенные эффекты ТП, что указывает на перспективность совместного применения метформина и ТП для восстановления репродуктивных функций при метаболических расстройствах. *Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-75-20).*

ВЛИЯНИЕ СОЛОКСОЛОН МЕТИЛА НА ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЕ ВОСПАЛЕНИЕ

Е.Б. Логашенко¹, А.В. Марков¹, А.В. Сенькова¹, В.О. Бабич¹, К.В. Одаренко¹, В.А. Талышев¹, О.В. Саломатина, Н.Ф. Салахутдинов, М.А. Зенкова¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

Воспаление является иммунным ответом, направленным на восстановление повреждений тканей, вызванных различными факторами. В настоящее время в ответ на воздействие повреждающих факторов внешней среды, таких как курение табака, промышленные аэрозоли и др. всё чаще фиксируют случаи развития хронического воспаления легких, одним из опасных последствий которого может стать хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ). Важное место в патогенезе ХОБЛ занимают моноциты-макрофаги и цитокины, продуцируемые ими. Таким образом, ингибирование активации макрофагов является потенциальным методом уменьшения тяжести воспалительных заболеваний. В качестве модели воспаления были использованы макрофаги, активированные ЛПС. В качестве соединения, которое «препятствует» развитию воспалительных процессов использовали полусинтетическое производное глицеретовой кислоты солоксолон метил (СМ), поскольку ранее было показано, что СМ препятствует развитию воспалительных изменений в тканях легких мышей, вызванных вирусом гриппа. В ходе проведенных исследований было обнаружено, что СМ проявляет двойственное действие на ЛПС-индуцированный про-воспалительный клеточный ответ. С одной стороны, СМ эффективно блокирует вызванный эндотоксином окислительный стресс в макрофагах, снижая продукцию активных форм кислорода и оксида азота и восстанавливая содержание восстановленного глутатиона до контрольного уровня, а также ингибирует фагоцитарную и хемотаксическую активность макрофагов, что сопровождается подавлением сигнального пути NF-κB и активацией Akt. С другой стороны, СМ значительно усиливает в макрофагах индуцированную ЛПС экспрессию провоспалительных цитокинов посредством активации сигнальной оси c-Jun / TLR4. Эти данные были подтверждены *in vivo*. Было обнаружено, что СМ подавляет перитонит, вызванный каррагенаном. При этом протективного действия СМ в случае ЛПС-индуцированной эндотоксемии обнаружено не было. Полученные результаты 1) дают новое понимание иммуномодулирующих эффектов циан-еноновых тритерпеноидов; 2) эти соединения в высоких нетоксичных концентрациях могут проявлять синергетические эффекты с ЛПС в индукции экспрессии цитокинов макрофагами; 3) продемонстрировали способность СМ снижать тяжесть местного воспаления. *Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-74-30011.*

АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 С ЛЕГКИМ И ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

А.И. Манолов, Д.Е. Федоров, А.В. Павленко, К.М. Климина, В.В. Бабенко, Ю.С. Галева, В.А. Веселовский, Д.И. Болдырева, М.Д. Морозов, Е.Н. Ильина

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Микробиота дыхательных путей может влиять на подверженность человека респираторным вирусным инфекциям [1, 2]. Это обусловлено взаимодействием микробиоты с иммунной системой организма хозяина, взаимодействием микробных метаболитов с вирусами и способностью микроорганизмов влиять на уровень экспрессии рецепторов, необходимых для проникновения вируса. Мы предположили наличие связи между составом респираторной микробиоты и вероятностью развития и тяжестью течения новой коронавирусной инфекции. При помощи метагеномного секвенирования генов 16S рибосомной РНК мы проанализировали состав респираторной микробиоты у 336 пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19. Для анализа использовался материал, собранный из мазков носоглотки. Сбор образцов проводился в учреждениях, являющихся участниками академического содружества, во время первой и второй волны эпидемии в России. Анализ ассоциаций проводился на уровне типов микробных сообществ, а также на уровне отдельных таксонов. При проведении анализа мы учли пол, возраст, город проживания, наличие сопутствующих заболеваний у пациентов, а также месяц сбора биоматериала. На основании метагеномных данных микробные сообщества были разделены на шесть типов. Два типа были ассоциированы с более тяжелым течением заболевания, а один из типов оказался характерен для пациентов с низким уровнем повреждения легких. Анализ дифференциальной представленности показал, что представители родов *Rothia* и *Streptococcus* ассоциированы с более тяжелым поражением легких, а *Leptotrichia*, неклассифицированные *Lachnospiraceae* и *Prevotella* – с более легки-

ми формами заболевания. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 21-15-00431 («Метагеномный анализ респираторного биотопа человека на фоне пандемической коронавирусной инфекции и в последующей сезонной динамике»).

1. Abt, Michael C., et al. "Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity." *Immunity* 37.1 (2012): 158-170.
2. Kamio, Noriaki, et al. "Neuraminidase-producing oral mitis group streptococci potentially contribute to influenza viral infection and reduction in antiviral efficacy of zanamivir." *Cellular and Molecular Life Sciences* 72.2 (2015): 357-366.

ПОИСК И ВАЛИДАЦИЯ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ ВОСПАЛЕНИЯ ЛЕГКИХ, НА МОДЕЛИ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОГО ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГКИХ

А.В. Сенькова, И.А. Савин, А.В. Марков, М.А. Зенкова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Острое повреждение легких, клинически выражающееся в развитии острого респираторного дистресс-синдрома, возникает в результате действия инфекционных агентов различной природы, а также неблагоприятных факторов окружающей среды и характеризуется выраженным воспалением дыхательных путей. Для понимания ключевых молекулярных механизмов развития острого повреждения легких на фоне воспаления, а также для идентификации основных элементов регуляторной сети при развитии повреждения легких различной этиологии, с помощью биоинформатического анализа баз данных полногеномного микрочипирования были отобраны гены – мастер-регуляторы острых воспалительных процессов в легких. Валидацию данных биоинформатического анализа проводили на модели ЛПС-индуцированного острого повреждения легких у мышей, а для оценки уровней вовлеченности потенциальных генов мастер-регуляторов в развитие острого воспаления легких анализ уровней экспрессии генов-мишеней проводили на фоне терапии противовоспалительными соединениями с различным механизмом действия: дексаметазоном и солоколосон метилом. При остром повреждении легких генами, для которых наблюдалось значительное повышение экспрессии, были гены, кодирующие провоспалительные цитокины и хемокины (IL-6, Ccl2), гены, участвующие в регуляции внеклеточного матрикса (Timp1, Eln), а также гены, важные для иммунного ответа и воспаления в целом (Serpine1, Socs3, Ptx3). Одновременно, пониженный уровень экспрессии наблюдался для гена Cat, отвечающего за антиоксидантную активность. Дексаметазон и солоколосон метил эффективно подавляли развитие признаков ЛПС-индуцированного воспаления у мышей: снижали уровень провоспалительных цитокинов в бронхоальвеолярной жидкости и сыворотке крови, блокировали развитие воспалительной инфильтрации в тканях легких, а также данные соединения подавляли экспрессию up-регулируемых генов и повышали экспрессию down-регулируемого гена Cat в тканях легких. Таким образом, идентифицированные гены могут служить потенциальными мишенями для терапии острого повреждения легких разной этиологии, а также могут быть использованы в качестве диагностических и прогностических маркеров при остром повреждении легких, в том числе, связанном с SARS-CoV-2. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ №19-74-30011.

АНАЛИЗ НОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ, С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/Cas9

Е.В. Филатова, Э.Ц. Барадиева, А.Л. Класс, Д.И. Смирнова, И.Н. Власов, С.И. Шрам, М.И. Шадрин, П.А. Сломинский

Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – самая распространённая наследственная болезнь сердца, характеризующаяся гипертрофией стенки преимущественно левого желудочка, и встречающаяся в общей популяции с частотой 1:200. По современным представлениям в большинстве случаев ГКМП – аутосомно-доминантное заболевание, обусловленное патогенными вариантами в основном в генах MYBPC3 и MYH7. Однако минимум в четверти случаев генетические причины ГКМП остаются не выясненными. Кроме того, из-за низкой встречаемости большинства патогенных вариантов в популяции и небольшого размера семей до конца прояснить патогенетическую значимость большинства выявленных потенциально патогенных вариантов даже в основных генах ГКМП классическими методами, например, косегрегационным анализом, не представляется возможным. Поэтому необходимо проводить поиск и анализ новых потенциально патогенных вариантов с помощью современных молекулярно-генетических методов, таких как геномное редактирование, и использованием клеточных технологий. В связи с этим, целью данной работы стали изучение и оценка влияния патогенетически значимых вариантов, как доказанных, так и потенциальных, в генах MYBPC3 и MYH7 на фенотип кардиомиоцитов крысы. Для этого в геном клеток линии H9c2 с помощью технологии CRISPR/Cas9 и гомологичной рекомбинации вводили точечные замены, приводящие как к доказанным мутациям, так и к новым потенциально патогенным вариантам, чья патогенетическая значимость была предсказана биоинформатическими методами. После отбора клонов, несущих такие замены, оценивали фенотип клеток, несущих мутацию. В ходе работы получены первые данные о влиянии патогенных вариантов на фенотип дифференцированных до кардиомиоцитов клеток линии H9c2. Полученные данные позволяют сделать вывод о потенциальной патогенетической значимости изученных вариантов при развитии ГКМП. В целом полученные нами данные расширяют наши представления как об этиопатогенезе ГКМП, так и механизмах функционирования сердечно-сосудистой системы. Работа была выполнена с помощью оборудования Центра коллективного пользования «Центр клеточных и генных технологий» Института молекулярной генетики. Работа поддержана грантами РФФИ № 19-015-00343.

ПРИНЦИПЫ И МЕХАНИЗМЫ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ G-БЕЛОК-СОПРЯЖЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

А.О. Шпаков

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Регуляция функциональной активности сопряженных с гетеротримерными G-белками рецепторов (GPCR) осуществляется путем высокоаффинного связывания гормонов, ростовых факторов и других эндогенных регуляторов с их ортостерическим сайтом. Однако в последние годы все больший интерес представляет аллостерическая регуляция GPCR, которая осуществляется путем низкоаффинного связывания различных классов соединений с аллостерическими сайтами, которых в молекуле рецептора, в отличие от ортостерического сайта, может быть несколько. Аллостерические сайты располагаются в различных локусах GPCR, включая внеклеточные и цитоплазматические петли рецептора и внутреннюю полость трансмембранного канала и его внешнюю поверхность, граничащую с гидрофобным матриксом плазматической мембраны. По активности лиганды аллостерических сайтов могут быть полными и инверсионными агонистами или нейтральными антагонистами, воздействуя на базальную активность GPCR, а также функционировать как положительные или негативные модуляторы, влияющие на связывающие характеристики и максимальный стимулирующий эффект агонистов ортостерического сайта. К эндогенным аллостерическим регуляторам относятся катионы некоторых металлов (Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), аминокислоты (Phe, Tug, Trp, Leu, Ile, гомоцистеин), пептиды и белки (глутатион, протамин, 5-НТ-модулин, динорфин), липиды (холестерин, олеамид, анантамид, арахидоновая кислота, липоксин А4, прогестерон), а также специфичные к внеклеточным участкам GPCR антитела. Аллостерические регуляторы ответственны за избирательность передачи гормонального сигнала с GPCR к внутриклеточным эффекторам, поскольку стабилизируют рецептор в конформации, которая обеспечивает эффективное взаимодействие рецептора с определенными типами G-белков и β -аррестинов. Вследствие этого воздействие одного и того же ортостерического агониста GPCR, эндогенного или синтетического, на внутриклеточные мишени может существенно различаться в присутствии различных аллостерических модуляторов. К механизмам аллостерической регуляции также относят гомо- и гетероолигомеризацию GPCR, от которой зависит эффективность лигандов и селективность регуляции ими внутриклеточных мишеней. *Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-75-20122).*

МЕТАБОЛИЗМ НИКОТИНАМИДРИБОЗИДА – НУКЛЕОЗИДНОЙ ФОРМЫ ВИТАМИНА В3 – В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

А.В. Кропотов¹, В.А. Куликова^{1,2}, Л.В. Соловьева¹, М.П. Светлова¹, А.П. Якимов^{1,3}, К.Б. Неринковский⁴, Ю.С. Судница², С.П. Гамбарян², А.А. Никифоров¹

¹Институт цитологии РАН; ²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН; ³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; ⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) – ключевой посредник различных метаболических и регуляторных процессов в клетках человека и животных. Основным способом регуляции уровня NAD является его биосинтез из поступающих с пищей производных витамина В3: никотиновой кислоты, никотинамида (Nam) и никотинамидрибозида (NR). Попадая в клетку, нуклеозид NR фосфорилируется киназами NRK до соответствующего мононуклеотида NMN, который потом используется для синтеза NAD. Введение в организм NR эффективно повышает уровень внутриклеточного NAD и тем самым восстанавливает физиологические функции, ослабленные или утраченные в экспериментальных моделях старения и различных патологий. Несмотря на активное использование NR в прикладной биомедицине, механизмы его утилизации клетками до конца не изучены. В данной работе, используя фармакологическую и генетическую модуляцию активности белков, а также метод количественной оценки метаболитов при помощи ЯМР-спектроскопии, мы изучали, как нуклеозид NR метаболизируется культивируемыми клетками человека и мышами. Мы показали, что после импорта в клетки представителями семейства уравнивающих переносчиков нуклеозидов NR интенсивно конвертируется в Nam. Сверхэкспрессия цитозольной пуриноклеозидфосфорилазы (PNP) увеличивала, тогда как ингибирование PNP иммуциллином Н блокировало превращение NR в Nam в различных типах культивируемых клеток. В клетках HEK293, нокаутных по PNP, расщепления NR до Nam не наблюдалось. Более того, мы обнаружили, что NR также быстро расщепляется до Nam после внутриклеточного введения мышам, и это расщепление подавляется иммуциллином Н. Наконец, мы продемонстрировали, что фармакологическое или генетическое подавление PNP потенцирует синтез NAD из NR в клетках человека. Таким образом, мы установили, что помимо фосфорилирования нуклеозид NR интенсивно расщепляется в цитозоле до соответствующего основания Nam белком PNP, и данное расщепление может являться альтернативным способом утилизации NR для синтеза NAD в клетках человека и животных. *Работа выполнена при поддержке грантов РФФ № 21-14-00319 и РФФИ № 19-34-60039.*

УЧАСТИЕ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗ HDAC1 И HDAC2 В ГИБЕЛИ КЛЕТОК СПИНОМОЗГОВЫХ ГАНГЛИЕВ КРЫСЫ ПОСЛЕ ПЕРЕРЕЗКИ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА

В.А. Дзряя, С.В. Родькин, М.А. Питинова, А.Б. Узденский

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии, лаборатория молекулярной нейробиологии, Ростов-на-Дону

Иммуноблоттинг показал, что в аксотомированных ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы (DRG, dorsal root ganglia) наиболее ранние и специфичные изменения наблюдались со стороны гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2, экспрессия которых возрастала после перерезки седалищного нерва через 1 и 4 часа, соответственно. Кроме того, аксотомия через 24 часа вызывала значительное снижение уровня ацетилирования лизина 9 в гистоне H3. Это происходило задолго до развития апоптоза. Так как активация гистондеацетилаз и деацетилирование гистонов приводят к подавлению белкового синтеза, то можно рассматривать повышение уровня гистондеацетилаз HDAC1 и HDAC2 как начальные этапы патологического процесса. Вероятно, эти белки готовят последующие изменения других белков и общую реакцию клеток DRG ганглиев

на перерезку седалищного нерва. Экспрессия фактора транскрипции E2F1 в аксотомированных нейронах DRG повышалась через 4 часа, проапоптотических белков p53 и каспазы 3 – через 24 часа. Через 7 суток повышался уровень маркеров дегенерации и регенерации аксона APP и GAP-43. Ингибитор HDACs вальпроат натрия показал нейропротекторную активность в аксотомированных DRG. Этот эффект демонстрировался снижением проапоптотических белков E2F1, p53 и caspase 3 в аксотомированных DRG подопытных крыс, которым вводили препарат. Ингибирование гистондеацетилаз HDAC1 и HDAC2 защищало глиальные клетки DRG ганглиев крыс от апоптоза, вызванного аксотомией. Кроме того, инъекции вальпроата в течение 7 дней снижали накопление APP в нейронах DRG, повышали уровень GAP-43, а также предотвращали вызванное аксотомией снижение уровня ацетилирования гистонов H3 и H4, которое может приводить к снижению белкового синтеза в клетке. Метод двойной иммунофлуоресцентной микроскопии показал, что перерезка седалищного нерва вызывает транслокацию HDAC1 и белка p53 из ядра в цитоплазму в первые 24 часа после аксотомии. Таким образом, наши данные свидетельствуют о вовлеченности HDAC1 и HDAC2 в вызванное аксотомией повреждение нейронов DRG и глиальных клеток. Исследуемые белки могут служить в качестве потенциальных молекулярных мишеней при разработке нейропротекторов. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Минобрнауки РФ № 0852-2020-0028 и стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых.

КИШЕЧНАЯ МИКРОБИОТА ОПРЕДЕЛЯЕТ МЕТАБОЛИЗМ ГЛИЦИНА В МОЗГЕ И ВЛИЯЕТ НА ПОВЕДЕНИЕ ХОЗЯИНА В МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО КОЛИТА НА МЫШАХ Muc2

М.В. Морозова^{1,2,3}, М.А. Борисова⁴, О.А. Снытникова⁵, Ю.П. Центалович⁵, Е.Н. Кожевникова^{1,2,6}

¹НИИ нейронаук и медицины, ²Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, ³Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, ⁴Институт цитологии и генетики СО РАН, ⁵Международный томографический центр СО РАН, ⁶Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это комплекс хронических и рецидивирующих заболеваний желудочно-кишечного тракта со сложной этиологией и отсутствием стратегий для полного излечения. ВЗК часто осложняются психическими расстройствами, включая тревожность, депрессию, биполярное расстройство и другие, что указывает на существенное нарушение оси кишечник-мозг. Однако механизмы, объясняющие связь ВЗК с нарушениями психоэмоциональной сферы, все еще до конца не ясны. В этой работе мы используем поведенческое фенотипирование трансгенной мышшиной модели хронического колита Muc2, а также метагеномное и метаболомное профилирование, чтобы показать решающую роль кишечной микробиоты в физиологии ЦНС и поведении хозяина на фоне воспаления кишки. Мутантные мыши Muc2 демонстрируют повышенную активность и исследовательское поведение, вызванное новизной, снижение тревожности, стереотипного поведения, габитуации и стартл-рефлекса несмотря на сильное воспаление и повреждение кишечника. Перенос микробиоты мышам дикого типа через совместное содержание однопометников показывает, что микробиота, связанная с колитом, определяет метаболический профиль крови животных, уровень глицина в мозге и поведенческие особенности в модели Muc2. Фармакологическое подавление рецепторов глицина GlyR и NMDAR у мышшей Muc2 нормализует поведенческий фенотип, подтверждая роль глицина в ЦНС как медиатора оси кишечник-мозг. Используя комбинацию антибиотиков, мы показали вовлеченность бактерий рода *Akkermansia muciniphila*, выявленной метагеномным анализом, во взаимодействие кишечника и мозга. В целом, данное исследование показывает, что глицин и *Akkermansia muciniphila* выступают как позитивные регуляторы функции ЦНС в ходе хронического колита, что может предоставить новые возможности для борьбы с психоэмоциональными осложнениями ВЗК. Лабораторные животные приобретены за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований № АААА-А21-121011990039-2 и № 0533-2019-0003. Метаболомный анализ поддержан грантом РФФИ № 19-015-00169, анализ микробиоты поддержан грантом РНФ № 20-74-10022.

ЭНДОГЕННЫЕ ЛИГАНДЫ ИОНОТРОПНЫХ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ МОДУЛИРУЮТ ЛИМФОЦИТАРНО-ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

У.Ш. Кузмина¹, А.В. Тухвагуллин¹, К.З. Бахтиярова², Ю.В. Вахитова¹

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН; ²Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Уфа

Нарушение лимфоцитарно-эндотелиального взаимодействия – одно из звеньев иммунопатогенеза рассеянного склероза (РС) – аутоиммунного нейродегенеративного заболевания центральной нервной системы. Ранее нами было установлено, что эндогенные лиганды ионотропных рецепторов глутамата (глутамат, глицин, хинолиновая и кинуреновая кислоты) модулируют адгезию иммунных клеток к фибронектину, а также к интактным и ФНО α -стимулированным эндотелиоцитам *in vitro*. В данной работе проведено исследование профиля экспрессии молекул клеточной адгезии, локализованных на эндотелиальных клетках HUVEC (VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, E-селектин) и Т-лимфоцитах (L-селектин, VLA-4 и LFA-1 α), полученных от здоровых и больных ремиттирующим РС, при действии указанных лигандов. Показано, что инкубация клеток с глутаматом (10^{-7} – 10^{-3} М) или глицином (10^{-7} – 10^{-3} М) приводит к повышению поверхностной экспрессии лейкоцитарного интегрина VLA-4 у здоровых и больных РС. Глутамат вызывает изменение представленности молекул адгезии VCAM-1 и E-селектина на поверхности эндотелиоцитов. В присутствии глицина отмечается усиление экспрессии интегрина VCAM-1. Кинуреновая кислота (10^{-7} – 10^{-3} М) негативно влияет на уровень поверхностной экспрессии молекул VLA-4 и VCAM-1. У больных РС, вне зависимости от стадии заболевания, наблюдались закономерности, сходные с таковыми у здоровых доноров. При инкубации с хинолиновой кислотой (10^{-7} – 10^{-3} М) только у больных РС в стадии обострения отмечается увеличение представленности VLA-4 и VCAM-1. Известно, что адгезия лимфоцитов к эндотелиальным клеткам опосредована комплексом молекул, поэтому установленные тенденции и закономерности на фоне действия лигандов рецепторов глутамата могут быть связаны, помимо влияния других молекул адгезии, с изменениями аффинности интегринов и селектинов. Таким образом, нами впервые показано, что лиганды рецепторов глутамата посредством регуляции экспрессии молекул адгезии разнонаправленно влияют на лимфоцитарно-эндотелиального взаимодействия при РС. В совокупности с данными литературы

наши результаты указывают на перспективность использования глутаматных рецепторов в качестве мишени для разработки новых подходов мультитаргетной фармакотерапии РС. Работа выполнена в соответствии с планом госзадания ИБГ УФИЦ РАН № АААА-А21-121011990119-1.

АНАЛИЗ ОТНОСИТЕЛЬНЫХ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ В ТКАНЯХ МОЗГА МЫШЕЙ С МФТП-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛЬЮ РАННЕЙ СИМПТОМНОЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Е.И. Семенова, М.М. Руденок, И.Н. Рыболовлев, А.Х. Алиева, П.А. Сломинский, М.И. Шадрин

Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Болезнь Паркинсона (БП) – широко распространенное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся длительным скрытым периодом развития болезни. Отличительной особенностью БП является потеря дофаминергических нейронов, в следствие которой проявляются классические моторные симптомы БП. Проявление некоторых немоторных симптомов заболевания может быть обусловлено вовлечением в патогенез БП нейронов других систем. В частности, развитие на поздней досимптомной стадии различных нарушений сна позволяет сделать предположение о вовлеченности в патогенез БП гистаминергической системы. К настоящему моменту нет однозначного представления о том, как изменения в функционировании этой системы влияют на развитие БП. В связи с этим остро встает вопрос об изучении изменений экспрессии генов, вовлеченных в работу гистаминергической системы, и генов циркадных ритмов при БП на ранних этапах патогенеза. Нами был проведен анализ изменения относительных уровней мРНК генов *Hrh1*, *Hrh3*, *Hnmt*, *Per1*, *Per2* у мышей с МФТП-индуцированной моделью ранней симптомной стадии БП. Были проанализированы ткани коры, стриатума и черной субстанции. Определение относительных уровней мРНК генов проводилось с использованием обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени с зондами TaqMan по методу $\Delta\Delta C_t$. Для всех исследуемых генов, были выявлены статистически значимые изменения относительных уровней их мРНК в черной субстанции мышей с МФТП-индуцированной ранней симптомной стадией БП. Кроме того, достоверные изменения экспрессии в тканях коры были обнаружены для генов *Hnmt* и *Per2* и в тканях стриатума для гена *Per1*. Наиболее выраженное изменение экспрессии, а именно увеличение в 2,5 раза, наблюдалось для гена циркадных ритмов *Per2* в тканях черной субстанции. Имеются данные, что повышение экспрессии *Per2* может приводить к снижению дофамина в стриатуме. Таким образом, наблюдаемое нами изменение экспрессии *Per2* может оказывать влияние на развитие нейродегенеративных процессов при БП. В целом, полученные нами данные могут указывать на вовлеченность гистаминергической и циркадной систем в патогенез БП на ранней стадии. Работа поддержана грантом РНФ № 20-15-00262.

АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОЛИФЕРАЦИЯ Т-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Е.А. Брюшкова^{1,2,3}, Е.О. Серебровская^{1,2}, Г.В. Шаронов^{1,2,4}, Д.М. Чудаков^{1,2,4,5}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²НИИ трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва; ³МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁴Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород; ⁵Сколковский институт науки и технологий, Москва

В современной парадигме лечения онкологических заболеваний иммунотерапия все чаще рассматривается не только как дополнение к традиционным методам, но и как самостоятельное перспективное направление. Иммунотерапия обычно нацелена на неспецифическую активацию лимфоцитов (препараты на основе цитокинов, интерферонов или ингибиторов контрольных точек иммунного ответа) или на создание опухоль-специфических Т-лимфоцитов с последующим возвращением в организм. Второй подход менее зависим от индивидуальных особенностей канцерогенеза и представляется более универсальными и эффективным, поэтому поиск технологии обогащения мононуклеарной фракции периферической крови (PBMC) пациентов опухоль-специфичными лимфоцитами в системе *in vitro* имеет большое значение для внедрения Т-клеточной иммунотерапии в клиническую практику. В качестве модельного антигена был выбран пул пептидов белка pp65 цитомегаловируса человека PerTivator. PBMC доноров с серологически подтвержденным CMV окрашивали CFSE и культивировали с PerTivator 7 дней, затем проводили цитофлуориметрический анализ популяций CFSEhigh и CFSElow по CD3/CD4/CD8, с последующей сортировкой клеток для анализа Т-клеточных рецепторов. Клонотип, доминирующий в популяции CD8⁺CFSElow, был идентифицирован как CMV-специфичный. Функциональную активность оценивали методом ELISPOT по секреции интерферона- γ . Было показано, что CD8⁺CFSElow клетки секретируют в 5 раз больше INF γ по сравнению с CD8⁺CFSEhigh. Влияние CMV-специфичных регуляторных Т-клеток (Tregs) на пролиферацию CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток оценивали в присутствии IL-21, который частично уменьшает иммуносупрессивную функцию Tregs. Для этого сравнили результаты аналогичных экспериментов с тотальными PBMC и PBMC после деплеции CD25high клеток. В обоих случаях сочетание PerTivator с IL-21 оказалось более эффективным, чем использование только PerTivator, причем вклад IL-21 в пролиферацию Т-клеток достоверно превышал вклад деплеции по CD25⁺, что дает возможность пропускать этот шаг при работе с малыми образцами. Опробованная нами методика позволяет проводить обогащение Т-лимфоцитами с целевой специфичностью. Работа поддержана Грантом Минобрнауки РФ на проведение крупных научных проектов № 075-15-2020-807 консорциумом исполнителей по теме: «Фундаментальные основы современной иммунотерапии».

ДИНАМИКА Т-КЛЕТОЧНОГО РЕПЕРТУАРА ПРИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПРОТИВОВИРУСНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

М.В. Погорелый, А.А. Минервина, М.А. Сальникова, А.Л. Сычева, Ю.Б. Лебедев

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

Т-клетки играют ключевую роль в адаптивном противовирусном иммунном ответе, убивая инфицированные клетки и способствуя формированию в организме мощного пула вирус-специфических антител. Однако ни динамика, ни возможная кроссреактивность Т-клеточного ответа, ни разнообразие иммунной памяти до конца не изучены. Исследование таких свойств Т-клеточного иммунного ответа стало возможным благодаря развитию технологий реконструкции полноразмерных репертуаров Т- и В-клеток на основе результатов массированного иммуносеквенирования. В нашей работе мы используем высокопроизводительное секвенирование Т-клеточных рецепторов (TCR) для долговременного наблюдения изменений индивидуальных репертуаров периферических Т-лимфоцитов у доноров, вакцинируемых против вирусов желтой лихорадки или клещевого энцефалита, у пациентов, перенесших COVID-19, и у лабораторных животных при экспериментальном заражении вирусом клещевого энцефалита. Используя секвенирование α TCR для субпопуляций Т-клеток и применяя методы RNAseq и TCRseq для единичных Т-клеток, мы отслеживаем концентрацию и фенотипы отдельных клонов Т-клеток, отвечающих (ре)вакцинацию от желтой лихорадки (YF). Мы выявили большое клональное разнообразие YF-реактивных Т-лимфоцитов. Т-клеточный ответ на ревакцинацию на порядок слабее, хотя развивается быстрее. Мы определили структурные особенности и 2 основных мотива TCR Т-клонов, специфичных к иммунодоминантному эпитопу. Мы также демонстрируем согласованность динамики клональной экспансии между альфа- и бета-репертуарами, используя новую методологию анализа клональных траекторий. При исследовании динамики Т-клеточных репертуаров после двух легких случаев COVID-19 мы идентифицировали у обоих доноров олигоклональную экспансию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Антигенная специфичность CD8⁺ TCR к эпитопам SARS-CoV-2 была подтверждена как связыванием тетрамера HLA-A*02:01-YLQPRTFLL, так и наличием сходных TCR структур в публичной базе данных эпитоп-специфичных TCR SARS-CoV-2. Мы описываем характерные мотивы TCR COVID-специфичных клонов. У обоих доноров большинство инфекционно-реактивных клонов приобретают фенотипы памяти. Определенные Т- клоны памяти обнаружены до заражения, демонстрируя кроссреактивность Т-клеток в ответе на SARS-CoV-2. *Исследование поддержано грантом РНФ № 20-15-00351.*

БЕЛКИ КРОВИ С ВЫРАЖЕННОЙ ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ФУНКЦИЕЙ

Д.М. Никулина

Астраханский государственный медицинский университет МЗ РФ, Астрахань

Ослабление или полное угнетение реакций иммунной системы в организме представлено двумя видами иммуносупрессии: физиологической и патологической. Кроме того, иммуносупрессивное состояние может быть вызвано искусственно как часть комплексного лечения, например, при трансплантации органов или тканей. Наиболее подробно изучены факторы и механизм развития патологической иммуносупрессии конкретных заболеваний. Формирование физиологической иммуносупрессии при беременности объясняют многочисленными факторами, включая в этот список гормоны, интерлейкины и белки с иммуномодулирующей функцией. Среди них эмбриональные и ассоциированные с беременностью белки, у которых иммуносупрессивная активность является основной или второстепенной. Наиболее часто упоминаются трофобластический или трофобластспецифический бета-1-гликопротеин (ТБГ/TSBG), альфа-фетопротеин (АФП/AFP), реже связанный с беременностью альфа2-гликопротеин (СБАГ/ α 2-PAG).

Проведенные исследования показали особенности и различия в их функционирования при развитии беременности.

Все три белка секретируются в кровь матери из мест синтеза. АФП и ТБГ связаны с развитием фетоплацентарного комплекса: тканями плода и плаценты. СБАГ имеет материнское происхождения. Иммунгистохимическое изучение показало интенсивное свечение СБАГ и ТБГ в клетках крови матери. В экспериментальном иммунологическом исследовании было установлено, что оба белка проявляют выраженный иммуносупрессивный эффект в отличие от АФП. Мониторинговое определение уровня всех трех белков показало небольшое превышение уровня АФП только до 5 недель с невысоким уровнем в последующий период, но пропорциональное сроку беременности значительное увеличение концентрации СБАГ и ТБГ вплоть до 38 недели с достоверным снижением перед родами. Во второй половине беременности уровень ТБГ превышает СБАГ, что связано с ростом объема плаценты при увеличении гестационного срока и ее ролью в защите плода от иммунологической агрессии организма матери. Показано достоверное изменение соотношения уровня обоих белков при поздних гестозах, плацентарной недостаточности и пролонгированной беременности.

Мы полагаем, что иммуносупрессивная активность плацентарного и материнского белков в норме сбалансирована и имеет важное значение для благоприятного течения беременности и исхода родов.

УЧЕТ ПОВЕДЕНИЯ В КЛЕТОК И СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ОШИБОК ОТБОРА ОПУХОЛЕВЫХ ОБРАЗЦОВ ПОЗВОЛЯЕТ ПРЕДСКАЗЫВАТЬ ОТВЕТ НА АНТИ-PD-L1 ТЕРАПИЮ ДЛЯ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ.

И.А. Дюгай^{1,2}, Д.М. Чудаков^{1,2,3}

¹Центр наук о жизни, Сколковский институт наук и технологий; ²Отдел геномики адаптивного иммунитета, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Опухоль-инфильтрирующие В клетки и внутриопухолевые антитела являются важными компонентами опухолевого микроокружения. Антитела IgG, произведенные опухоль-инфильтрирующими В клетками могут способствовать клеточному цитотоксическому эффекту, усилению презентации антигенов дендритными клетками, а также самостоятельно способны презентировать антигены, регулируя Т клеточный ответ [1]. В данной работе была изучена роль композиции изотипов внут-

риопухолевых антител и клональности опухоль-инфильтрирующих В клеток в раке мочевого пузыря. В результате проведенного исследования было показано, что пропорция изотипов антител IgG1/IgA является сильным прогностическим фактором для молекулярного подтипа рака мочевого пузыря Basal squamous а также для пациентов, получивших анти-PD-L1 иммунотерапию в клиническом испытании ImVigor210. Также было показано, что в противоопухолевый иммунный ответ вовлечены эффекторные В клетки, а не клональные продуцирующие антитела фракции В клеток. Помимо этого, высокая пропорция изотипов IgG1/IgA ассоциирована с относительным повышением экспрессии цитотоксических генов, а также экспрессией IL21, что может свидетельствовать о важности взаимодействия В и Т клеточного иммунного ответа. Также было изучено влияние нормировки, учитывающей стохастическую природу опухолевых образцов[2] на поведение В-, Т- и НК-клеток в опухолевом микроокружении и используя полученные сигнатуры на основе модели случайного леса и данных РНК-секвенирования получили предиктор ответа на анти-PD-L1 терапию для инвазивного рака мочевого пузыря, обладающий более высокой чувствительностью по сравнению с измерением уровня PD-L1 экспрессирующих клеток, что позволяет с большей надежностью определять группу пациентов, получающих пользу от иммунотерапии. *Исследование проведено при поддержке гранта Минобрнауки РФ на проведение крупных научных проектов № 075-15-2020-807 консорциумом исполнителей по теме: «Фундаментальные основы современной иммунотерапии».*

1. Sharonov et al. В cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 294–307 (2020).
2. Teltsh et al. Extracting tumor tissue immune status from expression profiles: correlating renal cancer prognosis with tumor-associated immunome. *Oncotarget* 6, 33191–33205 (2015).

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ТПДС ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В НОРМЕ И ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ

К.А. Ефетов

Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь

Как было показано ранее, устойчивость конформации иммуноглобулинов G человека (IgG) к воздействию низких концентраций мочевины увеличивается при злокачественных новообразованиях. Для обнаружения этих изменений мы используем высокочувствительный метод – ультрафиолетовую температурно-пертурбационную дифференциальную спектрофотометрию (ТПДС), причём в качестве критерия устойчивости предложен показатель *Ef*. Суть метода заключается в регистрации дифференциальных спектров двух одинаковых образцов IgG, инкубируемых при разных температурах. Измерения проводили с помощью двулучевого спектрофотометра Lambda 365 (PerkinElmer, США). Если кюветы с IgG находятся на пути обоих лучей спектрофотометра, возникает необходимость дополнительного уравнивания кювет и растворов. Для исключения этой процедуры мы предлагаем модификацию метода ТПДС, заключающуюся в регистрации интегральных спектров одного и того же образца IgG при разных температурах с последующим вычитанием полученных спектров. Для количественной оценки результатов нами разработана компьютерная программа, позволяющая учесть взаимный вклад спектров остатков тирозинов и триптофанов в величину максимумов при длинах волн 288 нм и 295 нм. Полученные данные показали лучшую воспроизводимость результатов при новой модификации ТПДС. Разработанный метод эффективно используется для определения устойчивости конформации IgG в норме и при онкологической патологии.

ПЕПТИДНЫЙ ИНГИБИТОР КАТЕПСИНА S КАК ПРОТОТИП НОВОГО ПРОТИВОРАКОВОГО СРЕДСТВА

А.А. Замятнин (мл.)^{1,2,3}

¹Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Направление Биотехнология, НТУ «Сириус», Сочи

Цистеиновые катепсины обычно относят исключительно к лизосомальным ферментам, обеспечивающим лизосомальный путь деградации белков и пептидов. Однако к настоящему времени накопился достаточно большой объем информации о локализации цистеиновых катепсинов в самых разнообразных внутриклеточных компартментах и, более того, данных о том, что цистеиновые катепсины могут проявлять активности пептидаз вне лизосом. Имеется также ряд данных о том, что протеиназные активности некоторых катепсинов могут быть вовлечены в регуляцию процессов апоптоза, в том числе, в раковых клетках. В настоящей работе мы показали, что в раковых клетках при воздействии Паклитаксела увеличивается экспрессия катепсина S, который, в свою очередь, расщепляет проапоптотический p21 BAX и, тем самым, способствует выживанию раковых клеток. Разработанный нами специфичный пептидный ингибитор катепсина S CS-PEP1 предотвращал расщепление p21 BAX и снижал выживаемость раковых клеток. Таким образом, можно заключить, что CS-PEP1, обладая новым уникальным механизмом действия, является перспективным прототипом первого в классе противоракового средства для комбинированной терапии. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-30020).*

СОЗДАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ СПЕЦИФИЧНЫХ К ОТДЕЛЬНЫМ АНТИГЕНАМ МЫШИНОЙ МЕЛАНОМЫ В16F0 ДЛЯ АНАЛИЗА ИММУННЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРИ ИММУНОТЕРАПИИ

А.В. Изосимова^{1,2}, Д.В. Южакова¹, Е.В. Загайнова^{2,1}, Г.В. Шаронов^{1,3,4}, Д.М. Чудаков^{1,3,4}

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород; ²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ⁴НИИ трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Большинство иммунотерапевтических подходов основано на стимуляции или создании опухоль-специфичных Т-лимфоцитов. Активацию и механизм противоопухолевого иммунитета можно оценить по обогащению и инфильтрации опухоли такими лимфоцитами, однако, специфичные маркеры для их идентификации отсутствуют. При анти-CTLA4 терапии мышинной меланомы В16F0 нами было обнаружена активация и клональные экспансии лимфоцитов с похожими Т-клеточными рецепторами (ТКР), но антигены для этих рецепторов не ясны. Создание базы данных специфичности ТКР к отдельным антигенам опухоли В16F0. Эксперименты проводились на мышях линии C57BL/6FoxP3-EGFP. Мышей иммунизировали пулом пептидных неоантигенов меланомы [Kreiter S. et al., Nature, 2015] (по 40 мкг каждого). Т-лимфоциты выделяли из паховых и/или подколленных лимфоузлов с помощью ферментативной дезагрегации. Специфичность Т-лимфоцитов оценивали по их реактивации *in vitro* в присутствии дендритных клеток, нагруженных отдельными антигенами. В качестве маркеров реактивации анализировали продукцию IFN γ либо поверхностные маркеры CD25 и CD69 с помощью клеточного сортера FACSAria III. Реактивированные клетки сортировали и анализировали в них обогащение определёнными ТКР. Мы зарегистрировали до 40% активированных IFN γ ⁺ Т-лимфоцитов и до 75% активированных живых CD25⁺CD69⁺ Т-клеток в ответ на отдельные пептидные неоантигены меланомы. Мы предполагаем, что фракция активированных клеток обогащена Т-клетками, специфичными к конкретному пептиду меланомы. С помощью биоинформатического анализа были найдены клоны ТКР, которые встречались с высокой частотой в реактивированных на конкретные пептиды клетках и не встречались в контроле. Была отработана методика, которая позволяет выявлять специфичности лимфоцитов к отдельным антигенам В16. Выявленные ТКР занесены в базу данных антиген-специфичных ТКР (vdjdb.cdr3.net). С помощью отработанной методики ведется набор данных и пополнение базы данных В16-специфичных ТКР, что позволит анализировать противоопухолевый иммунный ответ на новом уровне детализации. Работа поддержана Грантом Правительства РФ № 14.W03.31.0005.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ НЕКОДИРУЮЩИХ ТРАНСКРИПТОВ ПСЕВДОГЕНА PTENP1 В ПРОГРЕССИИ ГЛИБЛАСТОМЫ И КАРЦИНОМЫ ЭНДОМЕТРИЯ

Т.Ф. Коваленко¹, Л.И. Патрушев¹, К.С. Ануфриева², М.И. Шахпаронов¹, М.С. Павлюков¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

PTENP1, псевдоген гена PTEN, транскрибируется с образованием двух длинных некодирующих РНК – lncPTENP1 и lncPTENP1-AS. lncPTENP1 и lncPTENP1-AS могут выполнять как онкогенные, так и онкосупрессорные функции при различных видах рака. Однако роль этих транскриптов при глиобластомах (GBM) не изучена. Ранее нами было показано дифференциальное метилирование CpG островка PTENP1 в тканях эндометрия. Целью данной работы явилось изучение роли транскриптов псевдогена PTENP1 в патогенезе GBM, а также исследование участия метилирования псевдогена в развитии карциномы и предраковых заболеваний (гиперплазии и полипов) эндометрия. Используя первичные культуры нейрофер GBM, мы показали, что сверхэкспрессия как lncPTENP1, так и lncPTENP1-AS усиливает пролиферацию клеток GBM и увеличивает уровень маркеров стволовых клеток. В то же время транскрипты псевдогена замедляли рост клеток менее злокачественных глиом низкой стадии. Важно отметить, что в обоих случаях сверхэкспрессия lncPTENP1 и lncPTENP1-AS не влияла на уровень транскрипции гена PTEN. Исследование общей выживаемости пациентов с помощью базы данных TCGA показало, что повышенный уровень lncPTENP1 коррелировал с более благоприятным прогнозом для больных с глиомами стадий II-III. Однако для пациентов с GBM такой зависимости обнаружено не было. Можно предположить, что транскрипты PTENP1 играют онкогенную роль при GBM и служат онкосупрессорами при менее злокачественных формах глиом. Исследование метилирования CpG-островка в клеточных культурах показало, что данная модификация приводит к снижению уровня lncPTENP1-AS и повышению уровня lncPTENP1. Биоинформатический анализ выявил корреляцию высокого уровня lncPTENP1 с благоприятным прогнозом для больных раком эндометрия. Также с более длительной выживаемостью пациентов коррелирует и повышенное метилирование PTENP1. Проанализировав 167 образцов от больных с карциномой, гиперплазией, полипами эндометрия и 69 образцов нормального эндометрия, мы показали статистически достоверную зависимость частоты метилирования PTENP1 от возраста пациенток. Мы полагаем, что метилирование PTENP1 отражает возрастные изменения, происходящие в эндометрии, и может служить защитным механизмом, направленным на предотвращение злокачественной трансформации данной ткани при старении организма.

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Е.В. Кулигина^{1,2}, О.А. Коваль^{1,2}, Г.В. Кочнева^{2,3}, А.А. Немудрая¹, А.А. Нуштаева¹, О.С. Троицкая¹, А.А. Войтова¹, В.А. Рихтер^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Общество с ограниченной ответственностью «Онкостар», Новосибирск; ³ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово

Разработан новый противоопухолевый препарат на основе рекомбинантного штамма вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact. VV-GMCSF-Lact сконструирован на основе штамма Л-ИВП вируса осповакцины, хорошо известного в России. Делеции фрагментов генов тимидинкиназы (tk) и вирусного ростового фактора (vgf) обеспечивают повышенную онкоселектив-

ность вируса, индекс онкоселективности в паре культур клеток эпителия молочной железы нормальная MCF 10A /раковая MCF7 составляет более 200, а уровень аттенуации превышает уровень аттенуации родительского штамма Л-ИВП более чем в 100 раз. Продукты экспрессии трансгенов – ГМ-КСФ человека и цитотоксический пептид лактаптин, стимулируют миграцию эффекторных клеток иммунной системы в разрушенную вирусом опухоль и индуцируют апоптоз опухолевых клеток, соответственно. В доклинических исследованиях VV-GMCSF-Lact показал высокую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток человека различного гистогенеза и противоопухолевую эффективность в отношении опухолей молочной железы человека, в том числе трижды негативных, и лекарственно устойчивых опухолей мыши. Индекс ингибирования роста опухоли для всех использованных моделей превысил 80%. VV-GMCSF-Lact обладает значительным антиметастатическим действием, при внутриопухолевом введении способен «находить» метастазы и ингибировать их рост. В течение 12 дней после внутриопухолевого введения VV-GMCSF-Lact полностью выводится из здоровых органов и тканей, оставаясь только в опухоли. Исследования общей и специфической токсичности VV-GMCSF-Lact в экспериментах на животных подтвердили безопасность и хорошую переносимость препарата. Таким образом, VV-GMCSF-Lact является самореплицирующимся лекарством, эффективно подавляющим рост солидных опухолей и метастазов. Препарат рекомендован для клинических испытаний. Документы для получения разрешения на проведение первой фазы клинических исследований поданы в Минздрав РФ.

РОЛЬ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА ПРЕ-мРНК РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ В ВОЗНИКНОВЕНИИ ВНУТРИОПУХОЛЕВОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ГЛИОБЛАСТОМЫ

**Т.Д. Ларионова¹, В.О. Шендер^{1,2}, К.С. Ануфриева², Т.Е. Аксина¹, Я.А. Латышев³, М.И. Шахпаронов¹,
М.С. Павлюков¹**

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко МЗ РФ, Москва

Глиобластома (GBM) – одна из наиболее частых и агрессивных первичных опухолей головного мозга человека. В различных областях GBM присутствуют раковые клетки с разными фенотипическими свойствами, однако механизмы возникновения данных популяций клеток GBM до сих пор не ясны. Ключевым фактором, определяющим фенотип клеток, является их протеом. Один из механизмов его регуляции заключается в изменении селективности рибосом к транслируемым ими молекулам мРНК. Однако, о роли данного процесса в GBM ничего не известно. В данной работе мы исследовали, как белковый состав рибосомы влияет на фенотип клеток GBM. Из опухоли пациентов были выделены клетки, располагающиеся в центре и на периферии GBM. Исследуя рибосомы этих клеток, мы обнаружили значительные отличия в их белковом составе, причем эти различия были вызваны не уровнем экспрессии рибосомных генов, а альтернативным сплайсингом соответствующих пре-мРНК. Наиболее сильные отличия наблюдались для белка RPL22L1. Мы установили, что белок RPL22L1 имеет две изоформы: RPL22L1a (основная) и RPL22L1b (впервые описанная нами). Изоформа RPL22L1a локализуется в цитоплазме, входит в состав рибосомы и участвует в регуляции элонгации пептидной цепи, в то время как RPL22L1b располагается в ядерных спеклах и регулирует стабильность молекул РНК. Исследование функций изоформ RPL22L1 показало, что RPL22L1a снижает трансляцию белков, важных для поддержания стволовости клеток GBM, а RPL22L1b, ускоряет деградацию онкосупрессорной длинной некодирующей РНК MALAT1. Таким образом, изоформы RPL22L1 оказывают противоположное влияние на фенотип клеток GBM. В заключении мы показали, что сплайсинг пре-мРНК RPL22L1 регулируется белком SRSF4, и обнаружили новый низкомолекулярный ингибитор этого процесса. Обработка клеток данным соединением вызывала дефосфорилирование SRSF4, что снижало его активность и приводило к образованию не функциональной изоформы RPL22L1, вызывая гибель опухолевых клеток. Таким образом, в нашей работе впервые установлено, что фенотип клеток глиобластомы может регулироваться за счет альтернативного сплайсинга пре-мРНК рибосомных белков, а обнаруженный нами низкомолекулярный ингибитор может быть использован в дальнейшем как основа для разработки новых противоопухолевых препаратов.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ И РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ КИНАЗЫ ГЛИКОГЕНСИНТАЗЫ 3β ПРИ ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Л.М. Обухова, О.Н. Никифорова, Т.В. Копытова, Н.Ю. Орлинская, И.А. Медяник, М.В. Остапук

Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород

Цель работы – анализ взаимосвязи активности ферментов углеводного обмена с молекулярно-генетическими маркерами глиом. Объект исследования – послеоперационный материал пациентов с глиомами (n=28). Контроль- ткани мозга человека, взятые посмертно (n=6). Иммуногистохимическое исследование проводили с антителами к IDH Anti-IDH1 R132H (Dianova International, Испания); к MGMT (клон EP337) (Epitomics, США), к Ki67 (клон SP6) (Thermo Scientific, США). Определяли концентрацию глюкозы (НПЦ Эко-Сервис, Россия), лактата (ООО Ольвекс диагностика, Россия), активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Sentinel, Италия), гексокиназы (Sigma-Aldrich, США), транскетолазы (Human SimpleStep ELISA® Kit, Abcam, Великобритания) и киназы гликогенсинтазы 3β (Cusabio, Китай). Активность гексокиназы в клетках глиом имела тенденцию к повышению при Grade I, статистически значимый рост при Grade II, III и отсутствие отличий с контролем при Grade IV. Активность ферментов пентозофосфатного пути: глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы и транскетолазы повышалась по мере степени злокачественности опухоли. Активность киназы гликогенсинтазы 3β (GSK-3β) была статистически значимо выше при всех Grade. Мутации генов IDH1 они были обнаружены в 40% случаев исследованных глиом. Метилирование гена-супрессора MGMT выявлено в 50% и более случаев. Уровень Ki-67 (маркёра пролиферации клеток) повышался при росте уровня анаплазии. Киназа гликогенсинтазы 3β демонстрировала наибольшее число значимых взаимосвязей как с онкомаркерами: IDH1 (r=-0,309), Ki-67 (r=0,526), так и с уровнем глюкозы и лактата. GSK-3β ингибирует гликогенсинтазу, угнетая синтез гликогена и увеличивая уровень глюкозы, регулирует транскрипционные факторы NFκB, AP1, семейство Smad и обеспе-

чивает передачу сигналов FGF, Notch, путей Wnt, PI3K/Akt и Hedgehog (Zhao P., Li Q., Shi Z., 2015). Антипролиферативная и проапоптотическая роль киназы гликогенсинтазы-3 β обусловлена ее подавлением связывания транскрипционных факторов c-Myc и c-Jun с ДНК (Taira N., Mimoto R., 2012).

Наиболее значимый рост по мере увеличения степени анаплазии глиом показан для киназы гликогенсинтазы 3 β , которая не только участвует в метаболизме глюкозы и гликогена, но и вовлечена в регуляцию процессов пролиферации клеток.

РОЛЬ НАЦЕЛИВАЮЩИХ ПЕПТИДОВ В ПРОНИКНОВЕНИИ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ МАГНИТНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ В ОПУХОЛИ

А.Г. Першина^{1,2}, О.Я. Брикунова¹, Л.В. Ефимова¹, А.М. Демин³, В.А. Науменко⁴, Е.С. Хмелевская¹, В.П. Краснов³, Л.М. Огородова¹

¹Сибирский государственный медицинский университет, Томск; ²Томский политехнический университет, Томск;

³Институт органической химии им И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург; ⁴НМИЦ психиатрии, Москва

Наночастицы, за счет наличия у них уникальных физико-химических свойств, способны отвечать на внешние стимулы (свет, магнитное поле, ультразвук и др.) и могут быть выявлены *in vivo* (МРТ, оптическая томография и др.). Эти свойства позволяют контролировать накопление систем на основе наночастиц в опухоли, оценивая применимость к терапии конкретной опухоли, а также осуществлять управление (например, высвобождение лекарства), тем самым минимизируя негативные эффекты лекарства на здоровые ткани и органы. Однако эффективная адресная доставка наносистем в патологический очаг остается нерешенной задачей. Целью данной работы было исследовать поведение систем адресной доставки на основе магнитных наночастиц *in vivo*. Флуоресцентно-меченные наночастицы оксида железа были получены методом со-осаждения, модифицированы силкоксановой оболочкой и полиэтиленгликолем, далее конъюгированы с нацеливающими пептидами. Исследование было выполнено на двух моделях рака молочной железы мыши (4T1) и человека (ксенографт MDA-MB231). Образцы крови, органов, опухоли были собраны через определенные интервалы после внутривенного введения наночастиц, гомогенизированы, окрашены с использованием специфических антител и проанализированы методом проточной цитометрии. Анализ распределения наночастиц в опухоли был выполнен методом иммунофлуоресцентного анализа криосекций опухоли. Исследование проникновения наночастиц в опухоль было проведено методом интравитальной микроскопии. Результаты исследования показали, что лейкоциты крови играют большую роль в проникновении наносистем в опухоль. Полученные данные о поведении наносистем на основе магнитных наночастиц *in vivo* могут быть использованы для разработки подходов к улучшению фармакокинетики и повышению эффективности доставки наночастиц в опухоль.

СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ СРАВНЕНИЕ РЕПЕРТУАРОВ В-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В КРОВИ, ОПУХОЛИ, ДРЕНИРУЮЩЕМ ЛИМФОУЗЛЕ И НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО, МЕЛАНОМЕ И РАКЕ КИШЕЧНИКА

Е.О. Серебровская^{1,2,3}, Е.А. Брюшкова^{1,2,8}, Г.В. Шаронов^{1,2,3}, С.В. Красик^{1,7}, П.С. Шпудейко¹, И.В. Самойленко⁴, Д.Т. Маринин⁴, В.Е. Загайнов^{3,5}, Д.М. Чудаков^{1,2,3,6,7}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва;

³Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород; ⁴НМИЦ онкологии

им. Н.Н. Блохина, Москва; ⁵Приволжский окружной медицинский центр ФМБА России, Нижний Новгород; ⁶Группа адаптивного иммунитета, Центральное-европейский институт технологий, Брно, Чехия; ⁷Сколковский институт науки и технологий, Москва; ⁸Кафедра молекулярной биологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Характеристики опухоль-инфильтрирующих В-клеток и их роль в патогенезе различных опухолей остаются малоизученными. Однако были недавно обнаружены некоторые ассоциации между общей выживаемостью и клональностью репертуаров В-клеточных рецепторов, а также пропорцией изотипов иммуноглобулинов в опухоли. Так, клональность репертуаров В-клеточных рецепторов опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов ассоциирована с улучшенным прогнозом при меланоме. Также, с улучшенным прогнозом ассоциирована более высокая пропорция IgG1 среди всех иммуноглобулинов, при меланоме и при KRAS-мутированном раке легкого. Эти характеристики могли бы стать удобными дополнительными прогностическими маркерами с хорошим потенциалом клинического применения. В данной работе мы исследуем связь между репертуарами В-клеточных рецепторов в опухоли и крови, а также в прилегающей нормальной ткани. При сравнении VCR-репертуаров из опухоли и крови было обнаружено, что в топ 20 клонотипов, обнаруживаемых в крови, не обнаруживаются клонотипы из опухоли. Таким образом, на основании одной лишь частоты встречаемости не удастся идентифицировать в репертуарах из периферической крови клонотипы, идентичные клонотипам из опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Мы проанализировали метрики пересечения репертуаров в парах опухоль/лимфоузел, опухоль/кровь и крови/лимфоузел для всех пациентов. Пересечение репертуаров опухоли и лимфоузла было достоверно выше пересечения репертуаров лимфоузла и крови ($p \leq 0.01$). При анализе данных из рака кишечника были обнаружены более высокие значения метрик пересечения с опухольными образцами одного из лимфоузлов для каждого пациента. Предположительно это говорит о большей вовлеченности одного из лимфоузлов в развитие гуморального противоопухолевого иммунного ответа. Также был проведен анализ соматической гипермутации иммуноглобулинов во всех вышеперечисленных образцах. Были обнаружены деревья гипермутаций, все клонотипы в которых относились только к опухолевой ткани. Таким образом, анализ VCR-репертуаров указывает на возможность независимого от лимфоузлов созревания аффинности антител непосредственно внутри опухоли. Работа поддержана грантом РФФ № 19-14-00317, Происхождение и пластичность функциональных популяций В лимфоцитов и плазматических клеток, 2019-2021.

ДИАГНОСТИКА РАКА ЯИЧНИКА НА РАННЕЙ СТАДИИ ПО МОЛЕКУЛЯРНОМУ ПРОФИЛЮ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

В.В. Чаговец¹, М.В. Юрова^{1,2}, Н.Л. Стародубцева¹, Г.Н. Хабас¹, С.В. Павлович¹, В.Е. Франкевич¹

¹НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва

Рак яичников занимает первое место по числу смертей среди новообразований женских репродуктивных органов. Современные методы анализа, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС), позволяют получать детальную информацию о молекулярном составе биологических образцов, что может быть использовано для диагностики опухоли и для оценки степени ее злокачественности уже в предоперационном периоде. Целью данного исследования было провести сравнительный анализ сыворотки крови пациенток с различными стадиями РЯ и контрольной группы и на основании выявленных отличий разработать математические модели, позволяющие определять пациенток с раком яичников ранней стадии. В исследование включены 28 пациенток с серозным раком яичников и 13 наблюдаемых группы контроля. С помощью модифицированного метода Фолча из сыворотки экстрагировали липиды, которые затем анализировали с помощью ВЭЖХ-МС. Обработку многомерных масс-спектрометрических данных выполняли с помощью многофакторного анализа OPLS. OPLS модель, построенная по результатам анализа ВЭЖХ-МС данных, полученных в режиме положительных ионов для образцов из контрольной группы и образцов от пациенток с РЯ Ia-IVa стадии, объясняет существенную часть данных, R2 составлял 0,87, а Q2, который характеризует часть данных, предсказанных моделью в соответствии с перекрестной проверкой, составлял 0,77. Чувствительность и специфичность этой OPLS модели достигла 100%. Из 345 идентифицированных липидов 109 имели VIP>1 и внесли значительный вклад в построенную модель. OPLS модель для образцов из контрольной группы и образцов от пациенток с РЯ Ia-Ic стадии позволяет сформировать два отдельных кластера вдоль первой главной компоненты. Эта модель также характеризуется высокими параметрами, R2=0,96 и Q2=0,86. Чувствительность и специфичность модели также достигли 100%. Было выявлено 107 липидов с VIP>1. OPLS модель для образцов групп РЯ Ia-Ic и IIa-IVa оказалась несостоятельной, поэтому были разработаны модели логистической регрессии на основе 21 липида с p-value<0,05. В результате исследования была показана возможность создания математических моделей для выявления образцов сыворотки крови от пациенток с различными стадиями РЯ по липидному профилю. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-65-46014.*

ПРОТЕОМ ЭКЗОСОМ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ ГЛИОБЛАСТОМЫ, КАК ИСТОЧНИК БИОМАРКЕРОВ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Т. Штам^{1,3}, А. Волницкий^{1,3}, А. Копылов², Е. Зорина², Р. Камышинский³, В. Байрамуков¹, Л. Гараева^{1,3}, А. Шлихт⁴, С. Нарыжный^{1,2}

¹НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина; ²НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва;

³НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ⁴Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

Экзосомы участвуют в основных процессах развития злокачественных глиом, включая злокачественную трансформацию, манипуляцию иммунным ответом, ангиогенез и инвазию. Секретированные глиомами экзосомы могут пересекать гематоэнцефалический барьер и попадать в периферический кровоток. Таким образом, определение молекулярного состава опухолевых экзосом может привести к разработке новых, неинвазивных способов диагностики злокачественных глиом, основанных на выявлении специфических онкомаркеров в периферической крови. С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения мы провели протеомный анализ внеклеточных везикул, выделенных из кондиционированной среды 5-ти линий глиобластом. Везикулы были выделены методом ультрацентрифугирования и охарактеризованы по размеру, количеству и морфологии с помощью динамического светорассеяния, анализа траектории наночастиц, атомно-силовой и криоэлектронной микроскопии. Соответствие выявленных параметров критериям ISEV и наличие специфических поверхностных маркеров CD9 и CD81 позволило идентифицировать эти везикулы, как экзосомы. Анализ данных масс-спектрометрии выявил 133 белка, содержащихся в экзосомах всех 5 линий глиом. Соотнося каждый белок с его основной функцией, были выявлены целые группы белков, которые связаны как с процессами, происходящими в опухолевых клетках, так и с возможными функциями секретлируемых ими экзосом. Так, особое место занимает группа белков, регулирующих межклеточные контакты (адгезию). Эти белки могут влиять на микроокружение опухолевых клеток, способствуя таким паталогическим процессам как инвазия, ангиогенез и манипулирование иммунным ответом. Некоторые из них, например, Annexin A2 (ANXA2), CD44 и Tenascin-C (TNC), могут рассматриваться, как перспективные онкомаркеры, так как наличие их в крови коррелирует со степенью злокачественности опухоли. В данной работе исследуя белковый состав (протеом) экзосом, секретлируемых клетками глиом в модельной системе клеточной культуры были выявлены несколько белков, экспрессирующихся в повышенных количествах в глиомных клетках – продуцентах экзосом. Таким образом, предложена панель из 11 белков (KPYM, ANXA1, TPIS, VIME, ANXA2, TERA, ENOA, PRDX1, G3P, HS90B, 1433E), потенциально являющихся маркерами глиобластомы. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 19-74-20146).*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АНТИ-СТЛА-4 ИММУНОТЕРАПИИ НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ, АКТИВАЦИОННЫЙ И КЛОНАЛЬНЫЙ ПРОФИЛИ ИММУННЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ МЫШИНОЙ МЕЛАНОМЫ B16F0

Д.В. Южакова¹, А.В. Изосимова^{1,2}, Г.В. Шаронов^{1,3,4}, Д.М. Чудаков^{1,3,4}

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород; ²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ⁴НИИ трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Среди иммунотерапевтических подходов наибольшее развитие в клинической практике получила иммунотерапия чекпойнт ингибиторами. Несмотря на достигнутые успехи эффективность чекпойнт терапии остается весьма низкой, что связано с индивидуальными особенностями иммунитета пациентов. Иммуные механизмы чекпойнт иммунотерапии по-прежнему недостаточно изучены. В связи с этим, целью настоящей работы является исследование влияния анти-СТЛА-4 иммунотерапии на субпопуляционный, активационный и клональный профили иммунных клеток на модели мышинной меланомы B16F0, подковожно привитой мышам линии C57BL/6FoxP3-EGFP. Иммунотерапию блокирующими анти-СТЛА-4 антителами (250 мкг на мышь) проводили на 12, 13, 16 и 17-й дни роста опухоли. Исследовали краткосрочные эффекты терапии на субпопуляции CD4, CD8 и Treg T-клеток и CD19 B-клеток. Для этого выделяли лимфоциты из опухолей (TILs, Tumor-infiltrating lymphocytes) и дренирующих лимфоузлов (ДЛУ), анализировали методом проточной цитометрии с помощью клеточного сортера FACSAria III, сортировали и оценивали методами секвенирования RNA и TCR (T cell receptor). Мы продемонстрировали, что выбранный терапевтический режим замедлил рост опухолей и увеличил медиану выживаемости мышей по сравнению с контролем без лечения. По данным секвенирования субпопуляции Th CD4 клеток оказалась основной мишенью анти-СТЛА-4 терапии, для которой наблюдалось существенное изменение экспрессионного профиля и кластерности TCR как в опухоли, так и в ДЛУ. Анализ TILs с помощью проточной цитометрии показал рост соотношения Th/CD8 клеток и сдвиг в субпопуляции Th от IFN γ -секретирующих в сторону пролиферирующих в опухоли. Отсутствие выраженной активации TILs под влиянием терапии предположительно связано с миграцией активированных клеток из опухоли в дренирующие лимфоузлы. В подтверждение этого мы выявили повышенный процент активированных CD69⁺/CD25⁺ клеток среди Th и CD8 клеток, а также B-клеток, и секрецию IFN γ Th клетками в ДЛУ. Таким образом, при анти-СТЛА4 терапии мышинной меланомы B16F0 нами была обнаружена активация и клональные экспансии лимфоцитов с похожими TCR, однако их специфичность пока не известна. Для детального анализа ведется работа по созданию базы данных B16F0-специфичных TCR. Работа поддержана Грантом Правительства РФ № 14.W03.31.0005.

НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ДОСТАВКИ МИРНК В ГЕПАТОЦИТЫ МЫШИ Т.О. Абакумова¹, П.И. Ветошева¹, М.А. Комкова², К.Р. Ветошев², А.А. Карякин², Т.С. Зацепин^{1,2}

¹Сколковский институт науки и технологий; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва

Повышенный уровень активных форм кислорода (АФК) ассоциирован с развитием различных заболеваний печени, сопровождающихся хроническим воспалением (гепатит, цирроз, гепатоклеточная карцинома), а также может препятствовать эффективному действию терапевтических препаратов. Частицы берлинской лазури (НЧ БЛ) являются эффективным антиоксидантом, в несколько раз превышающей каталитическую активность пероксидазы (Komkova et al, 2018), однако обладают низкой коллоидной стабильностью в биологических средах. Создание мультикомпонентных систем на основе НЧ БЛ и малых интерферирующих РНК (миРНК) позволит эффективно сочетать два терапевтических подхода – нейтрализацию АФК и метод РНК-интерференции. С этой целью нами были синтезированы НЧ БЛ различного диаметра (38, 57, 98 нм). Было показано, что при увеличении размера происходит рост каталитической активности частиц ($610 \pm 50 \text{ с}^{-1}$ для 38 нм до $5371 \pm 80 \text{ с}^{-1}$ для 98 нм). Размер частиц берлинской лазури также сказывается на результирующем диаметре разрабатываемых наночастиц (160 нм при инкапсуляции 34 нм НЧ БЛ, 250 нм при инкапсуляции 57 нм НЧ БЛ). В качестве терапевтической миРНК нами был выбран миРНК к ганкирину – онкогенному белку, который приводит к увеличению деградации супрессоров канцерогенеза в гепатоцитах. Были синтезированы, отвалидированы и отобраны три различные миРНК, позволяющие эффективно подавлять экспрессию ганкирина *in vitro* и *in vivo*. С помощью метода проточной цитометрии нами было показано, что синтезированные частицы способны нейтрализовать АФК при инкубации с гепатоцитами мыши (AML12). С помощью MTS-теста, нами было продемонстрировано, что частицы, содержащие миРНК к ганкирину и наночастицы берлинской лазури, снижают пролиферацию клеток по сравнению с контрольными частицами (миРНК к люциферазе светлячка). Также было показано, что полученные наночастицы эффективно подавляют уровень мРНК ганкирина, после их внутривенного введения. Таким образом, разработанные системы доставки на основе наночастиц берлинской лазури и миРНК могут стать перспективным инструментом для терапии заболеваний печени. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 20-74-00116.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВЕКТОРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ АТТЕНУИРОВАННОГО ВИРУСА ГРИППА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИН ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ

А.В. Васин^{1,2}, А.Ю. Егоров², М.В. Сергеева^{1,2}, М.А. Стукова¹

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; ²НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург

Применение вирусных векторов для доставки и экспрессии чужеродных антигенов в верхних дыхательных путях является привлекательным подходом для создания вакцин против респираторных инфекционных заболеваний, для которых вакцины с доказанной эффективностью все еще отсутствуют. Концепция нашей вакцины основана на применении в качестве вектора вируса гриппа, который ослаблен за счет модификации белка NS1. Данный эффект достигается заменой иммуносупрессивного С-концевого домена белка NS1 чужеродными последовательностями, кодирующими протективные антигены инфекционных патогенов. Векторы данного типа характеризуются ограниченной репликацией, но при этом обладают адъ-

ювантными свойствами, стимулируя систему врожденного иммунитета, что, в свою очередь, усиливает адаптивный антиген-специфический иммунный ответ. Преимущества вакцинации аттенуированным гриппозным вектором включают стимуляцию местного иммунитета в дыхательных путях и формирование хорошо сбалансированного Th1/Th2 клеточного компонента иммунного ответа. Поэтому в качестве потенциального патогена-мишени был выбран респираторно-синцитиальный вирус, против которого в настоящее время не существует зарегистрированных вакцин. Нами было разработано несколько векторных конструкций FLU/RSV на основе вируса гриппа, экспрессирующего консервативные антигенные сайты II и IV белка F респираторно-синцитиального вируса. Было показано, что векторы хорошо репродуцируются и генетически стабильны при многократных пассажах в куриных эмбрионах. Все полученные штаммы были безопасны при интраназальном введении лабораторным мышам. Также на мышинной модели была продемонстрирована защита от РСВ-инфекции: у вакцинированных животных зафиксировано значительное снижение вирусной нагрузки, а также меньшая степень макроскопических и гистологических поражений в легких. Полученные результаты показывают, что векторы Flu/RSV являются перспективными вакцинами кандидатами. К настоящему времени завершены комплексные доклинические исследования вакцинных кандидатов для профилактики и иммунотерапии туберкулеза легких на основе гриппозного вектора, экспрессирующего антигены *M. tuberculosis* (ESAT-6, Ag85A, HspX, TB10.4). В ходе клинических исследований I фазы у людей был показан хороший профиль безопасности и сбалансированный Т-клеточный иммунный ответ.

НОВАЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИГЛИКИРУЮЩИХ (АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ) СВОЙСТВ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ Н. Вашурин¹, Ю. Дубровский^{2,3}, Э. Кисель¹, А. Орлова⁴, М.Повыдыш⁴, А. Соболева^{1,5}, А. Фролов^{1,5}

¹Кафедра биохимии и ²Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург;

³НИИЦ им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург; ⁴Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург; ⁵Отделение биоорганической химии, Институт биохимии растений им. Лейбница, Галле (Заале), Германия

Гликирование белков – это ряд пост-трансляционных модификаций, образующихся в результате взаимодействия восстанавливающих сахаров или карбонильных продуктов их деградации с amino- и гуанидиновыми группами белков. Образующиеся в результате этого конечные продукты глубокого гликирования (КПГ) вносят существенный вклад в развитие осложнений сахарного диабета, патогенез болезни Альцгеймера и процессы старения. В течение многих десятилетий соединения растительного происхождения рассматриваются в качестве перспективных кандидатов безопасных лекарственных средств антигликирующего действия. Ограничением для создания таких препаратов, является недостаток воспроизводимых и информативных тест-систем для эффективного скрининга растительных экстрактов, фракций и отдельных соединений. Поэтому, в данной работе мы предлагаем тест-систему на основе синтетических пептидов, позволяющую оценить способность экстрактов растений и их компонентов подавлять образование КПГ. Она основана на инкубации растительных экстрактов в присутствии реакционных смесей Майяра, содержащих 0,5 ммоль/л D-глюкозы в натрий-фосфатном буфере и синтетических пептидов, предложенных ранее в качестве модели гликирования *in vitro*. Накопление индивидуальных КПГ было охарактеризовано с помощью RP-UHPLC-MS и MS/MS. Применимость тест-системы была подтверждена на примере водного и этилацетатного экстрактов надземных частей гравилата речного (*Geum rivale*). Соединения с доказанным антигликирующим действием – розмариновая кислота и аминокваданин – были использованы в качестве референсных веществ. Результаты показали, что как экстракты, так и референсные соединения в максимальных нетоксичных концентрациях вызывали замедление образования КПГ на 21-й день не менее чем на 80%. Поэтому в последующих экспериментах зависимость подавления образования КПГ от концентрации природных соединений оценивалась как для экстрактов, так и для восьми индивидуальных компонентов. Для изучения механизмов подавления образования КПГ был проведен дополнительный ГХ-МС анализ соединений, родственных углеводам, а также профилирование α -дикарбонильных соединений с помощью ЖХ-МС. Таким образом, предложенный метод оказался весьма эффективным инструментом для исследования антигликирующих и антидиабетических свойств природных соединений.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПОСОМАЛЬНЫХ СРЕДСТВ ДОСТАВКИ НА БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ, НАКОПЛЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ *IN VITRO* И *IN VIVO* Д.В. Гладких¹, И.В. Черников¹, Е.В. Шмендель², А. Бишани¹, М.А. Маслов², М.А. Зенкова¹, В.В.Власов¹, Е.Л. Черноловская¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

Основной проблемой применения нуклеиновых кислот (НК) в качестве новых фармацевтических препаратов, подходящих для лечения сложных многофакторных заболеваний, является их доставка в биодоступной форме. Одним из путей решения этой проблемы является использование липосом. Нами была получена серия липосом, основанных на поликатионном липиде 1,2,6-бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид (2X3) и липиде хелпере DOPE, содержащих таргетные и защитные компоненты в различных процентных соотношениях. Таргетная часть была представлена фолиевой кислотой, защитная ПЭГ-липоконъюгатами различного состава и процентного содержания. Оценка их накопления и биологической активности в культуре клеток KB-3-1 показала, что увеличение количества липоконъюгатов до 4% не оказывает отрицательного действия на накопление siРНК, но может негативно сказываться на ее биологической активности. Показано, что использование липосом с 4% diP800 позволяет сохранить высокую активность siРНК. Исследована интерферон-индуцирующая активность иммуностимулирующей РНК в комплексе с липосомами через 6 часов после внутривенного введения мышам СВА. Показано, что увеличение содержания липоконъюгатов до 4% приводит к увеличению количества секретируемого интерферона, самый эффективный ответ наблюдается при введении комплекса с diP800. Динамика концентрации siРНК в плазме крови после внутривенного введения мышам СВА ее комплексов с липосо-

мами по данным stem-loop ПЦР указывает на быстрое выведение препарата из организма животных. Концентрация siРНК драматически падает в промежутке 15–30 минут, дольше всего, до 60 минут, в крови циркулирует РНК в комплексе с липосомами, содержащие липоконъюгат Р1500. Исследование селективности действия таргетных липосом, содержащих фолат показало, что селективность доставки в клетки, экспрессирующие фолатный рецептор, обеспечивается при невысоких отношениях Р/Н и достаточно высоком уровне экспрессии рецептора, что позволяет достигнуть эффективного накопления siРНК в ксенографтных опухолях. Таким образом, арсенал липоконъюгатов позволяет обеспечивать наиболее эффективное действие терапевтических НК, в зависимости от типа НК и ее клеток-мишеней. *Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 18-29-08009-мк.*

КАРТИРОВАНИЕ САЙТОВ ИНИЦИИИ ТРАНСКРИПЦИИ *ESCHERICHIA COLI* K12 ПРИ ОТВЕТЕ НА ОБРАБОТКУ АНТИБИОТИКАМИ РАЗЛИЧНОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

Ю.В. Гоголев^{1,2}, Н.Е. Гоголева^{1,2}, М.А. Сайганова², Е.В. Осипова¹, А.С. Балкин³, А.А. Ткаченко⁴, А.В. Долгих⁴

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ³Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург; ⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Несмотря на просто устроенные геномы бактерий, их транскриптомы оказались неожиданно сложными. Значительную долю в них составляет некодирующая РНК (нкРНК), которая представлена множеством вариантов, различающихся по происхождению, размеру молекул и их копииности в клетке. За синтез этих РНК отвечают неканонические сайты инициации транскрипции (TSS), количество которых в несколько раз превышает TSS мРНК. Разработка метода Cappable-Seq, основанного на селекции и секвенировании транскриптов, содержащих 5'-концевые трифосфаты, позволила проводить картирование десятков тысяч TSS с точностью до одного нуклеотида и определять их транскрипционную активность. Сочетание Cappable-Seq с высокопроизводительным секвенированием по стандартным протоколам делает возможным сравнение дифференциальных профилей мРНК и нкРНК в различных условиях. В качестве таких условий нами применена обработка бактерий тетрациклином, рифампицином и новобиоцином, подавляющими процессы, связанные с белковым синтезом, транскрипцией и поддержанием топологии ДНК. Кроме выявления возможного влияния этих процессов на синтез двух видов РНК, данный подход обеспечивает активацию широкого спектра TSS, что облегчает их картирование на бактериальной хромосоме. Некоторые биоинформатические алгоритмы были разработаны для определения частоты встречаемости TSS нкРНК в зависимости от расположения структурных и регуляторных элементов картированных генов и оперонов. В результате выявлены некоторые закономерности расположения данных сайтов, показано наличие сложных положительных и отрицательных корреляционных отношений активности синтеза нкРНК с общей транскрипционной активностью кодирующего локуса, активностью близлежащих сайтов инициации транскрипции и функциональными изменениями бактериальной клетки в ответ на специфические антибиотики. *Работа поддержана Российским научным фондом грант №17-14-01363.*

ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ ПОЛИЕНОВЫЕ ФЛАВОНОСОМЫ

С.С. Ефимова, О.С. Остроумова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Рост антибиотикорезистентности патогенных штаммов обусловил необходимость разработки новых противогрибковых средств. Липид-ассоциированные композиции амфотерицина Б с успехом применяются для снижения нефротоксичности антибиотика, сохраняя его противогрибковую эффективность. С целью дальнейшего повышения эффективности и снижения токсичности действия макролидных полиеновых антибиотиков нами были разработаны их инновационные липосомальные формы, включающие различные флавоноиды, фосфолипиды и стеринны – флавоносомы. Среди флавоноидов протестированы флоретин, биоханин А, генистеин и кверцетин. Установлено, что флоретин-модифицированные амфотерицин-содержащие липосомы характеризуются большей способностью к высвобождению флуоресцентного маркера из везикул, имитирующих мембраны грибковых клеток по сравнению с липосомальными комплексами, не включающими флоретин или включающими биоханин А, генистеин и кверцетин. Одиночные полиеновые ион-проницаемые поры в липидных бислоях, имитирующих состав мембран грибковых клеток, имеют симметричную вольт-амперную характеристику, что свидетельствует о функционировании симметричных амфотерициновых-каналов, а, следовательно, о снижении пороговой концентрации антибиотика. Среди стериннов протестированы холестерин, 7-дегидрохолестерин, десмостерин, кампостерин, стигмастерин и эргостерин. Установлено, что 7-дегидрохолестерин, десмостерин и эргостерин-содержащие липосомы характеризуются наименьшей способностью к увеличению проницаемости везикул, имитирующих мембраны клеток млекопитающих, что указывает на возможное снижение токсичности липосомальных препаратов, включающих указанные стеринны. На основании полученных данных определен оптимальный состав полиеновых флавоносом, обеспечивающий их повышенное сродство к мембранам патогенных микроорганизмов и пониженное – к мембранам клеток млекопитающих. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (№ 19-14-00110 и 21-74-10096).*

МЕХАНИЗМЫ ПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ФРАГМЕНТА 60-76 РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ В МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

А.В. Камынина^{1,2}, Н. Эстерас³, Т.Д. Волкова¹, Д.О. Короев¹, П. Ангелова³, И.С. Охрименко², А.А. Захарчев², Д.С. Буркатовский², А.Ю. Абрамов³, О.М. Вольпина¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный; ³Институт нейрологии, Университетский колледж Лондона, Великобритания

Известно, что рецептор конечных продуктов гликозилирования (RAGE), участвующий в процессах воспаления и гибели клеток, играет важную роль в развитии болезни Альцгеймера (БА). Ранее нами был выявлен фрагмент внеклеточного V-домена RAGE последовательности 60-76, который предотвращал потерю пространственной памяти мышей с экспериментально индуцированной формой БА, а также восстанавливал другие биохимические проявления БА у животных. В опытах *in vitro* было показано, что пептид 60-76 защищал нейроны и астроциты от бета-амилоидной токсичности. Однако механизм протективного действия этого пептида оставался неясным. В настоящей работе мы изучили связывание пептида RAGE 60-76 с бета-амилоидом и его влияние на его олигомеризацию, а также исследовали действие пептида на кальциевый сигнал в нейронах и астроцитах и пути его возникновения. Методом флуоресцентного титрования мы показали, что пептид 60-76 способен связываться с бета-амилоидом 1-40 *in vitro*, а также методом динамического светорассеяния было показано, что пептид 60-76 препятствует его олигомеризации. Проведенные исследования показали, что добавление к первичной культуре нейронов и астроцитов гипокампа и коры мозга крыс пептида 60-76 вызывает возникновение кальциевого сигнала в нейронах, но не в астроцитах. Этот сигнал полностью блокировался в присутствии высокоаффинного антагониста RAGE, в бескальциевой среде, а также в присутствии в среде антагонистов глутаматных рецепторов – NMDA и AMPA рецепторов. Более того, мы показали, что предварительная обработка клеток конканамицином А, вызывающим высвобождение глутамата из глутаматных везикул, также препятствовала возникновению кальциевого сигнала в ответ на добавление пептида 60-76. С использованием флуоресцентно меченного пептида 60-76 было показано, что пептид не проникал внутрь клеток нейробластомы SH-SY5Y спустя 72 часа инкубации в культуре. Таким образом, наши данные показали, что пептид RAGE 60-76 может реализовывать свое протективное действие, либо связываясь с бета-амилоидом и препятствуя его олигомеризации, а также пептид 60-76 способен активировать RAGE-опосредованный кальциевый сигнал в нейронах, что также может являться защитным механизмом против развития БА. *Исследования были выполнены при поддержке гранта РФФИ 19-015-00064 и 19-04-00624.*

РАЗРАБОТКА МЕТОДА РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМ CRISPR/Cas И АТТЕНУИРОВАННЫХ РНК-ПРОВОДНИКОВ

А.П. Костюшева¹, С.А. Брезгин^{1,2}, Н.И. Пономарева^{1,3}, В.Г. Воля¹, Dieter Glebe⁴, Д.С.Костюшев¹, В.П. Чуланов^{1,3}

¹НМИЦ фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний МЗ РФ, Москва; ²ГНЦ РФ – Институт иммунологии ФМБА России, Москва; ³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва; ⁴Институт медицинской вирусологии, Justus Liebig University Giessen, Гиссен, Германия

Внутриклеточные факторы семейства АРОВЕС/AID обладают широкой противовирусной активностью. Гиперэкспрессия цитидин-дезаминаз АРОВЕС3А (А3А), АРОВЕС3В (А3В), АРОВЕС3G (А3G) и AID способствует специфической деградации генома вируса гепатита В (ВГВ) и может быть использована для создания новых методов терапии хронического гепатита В. Тем не менее, неконтролируемая гиперпродукция факторов АРОВЕС/AID способна вызывать мутации в геноме человека. Разработка методов снижения токсичности внутриклеточных факторов является ключевой задачей при создании новых противовирусных подходов. Исследования проводили на клетках человека HepG2 и HEK293T, гены АРОВЕС/AID активировали с помощью системы CRISPRa (dCas9p300). Активацию генов оценивали с помощью ПЦР и вестерн-блоттинга. Противовирусную активность оценивали по изменениям уровней ДНК и РНК вируса и белков (НВсAg). Деаминирование генома вируса анализировали с помощью NGS. В данной работе был создан подход по активации генов А3А, А3В, А3G и AID с увеличением продукции соответствующих белков. Данный подход обеспечивал эффективную деградацию и гипермутацию (замены G→A и C→T) генома ВГВ со снижением транскрипции и уровней НВсAg вируса до 99%. Ранее было показано, что внесение единичных замен нуклеотидов в позиции РНК-проводника позволяет добиться снижения уровней активации целевых генов с шагом в 10%. В дальнейшем был проведен анализ тысяч РНК-проводников и получены варианты с заменами нуклеотидов (аттенуированные РНК-проводники) и предсказанной эффективностью действия. При использовании аттенуированных РНК-проводников для каждого гена показана возможность титрования уровней целевых мРНК, что согласуется с предсказанными значениями активации. Снижение активации транскрипции АРОВЕС/AID в 2-10 раз не оказывало либо слабо влияло на противовирусную активность.

Активация генов с помощью CRISPRa – перспективный инструмент для разработки противовирусных подходов. Использование CRISPRa с аттенуированными РНК-проводниками обеспечивает точный контроль за активацией генов и может использоваться для снижения токсических эффектов внутриклеточных факторов. *Работа была поддержана грантом РФФИ-DFG №20-515-12010 и GL595/9-1; дизайн РНК-проводников выполнялся в рамках РФФИ №20-015-00442.*

ЦИАНО ЕНОН-СОДЕРЖАЩИЕ ТРИТЕРПЕНОИДЫ В КАЧЕСТВЕ ПЕРСПЕКТИВНОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКИХ И НЕЙРО-/ГЛИОТРОПНЫХ АГЕНТОВ

А.В. Марков¹, К.В. Одаренко¹, А.А. Ильина¹, А.В. Сенькова¹, О.В. Саломатина^{1,2}, Н.Ф. Салахутдинов², М.А. Зенкова¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

Известно, что введение циано енонового заместителя в структуру природных пентациклических тритерпеноидов значительно усиливает их противоопухолевый потенциал. Несмотря на большой объем проведенных работ, эффект циано енон-содержащих тритерпеноидов (ЦЕТ) на эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) опухолевых клеток, лежащий в основе метастазирования, и их биоактивность в отношении злокачественных клеток головного мозга изучены крайне слабо. В результате скрининга ряда ЦЕТ было выявлено лидерное соединение солоксолон метил (СМ), способное достоверно ингибировать подвижность и клоногенный потенциал злокачественных клеток. Установлено, что СМ эффективно подавляет ЭМП на модели TGF- β -стимулированных A549 клеток: тритерпеноид достоверно снижает их миграционный и инвазионный потенциал и смещал экспрессию ЭМТ маркеров в сторону эпителиального фенотипа (ап-регуляция E-кадгерина и ZO-1, даун-регуляция виментина и фибронектина). С помощью комплексного network pharmacology подхода установлено, что прямое связывание СМ с матриксными металлопротеиназами MMP-2/-9 и киназой JNK1 может лежать в основе его анти-ЭМП активности. Ингибирующий эффект СМ в отношении ЭМП был далее валидирован *in vivo*: установлено, что СМ эффективно ингибирует метастазирование меланомы В16 в легкие мышей-опухоленосителей, увеличивает экспрессию E-кадгерина и подавляет экспрессию MMP-9 в метастатических узлах. На втором этапе работы с использованием *in silico* анализа и синтетических подходов был создан ряд новых производных СМ, потенциально способных проникать через гемато-энцефалический барьер. В результате скрининга новых соединений на панели клеток глио- и нейробластом выявлено лидерное производное Jil-7, способное запускать апоптоз и блокировать ЭМП данных клеток. В нетоксичных дозах Jil-7 обладает выраженной нейритогенной активностью и защищает клетки глиобластомы от окислительного стресса, активируя цитопротекторный Nrf2 сигнальный путь. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о перспективности использования ЦЕТ в качестве скаффолда для создания новых противоопухолевых агентов. *Работа поддержана грантом РНФ №17-75-20120.*

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

М.А. Хомутов, А.Р. Хомутов

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

Биогенные полиамины спермин (Spm) и спермидин (Spd) присутствуют в клетках эукариот в микро-/миллимолярных концентрациях, что определяет множественность их функций и необходимость для поддержания нормального роста клеток. Содержание полиаминов в опухолевых клетках повышено [1], а нарушения метаболизма полиаминов ассоциированы с некоторыми видами панкреатита, болезнями Паркинсона и Альцгеймера, синдромом Шнайдера-Робинсона и т.д. [2, 3]. Аналоги и производные Spm и Spd широко используются в биохимии полиаминов, и с их помощью получен ряд принципиально значимых для области результатов. С-метилированные аналоги Spd представляют собой особую группу соединений, так как среди этих веществ найдены функционально активные *in vitro* и *in vivo* миметики, биохимические свойства которых можно регулировать, перемещая метильную группу по скелету Spd и/или, изменяя конфигурацию хирального центра [4-6]. Рассматриваются особенности взаимодействия С-метилированных аналогов полиаминов с ферментами их метаболизма и активность в культуре клеток. Обсуждаются возможности использования С-метилированных аналогов Spd в качестве инструмента исследования особенностей биосинтеза и клеточных функций небольшого короткоживущего белка, антизима орнитиндекарбоксилазы – основного регулятора гомеостаза полиаминов, который синтезируется и работает в клетках с их повышенным содержанием. *Работа поддержана грантом РНФ 17-74-20049*

1. Casero R.A., et. al. "Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities". *Nat. Rev. Cancer*, 18, 681-695 (2018)
2. Pegg A.E. "Functions of Polyamines in Mammals". *J. Biol. Chem.*, 291, 14904-14912 (2016)
3. Ramani D., et. al. "Aliphatic polyamines in physiology and diseases". *Clin. Nut.*, 33, 14-22 (2014)
4. Хомутов М.А. и соавт. "С-метилированные аналоги спермина и спермидина: синтез и биологическая активность". *Биоорг. химия*, 45, 588–614 (2019)
5. Hyyönen M.T., et. al. "Enantiomers of 3-methylspermidine selectively modulate deoxyhypusine synthesis and reveal important determinants for spermidine transport". *ACS Chem. Biol.*, 10, 1417-1424 (2015)
6. Murray Stewart T., et. al. "(R,R)-1,12-Dimethylspermine can mitigate abnormal spermidine accumulation in Snyder-Robinson syndrome". *J. Biol. Chem.*, 295, 3247-3256 (2020)

ЭНДОЛИЗИНЫ БАКТЕРИОФАГОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

О.Н. Копосова¹, А.В. Скорынина¹, Р.М. Бузиков¹, Э.Г. Пилигримова¹, О.А. Казанцева¹, В.А. Кулябин¹,
Н.А. Рябова², А.М. Шадрин¹

¹ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН; ²Институт белка РАН, Пушино

Эндолизины, ферменты бактериофагов, ответственные за разрушение пептидогликана клеточной стенки бактерий на последних стадиях литического цикла. Эти ферменты с успехом могут быть использованы для борьбы с возбудителями бактериальных инфекционных заболеваний, в том числе, с штаммами проявляющими множественную устойчивость к антибиоти-

кам. Так, в начале 2020 года, компания ContraFect перешла к третьей фазе клинических испытаний препарата Eхеbасасе (CF-301), на основе эндолизина фага, заражающего *Staphylococcus aureus*. В этой работе мы представляем сравнительный анализ эндолизинов бактериофагов vB_BtS_B83, vB_BcM_Sam46, vB_BcM_Sam112, Izhevsk, W-beta, phIS3501, заражающих *Bacillus cereus sensu lato*, а также эндолизинов бактериофага iF-6, заражающего *Enterococcus faecium*.

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСОСОМ И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Н.И. Пономарева^{1,2}, С.А. Брезгин¹, А.П. Костюшева¹, Е.О.Баюрова^{4,5}, В.Г. Воля¹, В.И. Гегечкори², И.В. Гордейчук^{4,5}, А.А. Замятин^{2,3}, В.П. Чуланов^{1,2}, Д.С. Костюшев¹.

¹НМИЦ фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний МЗ РФ, Москва; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва; ³Университет «Сириус», Сочи, Россия ⁴Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова, Москва; ⁵НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Экзосомы представляют из себя небольшие мембранные внеклеточные везикулы диаметром 30-100 нм, которые секретируются всеми типами клеток. Основным способом получения экзосом и других внеклеточных везикул является ультрацентрифугирование. Данный метод имеет ряд недостатков, таких, как низкий выход, низкая производительность, а также возможное повреждение внеклеточных везикул. Следовательно, разработка быстрого, высокопроизводительного метода выделения экзосом и внеклеточных везикул – актуальная задача, решение которой может существенно упростить процесс получения внеклеточных везикул для научных и клинических целей. Внеклеточные везикулы выделяли из культуральной жидкости мезенхимных стромальных/стволовых клеток (МСК) и клеток почки эмбриона человека (НЕК293Т) с помощью ультрацентрифугирования либо протокола анионообменной хроматографии. Анионообменную хроматографию проводили на приборе BioRad BioLogic LP с анионообменной смолой MacroPrep DEAE Media (BioRad). Полученные везикулы были охарактеризованы с помощью динамического светорассеяния, вестерн-блоттинга (CD63, CD81, HSP81) и по значению z-потенциала. Проведен сравнительный анализ методов выделения внеклеточных везикул с помощью ультрацентрифугирования и анионообменной хроматографии. Показано, что средний размер частиц, полученный с помощью анионообменной хроматографии, был сопоставим с размером частиц при ультрацентрифугировании (~100 нм). Дзета-потенциал экзосом, выделенных оптимизированным методом составляет ~-12,5 мВ. По результатам вестерн-блот анализа изоляты внеклеточных везикул были положительны по основным маркерам экзосом (CD63, CD81, HSP70). Разработан высокопроизводительный метод получения внеклеточных везикул из больших объемов жидкости (до десятков литров). Частицы, полученные с помощью анионообменной хроматографии, по характеристикам соответствуют экзосомам и сопоставимы по свойствам везикулам, выделенным с помощью ультрацентрифугирования. *Выполнено при поддержке гранта РНФ №21-75-30020.*

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА С ОРГАНИЗМОМ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ СПОСОБОВ ТЕРАПИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

О.А. Тарасова¹, А.А. Лагунин^{1,2}, Д.А. Филимонов¹, С.М. Иванов^{1,2}, В.В. Поройков¹

¹Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Инфекционное заболевание, вызываемое вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), является социально-значимым: общее число пациентов с лабораторно подтвержденной ВИЧ-инфекцией на территории РФ составило (по состоянию на июнь 2020 года) 1 094 050 человек. К существующим антиретровирусным препаратам (АРВТ) может развиваться устойчивость; некоторые из них проявляют побочные и токсические эффекты. Одним из направлений поиска новых способов терапии является анализ взаимодействия ВИЧ с организмом человека и идентификация белков-мишеней человека, вовлеченных в развитие ВИЧ-инфекции. Целью нашей работы является всесторонний анализ взаимодействия белков/генов ВИЧ с организмом человека и идентификация потенциальных мишеней для поиска новых методов терапевтического воздействия. Мы разработали подход, включающий анализ дифференциальной экспрессии генов CD8+ Т-лимфоцитов у пациентов с различной скоростью прогрессии ВИЧ-инфекции, в том числе анализ мастер-регуляторов (генов, которые потенциально могут активировать другие звенья сети взаимодействий). Анализ дифференциальной экспрессии генов CD8+ Т-лимфоцитов проведен на основе свободно-доступных данных по транскрипции у ВИЧ-положительных пациентов с различной скоростью прогрессии ВИЧ-инфекции: (1) элитные контроллеры (пациенты, которые в течение длительного времени характеризуются значениями вирусной нагрузки менее 50 копий/мл); прогрессоры, (2) принимающие, и (3) не принимающие АРВТ. В результате были идентифицированы гены, отличающиеся по уровню экспрессии у пациентов с разной скоростью развития ВИЧ-инфекции, а также мастер регуляторы, включающие: гены рецепторов интерлейкинов-2 и 4, С-Х-С мотивы рецепторов хемокинов 2 и 4 и другие. Найденные рецепторы могут рассматриваться как потенциальные мишени, при воздействии на которые возможно замедление скорости прогрессии ВИЧ-инфекции. Для идентификации белков был выполнен поиск известных ингибиторов и соединений, воздействующих на экспрессию соответствующих генов в свободно-доступных базах данных. В результате выявлены низкомолекулярные соединения, которые можно рассматривать в качестве кандидатов для последующей разработки новых лекарственных препаратов для терапии ВИЧ-инфекции в комбинации с существующими препаратами. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-75-10097.*

ИНГИБИТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ 5'-НОРКАРБОЦИКЛИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ НУКЛЕОЗИДОВ В ОТНОШЕНИИ SARS-CoV-2

А.Л. Хандажинская¹, Е.С. Матюгина¹, М.С. Новиков², Л.И. Козловская^{3,4}, В.П. Волок³, Е.Ю. Шустова³, А.А. Ишмухаметов^{3,4}, С.Н. Кочетков¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ²Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград; ³Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва; ⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва

В декабре 2019 года в китайском городе Ухань была зарегистрирована вспышка атипичной пневмонии, вызванной новым вирусом. Этот вирус стал седьмым в группе коронавирусов человека и получил название SARS-CoV-2. Заболевание, названное COVID-19, быстро распространилось по всему миру, и 11 марта 2020 года Всемирной организацией здравоохранения была объявлена пандемия. Быстрое выявление этиологического агента, информации о генетической последовательности вируса и свободный доступ к ней, а также разработки вакцин против «атипичной пневмонии», вызванной SARS-CoV-2, привели к появлению вакцин, некоторые из которых успешно прошли доклинические и клинические испытания, и используются для массовой вакцинации. Тем не менее, создание препаратов для лечения COVID-19 остается весьма актуальной задачей, поскольку общепринятых специфических методов терапии COVID-19 в настоящий момент нет. Предложены различные типы новых потенциальных лекарств: препараты на основе антител, ингибиторы вирусных ферментов (РНК-зависимой РНК полимеразы, протеазы и др.), ингибиторы взаимодействия с рецептором и слияния, и др. Кроме того, рассматривается возможность перепрофилирования существующих лекарственных средств: во всем мире ведутся интенсивные исследования препаратов созданных для терапии других вирусных (грипп, ВИЧ инфекция, гепатит С, лихорадка Эбола и др.), бактериальных и паразитарных инфекций, аутоиммунных, онкологических и других заболеваний. В контексте стратегии перепрофилирования проведен скрининг библиотеки аналогов 5'-норкарбоциклических нуклеозидов, полученных ранее и показавших противовирусную, антибактериальную, противопаразитарную или антипролиферативную активность. Методами фенотипического скрининга выявлены аналоги нуклеозидов, способные ингибировать репродукцию вируса SARS-CoV-2 *in vitro*. Структуры данных соединений использованы для дальнейшей оптимизации с целью создания противовирусного препарата. Работа была поддержана в рамках проекта РФФИ № 20-04-60414.

Стендовые доклады

РАЗРАБОТКА ЧИПОВ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ БЕЛКАМИ SARS-CoV-2 ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

Т.С. Ведехина, В.А. Манувера, А.М. Варижук, Д.С. Матюшкина, В.А. Мусарова, Д.В. Басманов, В.Н. Лазарев, Г.Е. Позмогова, В.М. Говорун

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Диагностические тесты на инфекцию SARSCoV-2 в основном базируются на полимеразной цепной реакции обратной транскрипции (rRT-PCR) вирусного генетического материала, собранного в мазках из носоглотки. В отличие от ПЦР, серологические анализы показывают наличие иммунной реакции против вируса посредством обнаружения иммуноглобулинов, направленных против структурных белков SARS-CoV-2. Иммунный ответ определяется не только количеством антител, но и общей силой связывания потенциальных нейтрализующих антител с соответствующими иммуногенными белками коронавируса. В данной работе иммунные ответы на SARS-CoV-2 были профилированы с использованием белковых микрочипов. Подложку изготавливали на предметных стеклах Puyex (Corning, США). На каждом слайде лазером были отмечены квадратные зоны 5×5 мм. Маркированные предметные стекла были отполированы химическим способом. Протоколы модификации поверхности предметных стекол 3-аминопропилтриэтоксисиланом (APTES) и его функционализации для иммобилизации белков были разработаны на основе ранее опубликованных общих методик. На чипы наносились как структурные, так и неструктурные белки SARS-CoV-2. Первые включали белок нуклеокапсида, RBD и S2. Последние включали NSP2, NSP5, NSP7, NSP9, NSP10 и NSP15. Фибриноген человека использовали в качестве отрицательного контроля. Белковые микрочипы обрабатывали сыворотками COVID-19-положительных и отрицательных доноров, затем промывали и окрашивали флуоресцентно меченными вторичными антителами. С помощью флуоресцентной микроскопии оценивали иммунный ответ. Мы исследовали 95 сывороток, полученных от 13 уникальных положительно протестированных ПЦР пациентов с критическими, тяжелыми, умеренными и легкими симптомами, а также 37 контрольных сывороток. Статистически значимая разница между группами ковидных пациентов и здоровых доноров наблюдалась по всем структурным белкам, наиболее значима была для нуклеокапсидного белка. Что касается неструктурных белков, значимой разницы не наблюдалось, но были отмечены отдельные случаи иммунного ответа на протеазу NSP5. Помимо отслеживания связывания антител против структурных белков у пациентов с COVID-19 этот анализ идеально подходит для мониторинга здоровых людей, которые будут вакцинированы против SARS-CoV-2.

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЯ АМИНОКИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ БЕРЕМЕННЫХ С COVID-19

А.В. Новоселова, У.Л. Петрова, В.В. Чаговец, Н.Л. Стародубцева, Н.А. Ломова, Р.Г. Шмаков, В.Е. Франкевич
НИИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ, Москва

В настоящее время активно изучается вирус SARS-CoV-2 и связанное с ним заболевание COVID-19. Особую важность эти исследования имеют для когорты беременных женщин, так как беременные и их плоды представляют группу высокого риска во время вспышек инфекционных заболеваний. Физиологические и механические изменения во время беременности повышают восприимчивость женщин к инфекциям в целом. По данным китайских исследователей, наличие COVID-19 у беременной и роженицы с большой вероятностью может сопровождаться преждевременными родами. Пока нет доказательств того, что нарушение роста плода может быть связано с заболеванием матери COVID-19, но уже выявлены нарушения роста плода в двух третьих случаев беременностей с диагностированной у женщин ОРВИ. Показана вероятная связь COVID-19 у беременной/рожицы с развитием дистресс-синдрома у плода, тромбоцитопенией и нарушением функции печени у новорожденного. Поэтому важной задачей является разработка методов мониторинга состояния метаболических процессов в организме матери и ребенка в случае, когда беременность сопровождается заболеванием COVID-19. В данное исследование были включены 46 беременных: основную группу составили 29 пациенток с подтвержденным диагнозом COVID-19; контрольную группу составили 17 соматически здоровых женщин с беременностью без осложнений. Диагноз COVID-19 был подтвержден с помощью ПЦР теста. У пациенток были собраны образцы амниотической жидкости, плазмы материнской крови и плазмы пуповинной крови. Для образцов был выполнен количественный анализ аминокислот с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь. В результате анализа были выявлены статистически значимые отличия концентрации 1-метилгистидина, 3-метилгистидина, аргинина, цистатионина, цистина, глутамина, гистидина, 4-гидроксипролина в амниотической жидкости; 1-метилгистидина, бета-аланина, цистина и гистидина в плазме пуповинной крови; 1-метилгистидина, цистина, глутаминовой кислоты, глутамина и лизина в плазме материнской крови. Изменение концентрации некоторых из перечисленных аминокислот также наблюдалось в случае таких тяжелых патологий, как преэклампсия и СЗРП, которые могут значительно влиять на состояние ребёнка. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-60093.*

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G И M К КОРОНАВИРУСУ SARS-CoV-2 В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

А.М. Ромозанова, Н.Н. Хабилова, Р.Р. Хадиуллина, А.Р. Ибрагимова, Р.Ф. Хайруллин
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Одним из наиболее развивающихся методов экспресс-диагностики является иммунохроматографический анализ (ИХА). Особое значение этот метод имеет в случае коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, так как позволяет быстро получать результаты исследования без необходимости применения специального оборудования. Нами была разработана иммунохроматографическая тест-система на основе рекомбинантного антигена возбудителя коронавирусной инфекции и ZZ-фрагмента белка A *Staphylococcus aureus*. В ИХА, применяемом для выявления антител к антигену возбудителя инфекции, чувствительность в значительной степени зависит от антигена, конъюгированного с золотыми наночастицами и детектирующих реагентов, формирующих тестовую зону на аналитической нитроцеллюлозной мембране. В разработанной тест-системе в качестве антигена, конъюгированного с наночастицами золота, использовали рекомбинантный рецептор-связывающий домен (RBD) гликопротеина S1 коронавируса SARS-CoV-2, экспрессированный в культуре клеток эмбриональных почек человека HEK293F. В качестве контрольного белка использовали иммуноглобулины класса G кроликов. Для формирования тестовой линии аналитической зоны применяли рекомбинантный RBD гликопротеина S1 коронавируса SARS-CoV-2, контрольную линию формировали рекомбинантным ZZ-фрагментом белка A *S. aureus*, который связывает конъюгат наночастиц золота с контрольным белком. После образования иммунного комплекса иммуноглобулинов сыворотки крови класса G и M с конъюгатом наночастиц золота и RBD антигена коронавируса, иммуноглобулины соединяются свободными участками связывания с рекомбинантным RBD антигеном, иммобилизованным на нитроцеллюлозной мембране. Применение рекомбинантного ZZ-фрагментом белка A *S. aureus* позволяет существенно удешевить производство тест-системы, так как этот белок может быть легко получен путем гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*. Результаты показали, что при использовании RBD в качестве тестовой линии тест-система проявляет специфичность — при добавлении сыворотки от переболевших коронавирусной инфекцией появлялась полоска на уровне нанесенного RBD белка, при добавлении сыворотки здоровых доноров полоски не было. Результаты предварительных испытаний показали пригодность такой схемы для определения суммарных антител (IgG, IgM) к возбудителю коронавируса.

КЛИНИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ГЕРОДИАГНОСТИКЕ И ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННОЙ ГЕРОПРОФИЛАКТИКЕ

И.В. Гаврилов^{1,2}, В.Н. Мещанинов^{1,2}, В.С. Мякотных¹

¹Уральский государственный медицинский университет; ²Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург

Стандартизированные биохимические показатели периферической крови человека имеют установленное диагностическое значение. Многие из них имеют не оцененные онтогенетические и гендерные особенности, диагностическое значение которых не определено. Цель. Оценить возможности использования лабораторных биохимических показателей периферической крови в геронтологии как маркеров старения. Привлечены данные лабораторных биохимических исследований 786 пациентов мужского пола, практически здоровых (280) и с полиморбидной патологией невысокой степени тяжести в стадии ремиссии (506), с паспортным возрастом 35–90 лет, в том числе с известной продолжительностью жизни (95). Исследовали

функционально-психологические показатели биологического возраста [Токарь с соавт., 1991; Гаврилов с соавт. 2012], стандартные биохимические показатели и показатели перекисного окисления липидов. Статобработка – с использованием коэфф. корреляции Пирсона. Наиболее однозначные результаты получены у лиц мужского пола. Абсолютная величина коэффициентов корреляции вне зависимости от ее знака с календарным и биологическим возрастом у биохимических показателей периферической крови мужчин была заметно ниже, чем у функционально-психологических показателей. Корреляция с продолжительностью жизни биохимических показателей мужчин была выше, чем функционально-психологических показателей. Функционально-психологические показатели подходят для оценки темпа старения, биохимические показатели отражают продолжительность жизни и могут использоваться в подборе индивидуализированной геропрофилактической терапии. *Выполнено по госзаданию МЗ РФ 2021-2023. Рег. № 121030900298-9 «Индивидуализация подбора комплексной геропрофилактической терапии».*

МЕТОДИКА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ИНФЕКЦИОННЫХ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА

А.Б. Матив¹, А.К. Емельянов², С.Н. Пчелина², Г.А. Журавлева^{1,3}, С.А. Бондарев^{1,3}

¹Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; ²ПИЯФ, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; ³Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Амилоиды – это белковые агрегаты, обладающие кросс-бета структурой. Впервые они были описаны в связи с развитием неизлечимых заболеваний человека. Формирование амилоидов связано с изменением структуры одного конкретного белка. Этот процесс может происходить спонтанно, а может быть индуцирован присутствием уже сформированных агрегатов. Это свойство лежит в основе разработки методов для детекции развития заболеваний, связанных с амилоидами, на ранних этапах. В нашей лаборатории была протестирована методика детекции агрегатов альфа-синуклеина (aSyn), основанная на анализе кинетики агрегации мономерного белка. На первом этапе мы отработали процедуру выделения нативного aSyn из клеток *Escherichia coli*, сочетающую в себе ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию. Полученный белок был использован для анализа динамики спонтанной агрегации белка, а также в присутствии сформированных агрегатов aSyn. Накопление амилоидных агрегатов в пробах мы оценивали по изменению флуоресценции амилоид-специфичного красителя Тиофлавина Т. Как и ожидалось, в случае спонтанной агрегации процесс начинает развиваться с сильной lag-фазой. В присутствии фибрилл aSyn, наоборот, рост флуоресценции начинается с первых минут реакции, причем соразмерно количеству добавленных агрегатов. В ходе отработки методики также мы протестировали различные факторы, которые могли влиять на агрегацию: способ перемешивания, необходимость фрагментации предсуществующих агрегатов, концентрацию Тиофлавина Т. Отработанная методика в последствии будет опробована для детекции инфекционных амилоидных агрегатов альфа-синуклеина при анализе биологических жидкостей пациентов с различными синуклеинопатиями. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (20-015-00116).*

ВЛИЯНИЕ СТАРЕНИЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ИНСУЛИНОМ

Е.С. Войнова¹, П.А. Тюрин-Кузьмин¹, К.Ю. Кулебякин¹, О.Н. Григорьева², Н.А. Басалова², Н.А. Александрович², М.С. Арбатский², М.А. Вигоровский², А.Ю. Ефименко²

¹Факультет фундаментальной медицины и ²Институт регенеративной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Мультипотентные стромальные клетки (МСК) являются основными предшественниками адипоцитов в жировой ткани. При старении организма человека регуляция и обновление жировой ткани нарушаются, что связано со старением МСК. Это, в свою очередь, приводит к развитию ряда метаболических нарушений, таких как метаболический синдром и ожирение. Мы предполагаем, что обновление жировой ткани может нарушаться при старении в результате изменения чувствительности МСК к основному индуктору адипогенной дифференцировки инсулину. Целью нашей работы было выяснить, как изменяется адипогенный потенциал МСК при старении и выяснить механизм этого процесса. Мы использовали две модели клеточного старения. МСК, выделенные из жировой ткани пожилых доноров, мы считали клетками, прошедшими старение *in vivo*. В модели репликативного старения МСК от молодых доноров проводили через длительное культивирование. В качестве контрольных использовались клетки молодых доноров на ранних пассажах. Мы обнаружили, что в старых МСК повышен уровень базальной активности сигнальных каскадов, активируемых инсулиновыми рецепторами, а именно Erk-и Akt-зависимых сигнальных каскадов. Это позволяет предположить развитие в сенесцентных клетках инсулинорезистентности пострецепторного типа. Для оценки влияния паракринного действия секретиремых МСК компонентов на развитие инсулинорезистентности, мы проанализировали различия в профилях микроРНК во внеклеточных везикулах (ВВ), секретиремых МСК. Мы выявили, что в ВВ от старых МСК повышено содержание микроРНК, мишенями которых являются компоненты инсулинорезистентного сигнального каскада (PTEN, MAPK1, GAREM1). Далее мы проверили, как влияют ВВ на чувствительность МСК к инсулину и их дифференцировочные свойства. Для этого мы инкубировали молодые МСК в присутствии ВВ от старых клеток и наоборот и при этом либо регистрировали инсулин-зависимую сигнализацию, либо дифференцировали клетки в адипоциты. Обнаружилось, что молодые клетки хуже дифференцировались под действием ВВ от сенесцентных, а сенесцентные клетки повышали эффективность дифференцировки под действием ВВ от молодых. Таким образом, мы выяснили, что при старении происходит ослабление адипогенного потенциала МСК путем паракринной индукции инсулинорезистентности. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-29-04172.*

ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И СЕКРЕЦИЯ АДИПОКИНОВ

К.В. Драчева^{1,2}, И.А. Побожьева^{1,2}, К.А. Анисимова¹, С.Г. Баландов¹, З.М. Хамид¹, А.А. Пантелеева^{1,2},
Д.И. Василевский¹, С.Н. Пчелина^{1,2}, В.В. Мирошникова^{1,2}

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург;

²Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина

Экстраклеточные везикулы (ЭВ, экзосомы), секретируемые жировой тканью (ЖТ), могут быть ключевым звеном в механизме, ответственном за развитие патологий, связанных с ожирением. Целью нашего исследования было изучение секреции основных адипокинов ЖТ в составе ЭВ. Образцы подкожной и висцеральной жировой ткани (ПЖТ, ВЖТ) были получены от лиц, страдающих ожирением при плановых операциях на брюшной полости (15 женщин, индекс массы тела >35). Экспланты ПЖТ и ВЖТ культивировали *ex vivo* в течение 12 часов, ЭВ из культуральной среды выделяли методом ультрацентрифугирования. ЭВ сыворотки крови были получены с использованием реагента Total Exosome Isolation Reagent (Thermo Fisher Scientific). Анализ экзосом-специфических маркеров CD63, CD81, а также адипокинов FABP4, адипонектина и оментина-1 был выполнен методом Вестерн-блот. FABP4 ассоциирован с фракцией экзосом сыворотки крови, присутствует во фракциях ЭВ как ПЖТ, так и ВЖТ. Оментин-1 также был связан с фракцией экзосом сыворотки крови, в большей степени представлен в ЭВ ВЖТ по сравнению с ЭВ ПЖТ. ЭВ сыворотки крови и ЖТ содержат преимущественно адипонектин с высокой и средней молекулярной массой. Адипонектин с высокой и средней молекулярной массой, FABP4 и оментин-1 секретируются в составе экзосом ЖТ. *Исследование поддержано грантом РФФИ (а 20-015-00502).*

ОБНАРУЖЕНИЕ ОСОБОГО АНТИГЕНА В ПСОРИАТИЧЕСКИХ СКВАМОЗНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ

Б.Ф. Синецын, К.А. Ефетов

Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь

Связь псориаза с известными микроорганизмами не установлена, а псориатический антиген, носителем которого может оказаться инфекционный агент экзогенного происхождения, до настоящего времени не обнаружен.

В псориатическом эпидермисе созревание эпидермиса не достигает своего завершения, что может оказаться следствием появления в эпидермисе при псориазе ингибитора ферментов, определяющих нормальный ход ороговения эпидермиса. В связи с этим в качестве рабочей гипотезы можно предположить, что при псориазе имеется конкурентный ингибитор ферментов. Для очагов псориатического воспаления характерна интенсивная десквамация. Если предполагаемый возбудитель псориаза находится в сквамозных элементах и поступает в организм здорового человека алиментарным путем, он должен быть устойчив к пепсину. Обнаружение в псориатических сквамозных элементах белка, устойчивого к пепсину, явилось целью данного исследования.

Материалом служили псориатические сквамозные элементы, а также роговой слой эпидермиса здоровых людей. Сквамозные элементы гомогенизировали и центрифугировали при 1500 g в течение 20 минут. Оказавшиеся в осадке структуры сквамозных элементов подвергали гидролизу пепсином для того, чтобы обнаружить устойчивые к этому ферменту антигены. А супернатанты гомогенатов, содержащие антигены, локализующиеся в надосадке, исследовали или в нативном виде, или тоже подвергали гидролизу пепсином. Антигены и их идентичность определяли методом иммунопреципитации в агаре по Оухтерлони с помощью антипсориатической сыворотки, полученной иммунизацией кроликов псориатическими сквамозными элементами.

После обработки пепсином в гидролизатах осадка псориатических сквамозных элементов преципитируются два антигена. Один из этих антигенов (эпидермальный антиген) преципитируется как в пепсиновых гидролизатах осадка, так и в пепсиновых гидролизатах супернатантов и в норме, и при псориазе. Второй антиген преципитируется только в пепсиновых гидролизатах осадка псориатических сквамозных элементов. Это псориатический антиген, устойчивый к пепсину. После абсорбции в антипсориатической сыворотке антител эпидермальным антигеном преципитируется только псориатический антиген, который, возможно, и является вышеупомянутым ингибитором пепсина.

ДЕЙСТВИЕ ИНДУКТОРОВ Nrf2 НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ В КЛЕТКАХ ЭНДОТЕЛИЯ, ВЫЗВАННЫЙ дцРНК

Л.А. Зиновкина¹, Н.Д. Кондратенко¹, Е.С. Егоров¹, Р.А. Зиновкин²

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Опасная для жизни избыточная воспалительная активация эндотелия типична для вирусных инфекций. Данная активация может быть опосредована провоспалительными цитокинами, вирусными белками, а также репликационным интермедиатом вируса (дцРНК). В настоящей работе было исследовано действие искусственного аналога дцРНК, полиинозин-полиуридиновой кислоты (Poly (I:C)) на процесс активации клеток эндотелия. Показано, что трансфекция Poly (I:C) клеток эндотелия вызывает воспалительный ответ, включающий активацию киназ p38 и ERK1/2, а также транскрипционного фактора NF-κB. При этом происходит увеличение транскрипции генов молекул межклеточной адгезии ICAM-1, интерферона IFNβ, а также цитокинов TNFα, IL-1β, IL-6 и IL-8. Такой избыточный воспалительный ответ может быть снижен с помощью активации транскрипционного фактора Nrf2, под контролем которого находятся пути биосинтеза глутатиона, деградации гема, а также множество других мишеней. Протестированные нами индукторы Nrf2, диметилфумарат и сульфорафан, значительно снижали большинство параметров воспалительной активации клеток эндотелия *in vitro*. Также нами было показано, что противовоспалительная активность DMF в нашей модели лишь отчасти связана с его способностью активировать транскрипционный фактор Nrf2. *Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-14-00268.*

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА СУБПОПУЛЯЦИЙ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ

Е.С. Зубкова, К.В. Дергилев, И.Б. Белоглазова, Ю.Д. Молокотина, М.А. Болдырева, З.И. Цоколаева, М.Ю. Меньшиков, Е.В. Парфенова *НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва*

Среди перитонеальных макрофагов мыши, мы выявили две субпопуляции, отличающиеся по размеру клеток. Дальнейшая поляризация макрофагов в провоспалительный (M1) фенотип сопровождается увеличением субпопуляции «малых» клеток, что свидетельствует о возможности межпопуляционного перехода. Базальный уровень аутофагии, оцениваемый нами по интенсивности флуоресценции аутофагосомного зонда CytoID, был примерно одинаков в МФ всех типов и достаточно эффективно подавлялся ингибитором аутофагии 3-метиладенином. Активация аутофагии рапамицином приводила к ослаблению M2-фенотипа в макрофагах, полученных с помощью тиогликолата. 3-Метиладенин снижал экспрессию маркеров поляризации (CD38 и CD206) в группе тиогликолата и в большей степени, чем рапамицин, воздействовал на экспрессию M1-маркера. Активация аутофагии и её ингибирование нивелируют различия в про- и противовоспалительных свойствах поляризованных макрофагов, полученных с помощью тиогликолата, оказывая менее выраженное воздействие на клетки, полученные с помощью конканавалина А. Оценка мембранного потенциала митохондрий (МПП), проведённая с помощью потенциал-чувствительного зонда JC-1, показала, что МФ, получаемые после введения тиогликолата, характеризуются небольшим превышением МПП в M1-фенотипе по сравнению с M2-фенотипом. Это различие усиливалось в присутствии рапамицина и нивелировалось 3-метиладенином. МФ, получаемые после введения Кон А, характеризовались снижением величины МПП в процессе поляризации в M1 и M2 фенотипы, что свидетельствует об их склонности к апоптозу. Этот эффект ослаблялся в присутствии активатора аутофагии. Присутствие 3-метиладенина вызывало усиление МПП в неполяризованных клетках, однако не влияло на состояние митохондрий в МФ с M1 и M2 фенотипом. Мы не обнаружили существенных различий в уровне аутофагии популяций МФ, различающихся по размеру клеток, однако выявленная нами возможность межпопуляционного перехода при поляризации в воспалительный фенотип требует дальнейшего изучения. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 20-015-00405а) и РНФ (грант №19-15-00384).*

ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИТЕЛ К МОДИФИЦИРОВАННЫМ ЛИПОПРОТЕИНАМ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ И ИХ СВЯЗЬ С ВЫРАЖЕННОСТЬЮ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ АТЕРОСКЛЕРОЗА

А.А. Иванова, А.А. Дмитриева

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

Липопротеины низкой плотности (ЛПНП) способны претерпевать различные химические модификации. Модифицируясь, ЛПНП приобретают антигенные свойства. Обнаружение связи уровня антител (АТ) к мЛПНП с выраженностью атеросклероза имеет потенциальную диагностическую и прогностическую значимость. Методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) была изучена специфичность АТ к ЛПНП, модифицированным гипохлоритом (гипохлорит-ЛПНП). Конкурентами выступали как нативные ЛПНП, так и модифицированные малоновым альдегидом (МДА-ЛПНП), уксусным ангидридом (ацет-ЛПНП) и гипохлоритом. Связывание АТ с гипохлорит-ЛПНП ингибировал только соответствующим образом модифицированный белок. Подобное взаимодействие наблюдалось как для АТ класса G, так и класса M. Для проверки гипотезы об иммуногенности изучаемой модификации ЛПНП проводилась иммунизация кроликов аутологичными гипохлорит-ЛПНП. Конкурентным ИФА было показано, что активность кроличьих АТ к гипохлорит-ЛПНП ингибировал только собственный антиген, следовательно, гипохлорит-ЛПНП являются иммуногенными. Также была обнаружена конкуренция между кроличьими и человеческими АТ, направленными к гипохлорит-ЛПНП, что говорит о формировании специфичных антигенных детерминант на гипохлорит-ЛПНП. В работе было обследовано 253 человека. Все пациенты были разделены на три группы: здоровые люди [n=59], пациенты с доклиническим атеросклерозом [n=25] и пациенты с ишемической болезнью сердца (ИБС) [n=169]. Методом ИФА были выявлены уровни АТ, классов G и M, к МДА-ЛПНП, ацет-ЛПНП и гипохлорит-ЛПНП. Было показано, что уровень АТ класса G к МДА-ЛПНП, ацет-ЛПНП и гипохлорит-ЛПНП был достоверно снижен у пациентов с ИБС ($p < 0,001$) по сравнению со здоровыми людьми и пациентами с доклиническим атеросклерозом. Однако у пациентов с ИБС среди АТ класса M ко всем исследуемым модификациям ЛПНП наблюдалось увеличение уровня АТ к ацет-ЛПНП ($p < 0,0001$) и снижению к гипохлорит-ЛПНП ($p < 0,001$). Далее пациенты с ИБС были разделены на две группы в зависимости от тяжести течения заболевания. При сопоставлении уровней АТ к модифицированным ЛПНП было обнаружено достоверное снижение АТ к гипохлорит-ЛПНП класса M в сыворотке у лиц, перенесших инфаркт миокарда по сравнению с пациентами с ИБС без инфаркта миокарда в анамнезе.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ И АНДРОГЕННЫЙ СТАТУС МУЖЧИН С НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ

Е.А. Кузнецова, Е.Е. Есауленко, И.М. Быков (мл.)

Кубанский государственный медицинский университет МЗ РФ, Краснодар

Цель: определить взаимосвязь непрямых маркеров фиброза печени с продукцией сексстероид-связывающего глобулина (СССГ) и уровнем тестостерона у мужчин с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП). Обследованы 125 мужчин от 20 до 50 лет (средний возраст $36,4 \pm 9,5$ лет) с абдоминальным ожирением (окружность талии (ОТ) > 94 см) и признаками НАЖБП по данным УЗИ печени. Пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от наличия и степени фиброза: группа 1 – пациенты с отсутствием фиброза или легким фиброзом (F0-1) – 68 мужчин, группа 2 – пациенты с фиброзом средней или тяжелой степени (F2-3) – 57 мужчин. Контрольную группу составили 30 мужчин, паритетных по возрасту (22 – 50 лет, средний возраст $33,4 \pm 7,2$ лет) с ОТ менее 94 см. В утренних образцах сыворотки определялась концентрация АЛТ, АСТ, α 2-макроглобулина, гаптоглобина, ферритина, общего тестостерона, СССР, инсулина (ИРИ). Определение тестостерона слюны (Тсл) проводилось люминесцентным LIA-методом. Эластография печени проводилась на ультразвуковом аппарате системы Aixplorer (Supersonic Imagine, Франция). Наличие и степень фиброза оценивали по шкале METAVIR. Статистический анализ

проводился с использованием ППП Statistica 12.6 Windows, StatSoft, Inc. Значимость различий исследовалась с помощью критерия Краскела–Уоллиса. Связи между показателями определялись с использованием коэффициента корреляции Спирмена. При сравнении 1 и 2 группы найдены статистически значимые различия концентрации АСТ ($31,8 \pm 8,4$ и $39,5 \pm 9,8$, $p=0,003$), гаптоглобина ($1,5 \pm 0,4$ и $0,3 \pm 0,5$, $p=0,008$), $\alpha 2$ -макроглобулина ($1,19 \pm 0,9$ и $2,34 \pm 0,8$, $p=0,024$) свободного тестостерона слюны ($362,6 \pm 105,2$ и $251,5 \pm 96,4$, $p=0,000$), СССГ ($46,4 \pm 13,2$ и $26,3 \pm 24,7$, $p=0,000$). В обеих группах выявлены статистически значимые отрицательные корреляции между содержанием Тсл и АСТ ($r=-0,6$, $p<0,05$), ИМТ ($r=-0,5$, $p<0,05$), ИРИ ($r=-0,4$, $p<0,05$), уровнем $\alpha 2$ -макроглобулина ($r=-0,5$, $p<0,05$), уровнем СССГ и АСТ ($r=-0,5$, $p<0,05$). С увеличением степени фиброза у мужчин с НАЖБП наблюдается статистически значимое увеличение продукции СССГ в печени и снижение концентрации свободного тестостерона слюны. Уровень свободного тестостерона слюны значительно уменьшается при увеличении концентрации АСТ, гаптоглобина и $\alpha 2$ -макроглобулина.

ВЛИЯНИЕ L-КАРНИТИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ

О.И. Маргиева, И.В. Можаяева

Институт биомедицинских исследований – филиал ФНЦ «Владикавказский научный центр РАН», Владикавказ

Изучение сосудистых осложнений (микроангиопатии) при интоксикации хлоридом никеля является весьма актуальной проблемой. Развивается окислительный стресс, образуются активные формы кислорода, и снижается антиоксидантная защита клеток. Происходит нарушение функции сосудистого эндотелия из-за сниженной продукции оксида азота (NO) эндотелиоцитами, либо нарушения его биодоступности. Принимая во внимание также и нарушение липидного обмена при интоксикации хлоридом никеля было изучено влияние L-карнитина на показатели эндотелиальной функции. В эксперименте на крысах линии Wistar определяли концентрацию малонового диальдегида; состояние АОС оценивали по активности супероксиддисмутазы, каталазы и концентрации церулоплазмينا. Определяли концентрацию общего холестерина, ХС ЛПВП, ХС ЛПНП, ТАГ, а также концентрацию стабильных суммарных конечных метаболитов оксида азота. Установлено возрастание концентрации МДА в гемолизате эритроцитов, снижение активности СОД, увеличение активности каталазы и концентрации церулоплазмينا в сыворотке крови, что является показателем наличия у животных окислительного стресса. Концентрация суммарных метаболитов NO в сыворотке крови снижалась по сравнению с контролем. Исследования в обмене ХС выявили достоверное повышение концентрации общего ХС, ХС ЛПНП и снижение ХС ЛПВП, т.е. гиперхолестеринемия и гипер- β -липопротеинемия являются факторами риска атерогенеза и повреждения эндотелия сосудов. Для коррекции нарушений в системе ПОЛ – АОС и метаболизма NO, как показателей эндотелиальной дисфункции, экспериментальным животным вводили L-карнитин. Данные свидетельствуют о снижении концентрации МДА в крови под влиянием L-карнитина, возрастании активности СОД и снижении активности каталазы и концентрации церулоплазмينا. На фоне введения L-карнитина повысилась концентрация суммарных метаболитов оксида азота в сыворотке крови. Анализ данных показал снижение концентрации общего ХС и ХС ЛПНП и повышение его уровня в ЛПВП. Эти изменения способствовали повышению биодоступности NO, что обеспечивает вазодилатацию. Таким образом, L-карнитин приводил к снижению интенсивности свободно-радикального окисления, угнетению окислительного стресса, что сопровождалось повышением уровня экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), что и явилось причиной увеличения в сыворотке крови суммарных метаболитов NO на фоне лечения L-карнитином. Нормализация обмена холестерина, снижение в сыворотке крови содержания общего холестерина, холестерина ЛПНП и повышение холестерина ЛПВП способствовали повышению биодоступности NO.

МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ NO-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ЭКОПАТОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

И.В. Можаяева, О.И. Маргиева

Институт биомедицинских исследований – филиал ФНЦ «Владикавказский научный центр РАН», Владикавказ

Изучение механизмов негативного влияния тяжелых металлов является весьма актуальной как для фундаментальной, так и клинической медицины. В этом плане рассматривается широко используемый в народном хозяйстве кобальт, ионы которого, воздействуя на железо гемоглобина, способствуют нарушению кислород-транспортной функции эритроцитов, образованию активных метаболитов кислорода (АМК) и активации процесса ПОЛ. Нарушение окислительно-восстановительных реакций сопровождается угнетением NO-образующей функции эндотелия. Наиболее важной причиной этого нарушения является изменение уровня экспрессии и активности эндотелиальной NO-синтазы (NOS-3), создающей физиологический уровень оксида азота (NO). В токсических условиях нарушению NO-продуцирующей функции эндотелия способствует повышение в крови содержания ингибитора экспрессии eNOS – ассиметричного диметиларгинина (АДМА) и дефицит субстрата – L-аргинина (индуктор экспрессии NOS-3). Дефицит L-аргинина и NO – основного вазодилатирующего фактора, сопровождается эндотелиальной дисфункцией в условиях кобальтовой интоксикации и в сочетании с ингибитором эндотелиальной NO-синтазы L-NAME (L-nitro-arginin-methyl-ester-NG аргинин-метилловый эфир). В связи с вышеизложенным целью исследования было изучение особенностей влияния хлорида кобальта и его комплекса с L-NAME на показатели системы ПОЛ – АОС, NO-продуцирующую функцию эндотелия. Для реализации данной цели проводились эксперименты на крысах линии "Wistar" с интоксикацией хлоридом кобальта и его комбинации с L-NAME. Определяли следующие показатели: концентрацию малонового диальдегида, активность каталазы и концентрацию церулоплазмينا, содержание NO и уровень экспрессии эндотелиальной NO-синтазы. Данные показали значительное возрастание в организме оксидантов и угнетение продукции оксида азота. На фоне комбинированного введения хлорида кобальта и L-NAME выявляется ещё большая активация свободно-радикальных реакций, более выраженное ингибирование образования NO, нарушение молекулярной структуры эндотелиальной NO-синтазы и способность энзима продуцировать АМК. Применение же L-аргинина для коррекции выявленных нарушений положительно влияло на метаболические показатели, способные изменять содержание NO и на тонус сосудистой стенки.

ВЛИЯНИЕ 4-МЕТИЛУМБЕЛЛИФЕРОНА НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ АСТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

А.И. Никольская¹, Д.В. Чистяков², М.Г. Сергеева²

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Астроциты, глиальные клетки мозга, играют важную роль в развитии воспалительных ответов в центральной нервной системе (ЦНС). Известно, что высокие концентрации глюкозы индуцируют воспалительные процессы и развитие нейротоксичности, а пациенты с диабетом подвержены риску развития нейродегенеративных заболеваний. Известно, что 4-метилумбеллиферон (4-MU), ингибитор синтеза гиалуроновой кислоты (НА), влияет на воспалительный ответ разных типов клеток и может улучшать гликемический контроль, однако его действие на клетки ЦНС в условиях гипергликемии не изучено. Цель. Сравнить эффекты ингибитора гиалуроновой кислоты 4-MU на воспалительный ответ астроцитов при культивировании клеток в среде с нормальной и повышенной концентрацией глюкозы. Первичные астроциты выделяли из мозга новорожденных крыс. Клетки культивировали 48 часов в среде с нормальной (5,5 мМ) и повышенной (25 мМ) концентрацией глюкозы. Далее клетки инкубировали 30 минут с ингибитором синтеза НА 4-MU (400 мМ) с последующей стимуляцией агонистом TLR4 липополисахаридом (100 ng/ml) в течение 4 или 24 часов. Методом ПЦР в реальном времени оценивалась экспрессия генов маркеров воспаления. Профиль оксипинов определялся методом ВЭЖХ-МС/МС. Концентрация НА в супернатанте и уровни экспрессии белков измерялись методом иммуоферментного анализа. Стимуляция астроцитов LPS приводит к накоплению НА во внеклеточной среде, причем эффект зависит от длительности стимуляции и концентрации глюкозы в среде инкубации. Обработка клеток 4-MU снижает концентрацию НА в супернатанте, эффект зависит от концентрации ингибитора. Показано, что 4-MU снижает LPS-индуцированную экспрессию провоспалительных генов TNF- α , IL-6, повышает экспрессию противовоспалительного гена IL-10 на уровне мРНК и белка, подавляет синтез оксипинов. Уровень экспрессии COX-1 и COX-2 при этом не изменяется. Показано, что в действие 4-MU вовлечен JNK-зависимый сигнальный путь. На уровне клеточного ответа астроцитов обнаружена противовоспалительная активность 4-MU. Это позволяет оценить ингибитор 4-MU как перспективный препарат для лечения заболеваний ЦНС, сопровождаемых развитием воспалительных процессов в условиях гипергликемии. *Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 20-74-00068.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИФЕНИЛФОСФОНИЯ НА Fc ϵ RI-ЗАВИСИМУЮ ДЕГРАДУЛЯЦИЮ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

А.Н. Павлюченкова, М.А. Челомбитко, И.И. Галкин

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

Ключевую роль в развитии аллергических заболеваний играют тучные клетки (ТК). Основной путь активации ТК при аллергии осуществляется Fc ϵ RI-зависимым путем, в результате чего ТК дегранулируют и синтезируют цитокины и эйкозаноиды. Известно, что аллергическая стимуляция ТК сопровождается дроблением митохондрий и их перемещением к местам экзцитоза гранул. В частности, имеются данные о взаимосвязи фрагментации митохондрий с митохондриальными активными формами кислорода (мтАФК). Мы предположили, что снижение продукции мтАФК может уменьшать антиген-зависимую активацию ТК путем ингибирования фрагментации митохондрий. Также известно, что производные трифенилфосфония — 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний (SkQ1) и додецилтрифенилфосфоний (C12TPP) в низких концентрациях могут вызывать эффект мягкого разобщения, оказывающего регуляторное воздействие на различные сигнальные каскады и снижающего продукцию мтАФК. В данной работе исследовали влияние SkQ1 и C12TPP на Fc ϵ RI-зависимую дегрануляцию клеток линии базофильной лейкемии крыс RBL-2H3, широко используемых в качестве модели дегрануляции тучных клеток. Инкубация клеток с производными трифенилфосфония в концентрациях 0,2 и 2 нМ в течение 72 часов приводила к снижению уровня дегрануляции на 20-30%. Дегрануляция клеток сопровождалась фрагментацией митохондрий, а также снижением мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$), уровня мтАФК и митохондриальной АТФ (мтАТФ). SkQ1 и C12TPP предотвращали фрагментацию митохондрий, но не влияли на $\Delta\Psi_m$ и уровень мтАФК и мтАТФ. При этом SkQ1 и C12TPP предотвращали активацию киназы Erk1/2, играющую важную роль как в активации ТК, так и в экзцитозе и фрагментации митохондрий. Таким образом, полученные результаты могут свидетельствовать об ингибировании Fc ϵ RI-зависимой дегрануляции ТК путем предотвращения фрагментации митохондрий под действием SkQ1 и C12TPP. Это может быть связано с влиянием этих веществ на регуляцию Erk1/2-сигнального пути, однако требуются дополнительные исследования для подтверждения данной гипотезы. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и МНТИ в рамках научного проекта № 19-54-06003 и РНФ № 20-14-00268.*

ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СРЕДСТВ ПРООКСИДАНТНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ

К.А. Попов, И.М. Быков, Е.С. Устинова, И.Ю. Цымбалюк, А.Н. Столярова, Я.Е. Денисова, Э.А. Азимов

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

В развитии протективных эффектов ишемического или фармакологического preconditionирования играют роль различные сигнальные пути, опосредованно реализуемые в том числе с помощью свободных радикалов. Активные формы кислорода и другие реактивные частицы в зависимости от условий и концентрации участвуют и в запуске защитных механизмов, и в реализации основных механизмов повреждения, особенно в период реперфузии. Считается, что задача фармакологического preconditionирования имитировать эффекты ишемического preconditionирования. С учетом этих представлений вызывает интерес возможность введения прооксидантов или окислителей с целью метаболической профилактики ишемически-реперфузионных повреждений. Нами было показано, что предварительное введение 1 мл 0,1-0,5% раствора гидроперекиси трет-бутила (ГПТБ) внутривенно крысам за сутки до моделирования 20-ти минутной сосудистой изоляции

печени, способствует статистически значимому снижению маркеров цитолиза гепатоцитов в плазме крови. В исследовании использовали белых нелинейных крыс-самцов массой 200-250 грамм по 15 особей в каждой группе: контрольная (интактные животные), группа сравнения (с моделированием ишемии-реперфузии без коррекции) и 4 опытные группы, животным которых вводили приготовленный на физиологическом растворе 1 мл ГПТБ в концентрации 0,01%, 0,1%, 0,5% и 1%. Кровь для исследований забирали через 3 часа после восстановления кровотока в печени (снятие зажима с аналога гепатодуоденальной связки). В результате было показано, что протективный эффект оказывают 0,1% и 0,5% растворы, что характеризуется снижением активности АЛТ, АСТ и ЛДГ в плазме крови на 30-50%. Введение 1 мл 0,01% раствора сопровождалось такими же как в группе сравнения значениями маркеров цитолитического синдрома, а увеличение концентрации выше 1% не только не имело протективного действия, но и оказывало дополнительный повреждающий эффект. Результаты исследования подтвердили гипотезу о возможности прооксидантного прекодиционирования ишемически-реперфузионного повреждения печени крыс.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИРОДНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ: ПОИСК БИСПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АКТИВНОСТИ

С.Е. Седых, С.В. Баранова, А.М. Тимофеева, Г.А. Невинский

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

В процессе развития ВИЧ-инфекции у некоторых пациентов развиваются симптомы, характерные для аутоиммунных патологий. Такие процессы, затрагивающие нервную систему, играют важную роль в патогенезе системной красной волчанки (СКВ) и рассеянного склероза (РС). В крови пациентов с этими заболеваниями нами описаны биспецифичные антитела, гидролизующие основной белок миелина и олигодендроглиальный пептид. Данная работа направлена на изучение каталитических активностей природных биспецифичных антител крови больных ВИЧ/СПИД. Нельзя исключить, что такие природные антитела принимают активное участие в патогенезе ВИЧ-инфекции и могут объяснять симптомы, характерные для аутоиммунных процессов при ВИЧ/СПИД. Мы показали, что сыворотки крови больных ВИЧ/СПИД содержат аутоантитела против гистонов и основного белка миелина. Определено содержание биспецифичных каталитически активных антител в крови больных ВИЧ/СПИД. Проведено сравнение содержания таких антител в норме, при аутоиммунной и вирусной патологии. Полученные результаты показывают на сходство патологических процессов при аутоиммунных заболеваниях – РС и СКВ и при ВИЧ/СПИД. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-70115.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ АНЕМИИ

М.О. Куприянова, И.В. Сюсин, В.В. Ревин

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Факультет биотехнологии и биологии, Саранск

Известно, что при развитии анемии происходит понижение уровня эритроцитов что приводит к ухудшению поступления кислорода в ткани и возникает кислородное голодание тканей. Такой характер нарушений функций эритроцитов может привести к изменениям не только содержания гемоглобина, но и изменениям морфометрических характеристик красных клеток крови. В этой связи одной из важнейших задач является поиск новых способов восстановления структуры и функций эритроцитов. Одним из перспективных направлений поиска веществ, которые способны защитить организм и клетку в целом являются вещества фенольной природы. В настоящее время растения служат источником получения более трети всех лекарственных препаратов различного спектра действия. В связи с этим целью данной работы являлось исследование действия экстракта болиголова пятнистого (*Conium maculatum* L.) на морфометрические характеристики эритроцитов крови больных анемией. Морфометрические характеристики анализировались с помощью метода лазерной интерференционной микроскопии. У больных с анемией наблюдалось уменьшение площади фазового изображения эритроцита на 25 % по отношению к контрольному значению. После добавления экстракта болиголова площадь фазового изображения эритроцита увеличилась на 27%, что приблизило показатель к уровню нормы. Было зарегистрировано изменение оптической разности хода (ОРХ) у больных анемией, его значение было на 18,3% больше контрольного показателя. После добавления экстракта болиголова значение ОРХ при анемии стало на 17,9 % меньше значения ОРХ пробы без добавления экстракта, что сравнимо с контрольным значением. Для анемии характерно развитие гипоксии, у эритроцита, находящегося в таком состоянии, происходит увеличение пассивной проницаемости для ионов, в особенности калия и натрия, в результате чего нарушается осмотический баланс, резко снижается количество АТФ в клетке, происходит ингибирование мембранных АТФаз, что в конечном счете приводит к выходу ионов K^+ и Cl^- из клетки и как следствие уменьшение площади. Полученные нами результаты свидетельствуют о положительном влиянии физиологически активных веществ на морфометрические показатели эритроцитов, которые содержались в экстракте болиголова.

ПОИСК ОПТИМАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВОСПАЛЕНИЯ

И.С. Татарникова, Я.Ю. Староселец, А.В. Марков, Е.Б. Логашенко

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Воспаление лежит в основе патогенеза многих хронических заболеваний. Имеются данные о взаимосвязи между воспалением, иммуносупрессией и онкотрансформацией. Именно поэтому для создания средств терапевтического воздействия на развитие онкологического процесса представляет интерес поиск новых молекулярных мишеней, вовлеченных в развитие и поддержание воспаления. На основе литературных данных и проведенного биоинформатического анализа выбран ряд генов, предположительно связанных с воспалением: C3, ZNF 28, Irf 8, Serpin 3a, TREM 2, DAP 12, ADAM 8, TIMP 1, IL-6, TNF- α .

Для валидации значимости экспрессии данных генов при воспалении необходимо было провести поиск оптимальной клеточной модели воспаления. Были выбраны три клеточные линии мыши: RAW 264.7 (макрофаги), L929 (фибробласты), Нера 1-6 (карцинома печени). Для индукции воспалительного ответа клетки инкубировали в присутствии LPS (1 мкг/мл), а затем анализировали экспрессию выбранных генов методом ПЦР в реальном времени в различных временных точках от 3 до 24 ч. Для подтверждения воспалительного ответа измеряли уровни экспрессии интерлейкина-6 (IL-6) и фактора некроза опухоли (TNF- α). Оказалось, что клетки L929 не отвечают на провоспалительные стимулы (обработка LPS), так как в этих клетках не происходит повышения ни IL-6, ни TNF- α . Таким образом, линия клеток L929 не подходит для создания модели воспаления. В клетках RAW 264.7 в ответ на инкубацию с LPS наблюдалось изменение экспрессии гена TIMP1 от 2 до 130 раз с пиком в точке 20 ч. При этом происходило повышение экспрессии IL-6 от 3 до 628 раз, максимально в точке 20 часов. Таким образом, клетки RAW 264.7 являются перспективной клеточной моделью воспаления, а потенциальной мишенью можно рассматривать ген TIMP1. На клетках Нера 1-6 показано изменение экспрессии гена С3 во всех временных точках, с максимальным увеличением в 10-25 раз в точке 20 ч. Кроме того в этих клетках наблюдалось повышение экспрессии генов Zfp281, Irf8, Serpina3a, Timp1 преимущественно в точках 9, 16, 20 ч. Таким образом, клетки Нера 1-6 являются также перспективной клеточной моделью воспаления, а гены С3, Zfp281, Irf8, Serpina3a, TIMP1 выступают потенциальными мишенями. *Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-74-30011.*

УВЕЛИЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ Na⁺ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ИОННОГО ТРАНСПОРТА И ЭКСПРЕССИИ Na⁺/K⁺-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ ЭНДОТЕЛИЯ

Д.А. Федоров, Е.А. Климанова, С.В. Сидоренко, О.В. Букач, А.М. Тверской, О.Д. Лопина *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Саранск*

Повышенное потребление NaCl вызывает эндотелиальную дисфункцию – состояние, характеризующееся сужением сосудов и воспалением. Механизмы развития дисфункции не ясны. Концентрация Na⁺ в крови строго контролируется, изменяясь не более чем на 10%. Изменения этого параметра влияют на транспорт ионов через мембрану клеток эндотелия, что в свою очередь воздействует на транскрипцию генов. Показано, что повышение внутриклеточной концентрации Na⁺ вследствие ингибирования Na,K-АТФазы (NKA) или уменьшения объема клеток эндотелия пупочной вены человека (HUVES) увеличивает экспрессию генов раннего ответа (FOS, EGR1, ATF3, ZFP36 и JUN), а также провоспалительных генов COX2, IL1LR1 и IL6. Транскрипция этих генов не зависит от изменения концентрации Ca²⁺. Поэтому развитие эндотелиальной дисфункции может быть вызвано изменением транскрипции Na⁺/K⁺-чувствительных генов в результате изменения транспорта одновалентных ионов.

HUVES инкубировали в ростовой среде, содержащей дополнительно 15 мМ NaCl. При инкубации клеток в течение 1 ч содержание Na⁺ в клетках снижалось. Одновременно происходило увеличение входа Rb⁺ в клетку (через 1 и 3 ч). Эти эффекты свидетельствуют об увеличении активности NKA, активность которой зависит от других Na-транспортирующих систем, в частности, от эпителиальных амилорид-чувствительных Na-каналов (ENaC). Мы не наблюдали ни уменьшения содержания Na⁺ в клетке, ни повышения входа Rb⁺ при ингибировании ENaC амилоридом (1 мкМ). Ингибирование NKA убаином в течение 3 ч при увеличении внеклеточной концентрации NaCl на 15 мМ вызывало увеличение внутриклеточного содержания Na⁺ и снижение внутриклеточного содержания K⁺. Этот эффект устранялся при инкубации клеток одновременно с амилоридом и убаином. Таким образом, результаты ингибиторного анализа подтверждают участие ENaC и NKA в изменении транспорта одновалентных катионов в ответ на изменение концентрации Na⁺ во внеклеточной среде. Далее мы оценили транскрипцию генов FOS, eNOS, COX2, IL1LR1 и IL6 в клетках и обнаружили, что увеличение внеклеточной концентрации Na⁺ на 15 мМ приводило к уменьшению экспрессии провоспалительных генов COX2, IL1LR1 и IL6 после 3-24 ч инкубации. Увеличение осмолярности среды маннитолом (на 30 мОсм) не изменяло ионный транспорт и экспрессию этих генов. *Поддержано грантом РНФ №19-75-10009.*

ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ АСТРОЦИТОВ ПРИ АКТИВАЦИИ TLR3 И TLR4 РЕЦЕПТОРОВ

Д.В. Чистяков¹, В.О. Горбатенко², М.Г. Сергеева¹ *¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и ²Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Воспаление является важнейшим фактором развития различных патологий центральной нервной системы. В последнее время исследователи уделяют особое внимание астроцитам – глиальным клеткам мозга в контексте изучения регуляции воспаления. Известно, что пациенты с диабетом имеют повышенные шансы развития нейродегенеративных заболеваний. Метформин – препарат для лечения сахарного диабета второго типа, активатор АМФ-активируемой протеинкиназы. Известно, что метформин обладает выраженными противовоспалительными эффектами при нейровоспалении *in vivo*, однако его действие на глиальные клетки мозга не изучены. Цель: оценить влияние метформина, активатора 5'АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК), на TLR-стимулированные воспалительные ответы астроцитов. Культуру обогащенную первичными астроцитами выделяли из мозга новорожденных крысят. Перед проведением эксперимента клетки инкубировали 24 часа с метформин (2,5 мМ) с последующей стимуляцией агонистом TLR4 липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл) или агонистом TLR3 Poly:IC (PIC, 25 мкг/мл) в течение 4 или 6 часов соответственно. Методом qPCR оценивали экспрессию генов маркеров воспаления. Профиль оксипиринов определяли методом ВЭЖХ-МС/МС. Активацию элементов внутриклеточного сигнального каскада (фосфо/тотальный белок) АМПК, MAPK p38, JNK, ERK, NF- κ B, STAT3 оценивали методом иммуноблоттинга. Обработка культуры астроглиальных клеток метформин приводит к снижению уровня экспрессии генов маркеров воспаления (интерлейкина IL-1beta, IL-6) в LPS-стимулированных клетках и (IL-1beta, IL-6 и iNOS) в PIC-стимулированных клетках. Метформин снижает активность NF- κ B и STAT3 при активации TLR3 и TLR4 рецепторов. Впервые показано, что метформин снижает синтез оксипиринов на клетках, стимулированных LPS и PIC, действуя наиболее эффективно на выброс

простагландина D2 и тромбоксана B2. На уровне клеток первичной астроглиальной культуры показано, что метформин обладает противовоспалительной активностью, оказывая действие на уровне экспрессии различных цитокинов и на уровне синтеза оксипинолов. При этом эффект метформина сохраняется при активации и TLR3, и TLR4 рецепторов. *Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-74-00068.*

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКТОРА АЛИМЕНТАРНО-ТОКСИЧЕСКОЙ ПАРОКСИЗМАЛЬНОЙ МИОГЛОБИНУРИИ

Е.П. Калинин, Н.Н. Буслаева

Тюменский государственный медицинский университет МЗ РФ, кафедра биологической химии, Тюмень

Алиментарно-токсическая пароксизмальная миоглобинурия (МКБ-10, Diseases DB) является токсикозом, развивающимся при употреблении в пищу рыбы или представителей подтипа Ракообразных. Это заболевание впервые описано в 1924 году и после этого фиксировались многочисленные случаи вспышек заболевания в разных странах без связи с регионом или климатической зоной. В 2019-2021 годах в Тюменской области также было зарегистрировано несколько подобных эпизодов.

Исследования, посвященные изучению данного заболевания в Бразилии, Китае и странах Европы, не позволили получить сведения о природе токсина, однако данные исследования исключили факт принадлежности токсина к уже известным группам токсических соединений (например, соли тяжелых металлов, низкомолекулярные токсические соединения, включая алкалоиды наземных и водных растений, а также - экзотические для пресноводных водоемов соединения - такие, как палитоксин). Существующие данные позволяют предполагать липидную природу токсина на основании того, что фракция растворимых в гексане веществ вызвала симптомы, аналогичные симптомам, возникающих при моделировании заражения у лабораторных мышей. Также выдвигались предположения о тиаминазной активности, присущей токсину. Принято считать синие-зеленые водоросли источником токсических соединений, они генерируют или накапливают токсин. Рыбы и ракообразные, обитающие в зараженном водоеме, являются источником токсина для человека, но, по-видимому, они только депонируют токсин. Ввиду того что природа токсина не установлена, а способа его выявления нет, пациентам проводится симптоматическое лечение, направленное на ускоренную экскрецию продуктов рабдомиолиза.

На наш взгляд, есть вероятность принадлежности токсина к циклическим липофильным соединениям. По нашим данным, такие соединения могут быть получены из иловых донных отложений (сапропелей), и, несмотря на низкую растворимость в полярных растворителях, способны к образованию комплексов с белками, модулируя их биологическую активность.

Лаборатория кафедры биологической химии Тюменского ГМУ предлагает собственную методику выделения токсина, вызывающего алиментарно-токсическую пароксизмальную миоглобинурию, на основе этой гипотезы.

РОЛЬ LAM БЕЛКОВ ПЕРЕНОСЧИКОВ СТЕРИНОВ В ПОЛОВОМ ПРОЦЕССЕ И СПОРУЛЯЦИИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

С.С. Соколов¹, К.В. Галкина¹, Е.А. Литвинова², Е.А. Бартыш³, Ф.Ф. Северин¹, Д.А. Кнорре¹

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского; ²Биологический факультет и ³Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Стерины синтезируются в эндоплазматическом ретикулеуме (ЭР), откуда транспортируются во все остальные органеллы. Транспорт стерина осуществляется неvesикулярно двумя семействами белков Lam и Osh. Белки Osh имеют цитоплазматическую локализацию и способны транспортировать стерин против градиента концентрации, обменивая их на фосфатидилинозитол-4-фосфат. Белки Lam С-концом закорены в ЭР и, по-видимому, обменивают стерин по градиенту концентрации. Белки Lam1-Lam4 локализованы в местах контакта ЭР с плазматической мембраной (ПМ). Скорость транспорта стерина между ЭР и ПМ высока, она более чем в 10 раз превышает расчетную величину скорости пополнения стеринового пула ПМ, необходимую для пролиферации. Однако функция неvesикулярного транспорта стерина остается до сих пор неясной, а фенотипы штаммов с делециями генов LAM проявляются только в условиях сильных стрессов. Поэтому мы решили исследовать проявления нарушений генов LAM при ответе на половой феромон и споруляции дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — процессы, сопряженные со значительными перестройками мембранных органелл. Мы показали, что делеция LAM2 частично предотвращает гибель клеток дрожжей лабораторного штамма W303, вызванную половым феромоном. При этом делеция трех других генов LAM1, LAM3 и LAM4 — дополнительно не увеличивала этот эффект. Мутация в гене транскрипционного фактора UPC2, приводящая к избыточному накоплению стерина в клетке (UPC2-1), приводила к увеличению выживаемости клеток в присутствии α -фактора и проявляла аддитивность с делецией LAM2. Было показано, что нарушение генов LAM приводит к снижению эффективности спорообразования дрожжей *S. cerevisiae*. Диплоидные клетки гомозиготные по делеции генов LAM1-LAM4 оказались неспособны образовывать полные аски с 4 спорами. Мы обсуждаем механизмы участия Lam белков во внутриклеточном перераспределении стерина между формирующимися мембранами при формировании спор и разрушение мембран материнской клетки. *Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №18-14-00151.*

ОЦЕНКА ОБЩЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ С СОМАТИЧЕСКИМИ И СТОМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Н.И. Быкова, С.Г. Губаз, И.А. Севостьянов, О.В. Дьяков, А.Г. Завгородняя

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

В работе проанализированы трудности интерпретации результатов исследования окислительного гомеостаза ротовой жидкости. Изменения общей антиоксидантной активности смешанной слюны могут быть разнонаправленными — может фиксироваться увеличение или снижение данного показателя. Нами была исследована антиоксидантная активность ротовой

жидкости больных флегмонами челюстно-лицевой области (1 группа), с частичным отсутствием 3-4 зубов (2 группа), сахарным диабетом 2 типа (3 группа) и воспалительными заболеваниями органов малого таза (4 группа). Результаты были сравнены с данными относительно здоровых испытуемых лиц (контрольная группа). В результате проведенных исследований было показано, что снижение общей антиоксидантной активности ротовой жидкости на 54-50% характерно для хронических длительно текущих соматических заболеваний системного характера с выраженным нарушением обмена веществ, таких как сахарный диабет 2 типа. Не изменялось значение показателя ротовой жидкости на фоне соматических заболеваний, имеющих ограниченное распространение, не затрагивающее ткани челюстно-лицевой области. В нашем случае таким примером была хроническая воспалительная болезнь матки с сочетанным течением двустороннего сальпингоофорита. Увеличение общей антиоксидантной активности ротовой жидкости на 35-45% было характерно для заболеваний стоматологического профиля. Это связано с поражением тканей полости рта, при которых может провоцировать вымывание клеточного содержания ротовой полости. В качестве примера такой ситуации можно привести больных флегмонами челюстно-лицевой области или больных с частичным отсутствием зубов. Таким образом, были получены разные результаты на фоне развития соматических и стоматологических заболеваний, что свидетельствует о необходимости в разной ситуации по-разному интерпретировать результаты оценки антиоксидантной активности.

ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДООПЕРАЦИОННЫХ УРОВНЕЙ АМИНОТЕРМИНАЛЬНОГО ФРАГМЕНТА МОЗГОВОГО НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА В СОЧЕТАНИИ С НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ МИТРАЛЬНОГО КЛАПАНА

О.В. Петрова^{1,2}, Д.М. Никулина², С.А. Шашин², Д.Г. Тарасов^{1,2}

¹Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии; ² Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань

Несмотря на достигнутые успехи в лечении осложненных форм ишемической болезни сердца сохраняется высокая летальность, в первую очередь за счет развития сердечно-сосудистых осложнений. В литературе имеются данные о прогностическом значении дооперационных уровней аминотерминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида. Цель. Изучить значение дооперационных уровней аминотерминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида в оценке риска развития послеоперационных сердечно-сосудистых осложнений у больных с ишемической болезнью сердца в сочетании с недостаточностью митрального клапана. Дооперационные уровни пептида определяли на анализаторе «Cobas e 411» (Roche Diagnostics, Германия). Результаты исследования обработали с помощью пакета «Statistics 6 for Windows» и ROC – анализа. Дооперационные уровни пептида в сыворотке крови больных при поступлении варьировали от 385,8 до 6624 пг/мл и в среднем составили 2010,51±440,17 пг/мл. У 35 пациентов послеоперационный период без осложнений, в отделении реанимации пациенты в среднем находились 18,83±1,81 часов, были выписаны из стационара на 10 суток. Дооперационные уровни пептида в среднем составили 831,95±90,98 пг/мл (от 479 до 1132 пг/мл). У 10 пациентов послеоперационный период осложнился нарушением сердечного ритма, потребовалась инотропная терапия. В отделении реанимации пациенты в среднем находились 49,0±6,67 час, были выписаны из стационара в среднем на 14 суток. Дооперационные уровни пептида в среднем составили 1922,25±204,07 пг/мл (от 1136 до 3490 пг/мл). У 5 пациентов послеоперационный период осложнился острой сердечно-сосудистой недостаточностью, потребовалась инотропная терапия. В отделении реанимации пациенты в среднем находились 208,63±46,21 часа, пациенты были выписаны из стационара в среднем на 16 суток. Дооперационные уровни пептида в среднем составили 4779,02±367,01 пг/мл (от 3322 до 5554 пг/мл). Высокие дооперационные уровни пептида коррелировали с развитием сердечно-сосудистых осложнений. Значение cut off пептида составило 1300 пг/мл. Выводы. Больные с дооперационными уровнями аминотерминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида выше 1300 пг/мл имеют высокий риск развития сердечно-сосудистых осложнений

ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У БОЛЬНЫХ ЭНДОМЕТРИОЗОМ НА ФОНЕ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ

И.М. Быков, Ю.В. Грушевская, Т.Г. Мелконьянц, В.А. Крутова

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

Патогенез эндометриоза включает множество патобиохимических и иммунологических факторов, общепризнана на сегодня роль свободнорадикальной патологии, включающей интенсификацию генерации радикальных частиц и реактивных молекул, а также снижение защитного потенциала антиоксидантной системы. Нарушение нормальных регулярных менструаций у женщин с эндометриозом является важным фактором, способствующим развитию железодефицитной анемии вследствие увеличенной кровопотери. При этом нарушение нормального транспорта кислорода и оксигенации тканей при гипоксии дополнительно способствуют интенсификации окислительных нарушений. Поэтому целью нашего исследования была оценка изменений маркеров состояния системы антиоксидантной защиты у больных эндометриозом на фоне железодефицитной анемии легкой и средней степени тяжести. Исследование проведено с участием 20 относительно здоровых испытуемых лиц женского пола, составивших контрольную группу, и 45 больных эндометриозом тела матки, разделенных на 3 группы по 15 испытуемых лиц: с эндометриозом без анемии (2 группа), с анемией легкой (3 группа) и средней (4 группа) степени тяжести. В ходе проведения исследования было установлено, что прослеживается четкая зависимость лабораторных проявлений окислительного стресса от выраженности анемии. У больных всех 3-й групп была снижена общая антиоксидантная активность плазмы крови относительно контрольных цифр. Однако у больных 2-й группы этот показатель был снижен на 15%, тогда как на фоне анемии снижение значения анализируемого показателя достигало 25% в 3-й группе и 43% в 4-й группе. Аналогичные тенденции отмечены и для показателей тиолового метаболизма таких как уровень тиоловых групп плазмы крови, содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах, а также для концентрации продуктов окислитель-

ных модификаций липидов и белков. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости дифференцированного подхода к лабораторной диагностике и проведению антиоксидантной коррекции метаболических нарушений у больных энзимопатией тела матки.

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРА ИЗАТИНА НА ПРОФИЛЬ Rpn10- И Rpn13-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА ПРИ МФТП-ИНДУЦИРОВАННОМ ПАРКИНСОНИЗМЕ

О.А. Бунеева¹, А.Т. Копылов¹, И.Г. Капица², Е.А. Иванова², А.Е. Медведев¹

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ²Институт фармакологии им. В.В. Закусова, Москва

Развитие болезни Паркинсона (БП) в значительной степени обусловлено дисфункцией митохондрий и сбоями в работе убиквитин-протеасомной системы (UPS). Субъединицы Rpn10 и Rpn13 – основные убиквитиновые рецепторы регуляторной субчастицы протеасомы (19S) – играют решающую роль в связывании белков, подлежащих деградации, и направлении их в протеолитическую коровую часть протеасомы (20S). Исследовали изменение протеомных профилей Rpn10- и Rpn13-связывающих белков митохондрий мозга мышей в экспериментальной модели БП, индуцированной введением нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП). Введение МФТП вызывало у мышей свойственные БП двигательные нарушения, а предварительная инъекция нейропротектора изатина (индол-2,3-диона) ослабляла их выраженность. МФТП и изатин по-разному влияли на число и состав Rpn10- и Rpn13-связывающих белков мозга. Введение МФТП практически не отражалось на числе белков, связывающихся с Rpn10 (51 против 48 в контроле), но значительно снижало число Rpn13-связывающих белков (35 против 60 в контроле). Профили Rpn10- и Rpn13-связывающих белков при введении МФТП существенно изменялись. В первом случае практически полностью исчезали белки цитоскелета и реципрокно возрастало число антиоксидантных белков. В случае Rpn13-связывающих белков при введении МФТП, наряду с уменьшением числа белков цитоскелета, значительно уменьшалось количество белков регуляции экспрессии генов, антиоксидантных белков и белков передачи сигнала и регуляции активности ферментов. Введение изатина как перед введением МФТП, так и без МФТП приводило к заметному уменьшению числа Rpn10-связывающих белков (до 26 и 31 соответственно) и к качественному изменению протеомного профиля. В случае Rpn13-связывающих белков отмечено существенное увеличение общего числа идентифицированных белков (до 84 и 90) преимущественно за счет функциональной группы метаболических ферментов, а также белков экспрессии генов. Полученные результаты позволяют заключить, что в условиях МФТП-индуцированного паркинсонизма нейропротекторное действие изатина может быть направлено на взаимодействие митохондрий с компонентами UPS. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00073а.

ПРОЦЕССЫ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ И ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ В НЕЙРОНАХ И АСТРОЦИТАХ ПЕНУМБРЫ ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

С.В. Демьяненко, А.Б. Узденский Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии, лаборатория молекулярной нейробиологии, Ростов-на-Дону

В первые 24 часа после локального фототромботического инсульта (ФТИ) у крыс в нейронах пенумбры снижался уровень ацетилирования гистона H3 по лизину 9 (acH3K9), что могло приводить к снижению белкового синтеза в них. Снижение ацетилирования гистонов в ядрах нейронов после ишемии, было обусловлено увеличением экспрессии HDAC1 и особенно HDAC2, а также переходом HDAC6 из цитоплазмы в ядра нейронов. С ростом уровня HDAC2 была связана апоптотическая гибель клеток пенумбры после ФТИ. В астроцитах в этот период напротив отмечено повышение уровня acH3K9 несмотря на рост HDAC2 и HDAC6 в ядрах что, вероятно, было связано с увеличением экспрессии гистонацетилтрансфераз NAT1 и PCAF. В ранний восстановительный период после ФТИ (с 3 по 21 день) в ядрах нейронов наблюдалось повышение уровня гистондеацетилазы HDAC2 и HDAC6. Однако, ацетилирование гистона H4 оставалось высоким, вероятно, за счет снижения уровня ядерной формы HDAC4 и транслокации HDAC1 в цитоплазму клеток в эти сроки. В цитоплазме нейронов наблюдается рост HDAC8, SIRT1 и SIRT2. Однако если SIRT1 и SIRT6, вероятно, участвуют в регуляции синаптогенеза и аксоногенеза, то SIRT2, снижая ацетилирование тубулина, препятствует восстановлению нарушенных нейрональных связей. В астроцитах в репаративный период изменения были менее выражены, чем в первые сутки после инсульта. Таким образом переход HDAC1, HDAC8, SIRT1 и SIRT2 в цитоплазму клеток мог быть связан с сигнальными функциями, но не с регуляцией транскрипции. Идентификация цитоплазматических белков, являющихся субстратами цитоплазматических форм деацетилазы гистонов, задача будущих исследований. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00188.

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ IgG БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ОКСИДОРЕДУКТАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Е.В. Епимахова, Д.А. Паршукова, Д.В. Казанцева, А.Р. Васильева, Л.П. Смирнова

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск

Окислительный стресс лежит в основе этиологических и патогенетических факторов развития шизофрении. Ранее выявлена каталазная активность IgG больных шизофренией. Но участие этой активности в патогенезе шизофрении – не определено. Одна из гипотез, предполагает проникновение каталитических антител, через поврежденный ГЭБ в головной мозг больных. Для ее проверки применялась экспериментальная модель, основанная на оценке показателей жизнеспособности клеточной культуры на модели глиобластомы человека в присутствии IgG больных. IgG выделены из сыворотки крови 76 пациентов больных шизофренией и 13 здоровых добровольцев методом аффинной хроматографии на колонках с ProteinG-Sepharose. Каталазную активность определяли по методу Beers, 1976. СОД активность определяли по методике, предложенной Смирновой Л.П. в 2006. Реакции регистрировались на СФ Lambda650 (PerkinElmer). Жизнеспособность оценивали на

клеточной линии глиобластомы человека U87. Клетки культивировали с IgG (конечная концентрация антител 0,2 мг/мл.) в течение 72 часов при 37°C и 5% CO₂ в среде DMEM, далее окрашивали флюоресцентными красителями пропидием йодида и Hoechst и детектировали на платформе CellInsight CX7 (ThermoFisher Scientific). С помощью трех стандартных жестких критериев было доказано, что изучаемые активности являются собственным свойством АТ. Каталазная активность IgG, выделенных из сыворотки крови пациентов, больных шизофренией оказалась достоверно снижена по сравнению со здоровыми лицами ($p=0,023$). В свою очередь СОД активность IgG больных шизофренией в несколько раз превышала значения у здоровых людей ($p=0,013$). При этом, значимых различий по уровню жизнеспособности при культивировании глиобластомы с антителами больных шизофренией и здоровых доноров не выявлено (1, 57 (1,46–1,95)% и 1, 54 (1,34–1,69)% соответственно). Значимые различия оксидоредуктазных активностей IgG больных шизофренией в сравнении со здоровыми лицами, говорят о непосредственном участии иммунной системы в реализации эффектов ОС в патогенезе шизофрении. Необходимо дальнейшее исследование свойств этих абзимов для выявления механизма их действия и биологического значения. *Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ. Работа подержана грантом РФФИ №18-15-00053.*

РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В ТКАНЯХ МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Э.В. Кисель¹, Г. Берекетеа¹, Б. Агустинус¹, К.А. Антонова^{1,2}, Н. Аленина³, Л.А. Вессейоханн¹, Р.Р. Гайнетдинов², А. Фролов^{1,2} ¹Лейбниц-Институт биохимии растений, Халле (Заале), Германия; ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; ³Центр молекулярной медицины им. Макса Дельбрюка, Берлин, Германия

Следовые амины – соединения, структурно сходные с нейромедиаторами из класса моноаминов, однако присутствующие в мозге млекопитающих в значительно меньших количествах. Они способны избирательно связываться рецепторами, ассоциированными со следовыми аминами (англ. trace amine-associated receptors, TAAR), и оказывать модулирующее действие на прочие нейромедиаторные системы. Существуют данные о роли TAAR в патогенезе широкого спектра заболеваний, таких как шизофрения, тревожное расстройство, депрессия, нейродегенеративные заболевания и нарушения сна. В течение последних десятилетий было разработано множество методов определения содержания моноаминов, основанных на флуоресцентной, электрохимической и масс-спектрометрической детекции в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Однако, эффективный и высокочувствительный метод для количественного анализа следовых аминов в мозге, позволяющий работать с малым количеством биологического материала, по-прежнему отсутствует. Поэтому, целью данного исследования являлась разработка метода количественного анализа моноаминов, их основных метаболитов и ряда следовых аминов в одном образце. В соответствии с этим, биогенные амины были экстрагированы из мозга путем обработки 0,1 моль/л водным раствором хлорной кислоты с последующей ультразвуковой гомогенизацией. Полученные экстракты были разделены на три неравноценные части: метаболиты моноаминов были проанализированы непосредственно после экстракции, моноамины были дериватизированы диэтилэтоксиметиленмалонатом (DEEMM), а следовые амины были дериватизированы и обогащены при помощи твердофазной экстракции на октадецил-модифицированном диоксиде кремния и концентрированию образца путем лиофилизации. Среди 10 следовых аминов, для большинства аналитов выход после обогащения составил более 70%. Разделение дериватизированных аминов было выполнено при помощи обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с водой и ацетонитрилом (оба содержат 0,1 % муравьиной кислоты) в качестве элюентов А и В соответственно. Хроматографическая система сопряжена с tandemным масс-спектрометром TripleTOF 6600 (AB SCIEX, США) в режиме реального времени. Детекция биогенных аминов основана на методе мониторинга множественных реакций в высоком разрешении (HR MRM).

СВЯЗЬ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР ЛЕЙКОЦИТОВ С ПАРАМЕТРАМИ ОТВЕТА НА АНТИАНГИОГЕННУЮ ТЕРАПИЮ У ПАЦИЕНТОВ С ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ

О.С. Кожевникова, А.Ж. Фурсова, А.С. Дербенева, М.С. Тарасов, И.Ф. Никулич, В.А. Девяткин, Д.В. Телегина, Н.Г. Колосова *ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – многофакторное нейродегенеративное заболевание глазного дна, которое становится основной причиной необратимой потери зрения людьми старше 60 лет. Цель исследования – изучение ассоциации относительной длины теломер лейкоцитов (ДТЛ) с функциональными и анатомическими параметрами ответа на антиангиогенную (анти-VEGF) терапию в лечении влажной ВМД. Проведен сравнительный анализ показателей параметров оптической когерентной томографии и данных визометрии у 110 пациентов (115 глаз) с неоваскулярной ВМД, получавших анти-VEGF терапию до клинической стабилизации процесса. ДТЛ оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени. Изменение динамики остроты зрения (МКОЗ) при анти-VEGF терапии отмечено в 100% глаз, при этом медиана МКОЗ после 3-х загрузочных инъекций составила 0,3 [0,1–0,55], после 5-и инъекций – 0,5 [0,3–0,8]. Финальная острота зрения составила 0,6 [0,4–0,9]. Центральная толщина сетчатки (ЦТС) в 100% случаев снизилась после 3-й инъекции до 265 [234–306] мкм, к концу лечения — до 211 [190–262] мкм. Тип ХНВ 2 (классическая) определял более низкие значения МКОЗ исходно и в динамике лечения. У пациентов с активной субретинальной неоваскулярной мембраной (СНМ) к концу периода наблюдения регистрировали более низкие показатели МКОЗ и более высокие значения ЦТС на все этапах лечения. Обнаружена ассоциация ДТЛ с показателями состояния сосудов в динамике лечения: у пациентов с более короткой ДТЛ статистически значимо чаще детектировали активную СНМ и наличие анастомозов и петель после 3-х загрузочных введений препарата. Таким образом, ДТЛ ассоциирована с динамикой активности неоваскулярной мембраны у пациентов с ВМД в ответ на антиангиогенную терапию. У пациентов с более длинной ДТЛ чаще наблюдается переход от активной СНМ в неактивную СНМ уже после трех загрузочных доз. Напротив, у пациентов с более короткой ДТЛ после трех загрузочных доз достоверно чаще сохраняется активность СНМ и детектируется наличие анастомозов и петель. *Поддержано грантом РФФИ №21-15-00047.*

СВЯЗЬ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ С КЛИНИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ШИЗОФРЕНИИ И РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Н.М. Кротенко^{1,2}, Л.П. Смирнова², Н.В. Кротенко¹, А.В. Семке², С.А. Иванова²

¹Сибирский государственный медицинский университет; ²НИИ психического здоровья Томский НИМЦ, Томск

Шизофрения (Ш) и рассеянный склероз (РС) относятся к заболеваниям с высоким уровнем окислительного стресса (ОС) в организме больных. Сейчас в области исследования патогенеза Ш и РС ключевыми аспектами оказались ферментативная организация биохимических процессов. В работе представлен сравнительный анализ эритроцитарной ферментативной антиоксидантной системы (АОС) при различных типах течения Ш и РС. Изучена активность следующих ферментов: каталазы (КТ), глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГПО), глутатион-S-трансферазы (ГТФ) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ). В обследование включено 60 человек, страдающих Ш (простая, параноидная и резидуальная формы) и 56 человек с верифицированным диагнозом РС (ремиттирующим типом – РРС и вторично-прогрессирующим – ВПРС), подтверждённым МРТ и 30 здоровых лиц. Ферментативная активность в эритроцитах определялась общепринятыми методами. КТ активность – по скорости утилизации H₂O₂ (Beers R.F., Size J.W., 1978), ГР – по степени окисления NADPH (Carbery J., Mannervick B., 1981), ГПО – по окислению NADPH в сопряженной глутатионредуктазной реакции (Litte C.I., O'Brien P.J., 1968), ГТФ – по оценке скорости реакции ферментативного образования GS-2,4-динитробензола (Keen J.H. et al., 1976), Г6ФДГ – по изменению концентрации восстановленного НАДФ+ (Суханова Г.А. и др., 1983). Концентрация белка определена по методу Лоури. Активность ГПО, ГТФ и Г6ФДГ при всех формах Ш ниже в сравнении с контролем. Таким образом, имеет место снижение активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты. Активности ГР и КТ при разных формах Ш достоверно не различаются по сравнению друг с другом и по сравнению с контролем. Для больных РС получена другая картина изменений в активности АОФ, указывающая на участие ОС в патогенезе заболевания. Выявлен высокий уровень активности ГП и КТ в эритроцитах больных. Активность ГТФ уменьшена по отношению к контролю у пациентов с РРС в 3 раза и в 1,5 раза у ВПРС (p<0,05). Та же тенденция обнаружена у фермента ГТФ. Для активности Г6ФДГ в эритроцитах выявлено повышение при РРС и понижение её при ВПРС. Эти закономерности изменений активности АОФ указывают на связь ОС с клиническими характеристиками Ш и РС и зависят от формы, типа течения, стадии и длительности заболеваний. Работа поддержана грантом РНФ № 18-15-00053.

ИССЛЕДОВАНИЕ НАРУШЕНИЙ СОЦИАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ, СВЯЗАННЫХ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА НА МЫШАХ ЛИНИИ *Muc2*^{-/-}

М.В. Морозова^{1,2,3}, М.А. Борисова⁴, О.А. Снытникова⁵, Ю.П. Центалович^{5,6}, Е.Н. Кожевникова^{2,3,7}

¹Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН; ²НИИ нейронаук и медицины; ³Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН; ⁴Институт цитологии и генетики СО РАН; ⁵Международный томографический центр СО РАН; ⁶Новосибирский государственный университет; ⁷Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск

Быстрая урбанизация современного мира привела к росту воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Важную роль в развитии ВЗК играет измененная микрофлора кишки, действие которой через метаболиты, активацию иммунной и нервной систем распространяется на весь организм, включая ЦНС. Поэтому ВЗК часто сопровождаются расстройствами настроения и расстройствами аутичного спектра, что приводит к нарушениям в социальном общении. Было изучено социальное поведение у самцов мышей линии *Muc2*, моделирующих ВЗК. Аутично-подобных черт у *Muc2* не выявлено. В тестах с предоставлением самца и самки под стаканчиками и без, самцы *Muc2* мало различали пол животных, в отличие от контрольных C57BL/6. Предоставление только одного интродера – самки или самца, выявило у самцов *Muc2* повышенный сексуальный интерес к самцу и сниженный к самке, увеличение агрессии к самцу и навязчивого обнюхивания/облизывания самки. За регуляцию агрессивного и полового поведения отвечает вентромедиальное ядро гипоталамуса (ВМГ). Иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга с антителами к c-Fos показало существенно большее возбуждение нейронов ВМГ у самцов *Muc2* после взаимодействия с самцом-интродером, чем у контрольных. Метагеномное исследование контента кишки выявило ряд существенных различий в микрофлоре животных *Muc2* и C57BL/6, в частности, существенное снижение *Escherichia coli* у животных *Muc2*. Известно, что *E. coli* продуцируют триптофан – предшественник серотонина. Анализ метаболитов крови подтвердил снижение триптофана у мышей *Muc2* и фенилаланина, предшественника дофамина. Моделирование сниженного уровня *E. coli* в кишке мышей C57BL/6 путем подобранного антибиотика рифампицина вызвало у них изменение социального поведения, подобное поведению *Muc2* нарушение в распознавании самки и самца. Таким образом, выявлены отклонения в составе микробиоты кишки и нарушения социального поведения при ВЗК с сопутствующими изменениями метаболитного профиля.

Животные приобретены за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований № АААА-А21-121011990039-2 и № 0533-2019-0003. Метаболомный анализ поддержан грантом РФФИ #19-015-00169, анализ микробиоты поддержан грантом РНФ № 20-74-10022.

РЕСВЕРАТРОЛ КАК ФАКТОР, СТИМУЛИРУЮЩИЙ ПРОЦЕСС РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННОГО СОМАТИЧЕСКОГО НЕРВА

С.И. Пиняев, Н.С. Тебнева, Т.П. Кузьменко, И.В. Сюсин, А.Е. Пьянзина, М.Ю. Гладышева, В.В. Ревин

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск

В настоящее время одной из важнейших задач современной науки является изучение механизмов, лежащих в основе патологических нарушений, возникающих при повреждении нервных волокон, а также стимуляции процессов регенерации соматических нервов. В этом плане важную роль играют белки миелиновой фракции. Упаковка компактного миелина настолько плотна, что исключает присутствие большого количества белков. Белки миелина часто специфичны для миелино-

вой оболочки и многофункциональны. Известно, что основным белком миелина (ОБМ) является одним из наиболее характерных белков миелиновой оболочки. ОБМ является многофункциональным белком, участвующим во множестве процессов, от цитоскелетных взаимодействий до укладки мембранных многослойных слоев в компактный миелин. Роль основного белка миелина (ОБМ) состоит в том, чтобы удерживать мембраны миелиновой оболочки. Миелин-ассоциированный гликопротеин (МАГ) играет решающую роль в формировании и образовании структуры миелина. Нулевой белок миелина (P0) вместе с основными белками формирует основную плотную миелиновую линию. Периферический миелиновый белок 22 (ПМБ 22) относится к семейству белков связывания жирных кислот, способных выполнять важные функции в генерации и поддержании уникального липидного состава нерва. Для облегчения протекания восстановления нервов наряду с хирургическим вмешательством используют физиологически активные вещества, в том числе, и ресвератрол. Эффекты ресвератрола были отнесены не только к его способности снижать последствия окислительного стресса, но и к активации синтеза новых белков. Показано, что ресвератрол способствует экспрессии таких миелин-специфических белков, как МАГ, P0, ПМБ 22 и ОБМ в процессе регенерации соматических нервов. Благодаря усиленному синтезу белков происходит более быстрое формирование миелиновой оболочки нерва, и, следовательно, более быстрое прорастание аксональных отростков к дистальному концу поврежденного нерва. На основании вышесказанного можно утверждать, что ресвератрол оказывает положительное влияние на восстановление поврежденного нерва.

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЛИЗОСОМАЛЬНОЙ АУТОФАГИИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, НАХОДЯЩИХСЯ НА РАННИХ СТАДИЯХ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА **В.А. Станишевская¹, А.Х. Алиева¹, М.М. Руденок¹, А.В. Карабанов², О.Б. Доронина³, К.С. Доронина³, А.В. Росинская⁴, С.Н. Иллариошкин², П.А. Сломинский¹, М.И. Шадрин¹**

¹Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ²Научный центр неврологии, Москва; ³Новосибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Новосибирск; ⁴Приморская краевая клиническая больница № 1, Владивосток

Болезнь Паркинсона (БП) — второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, отличительной особенностью которого является длительный бессимптомный период. Характерные двигательные признаки БП проявляются только при гибели более 50% нейронов чёрной субстанции и снижении уровня дофамина в стриатуме на 70%. В настоящее время проводятся интенсивные исследования по поиску механизмов и процессов, вовлечённых в патогенез заболевания. Данные ряда работ указывают на вовлечение процессов лизосомальной аутофагии в патогенез БП. В связи с этим был проведен анализ изменения экспрессии генов FBXO7, LAMP2, VAMP8, ATG9 и LAMP3 на уровне мРНК в периферической крови пациентов с БП (1-2 стадии по Хен и Яру) а также в группах сравнения. Определение относительных уровней мРНК генов проводилось с использованием обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (TaqMan). В результате были выявлены статистически значимые изменения для генов FBXO7, LAMP2 и VAMP8. Так, для FBXO7, белок которого принимает участие в митофагии, выявлено снижение относительных уровней мРНК в 12,5 раз в группе пациентов с БП, не подвергавшихся лечению, и снижению в 20 раз в группе пациентов с БП, подвергавшихся лечению. Падение уровня экспрессии FBXO7 может приводить к снижению интенсивности митофагии и развитию окислительного стресса, провоцирующего дальнейшее развитие нейродегенерации при БП. Для каждого из генов LAMP2 и VAMP8 было показано снижение относительных уровней мРНК у пациентов с БП, не подвергавшихся лечению и подвергавшихся лечению, примерно в 2 раза и в 1,5 раза соответственно. Снижение экспрессии LAMP2 может приводить к нарушению структурной целостности лизосомальных мембран и изменению функционирования лизосом, а падение экспрессии VAMP8 может вызывать нарушение формирования зрелых аутофагосом. Таким образом, полученные данные могут говорить о важной роли функционирования лизосом и аутофагии на ранних этапах развития нейродегенеративных процессов при БП. Полученные достоверные данные свидетельствуют о важной роли этих генов в патогенезе БП. Ключевые слова: Болезнь Паркинсона; лизосомальная аутофагия; периферическая кровь пациентов; экспрессия генов. *Финансирование: Работа поддержана грантом РФФИ №20-15-00262.*

ИЗМЕНЕНИЯ МАРКЕРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ДИНАМИКЕ ДЕЗИНТОКСИКАЦИОННО-СТАБИЛИЗАЦИОННОГО ЭТАПА ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

И.М. Быков, М.А. Попова, Д.А. Любченко, Я.Е. Денисова, А.Н. Столярова

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

В развитии метаболических нарушений у больных с синдромом зависимости от психоактивных веществ ведущее значение имеет эндогенная интоксикация и окислительный стресс. Данные универсальные патологические процессы не только являются результатом действия наркотических соединений на организм человека, но и сами способствуют прогрессированию заболевания и формированию зависимости. В связи с этим актуальным является исследование возможности использования маркеров оксидативного стресса для мониторинга и прогнозирования наркопатологии. Научно-исследовательская работа выполнена с использованием биоматериала относительно здоровых лиц (n=20, контрольная группа), больных с синдромом зависимости от опиоидов (n=20, 2-я группа) и больных с синдромом зависимости от психостимуляторов (n=20, 3-я группа). Кровь у больных 2-3-й групп забирали до и после проведения терапии, направленной на коррекцию основных психических нарушений и дезинтоксикацию. В результате проведенных исследований было установлено, что у больных 2-й и 3-й групп значения общей антиоксидантной активности плазмы крови и содержание тиоловых групп было снижено на 20-30% относительно контрольных цифр. В эритроцитарной взвеси больных 2-й группы было увеличено содержание продуктов окислительных модификаций биомолекул (ТБК-реактивные продукты) на 91%, тогда как у больных 3-й группы данный параметр был увеличен в значительно меньшей степени – на 52% относительно контроля. При этом у больных 3-й группы преобладали изменения системы глутатиона – снижение уровня глутатиона на 33% и дисбаланс активности ферментов тиолового метаболизма. После проведения терапии в течение 15-17 суток практически полностью нормализовались показатели про-

оксидантно-антиоксидантной системы плазмы крови, однако уровень продуктов окислительных модификаций в эритроцитах и нарушения ферментативной активности сохранялись. Таким образом для мониторинга течения синдрома наркотической зависимости в острый период целесообразно определять общую антиоксидантную активность и содержание тиоловых групп в плазме крови, а на реабилитационном этапе лечения следует обратить внимание на динамику активности ферментов антирадикальной защиты. *Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1/117.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ НК КЛЕТОК НА УРОВНЕ ТРАНСКРИПТОМОВ КЛОНОВ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК Е.М. Мерзляк^{1,2}, М. Крюков², М.А. Стрельцова², Е.И. Коваленко², Д.М. Чудаков^{1,2,3}, О.В. Британова^{1,2}

¹Отдел молекулярных технологий, Институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва; ²Отдел геномики адаптивного иммунитета, Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва; ³Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород

НК-клетки обеспечивают защиту организма от внутриклеточных патогенов и размножения собственных трансформированных клеток. Исторически их относят к клеткам врожденного иммунитета, но в последнее время появились данные, указывающие на адаптивные свойства НК-субпопуляций. Механизмы, контролирующие образование клональности и потенциальных НК-клеток памяти, остаются неизвестными. Мы предположили, что одним из возможных путей формирования антигенспецифичной памяти может быть гликозилирование ингибирующих и активирующих рецепторов, таких как иммуноглобулин-подобных (KIR) или лектиноподобных (KLR) рецепторов. Развитие цитотоксического ответа НК-клеток может зависеть не только от комбинации активирующих и ингибирующих рецепторов, но и от их модификаций на поверхности клетки. Так, показана высокая вариативность гликозилирования Fc-рецептора НК клеток (CD16a), которая приводит к изменению его аффинности к антителам и влияет на цитотоксические свойства НК-клеток. В свою очередь, процессинг гликанов отражается в изменении паттерна экспрессии генов гликан-модифицирующих ферментов. Для проверки нашей гипотезы о формировании клональной гетерогенности НК-клеточных популяций мы использовали культуры, выращенные с единичных НК-клеток с заданным фенотипом и последующим анализом их транскриптома. Зрелые НК-клетки CMV-позитивного донора сортировали по двум фенотипам: CD57⁺KIR3DL1⁺KIR3DS1⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ и CD57⁺KIR3DL1⁺KIR3DS1⁺NKG2C⁺NKG2A⁻. Клоны культивировали на модифицированных фидерных клетках, стимулирующих НК к пролиферации. В результате было получено 17 активно растущих клонов, предварительный анализ транскриптома которых не выявил существенной разницы между двумя группами, различающихся по уровню экспрессии NKG2A. Для кластерного анализа мы использовали списки дифференциально экспрессирующихся генов, опубликованные ранее, которые были получены при анализе транскриптома единичных клеток и оказались значимыми при выделении отдельных НК-клеточных субпопуляций, в том числе адаптивной. Два клона сформировали отдельный кластер, который отличался от других клонов по экспрессии генов KIR. Дальнейший анализ геномной онтологии обнаружил изменение активности гликозилтрансфераз в этих клонах по сравнению с другими. *Работа поддержана грантом Минобрнауки РФ №075-15-2020-807.*

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ЙОДРЕЗИСТЕНТНЫМ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМ РАКОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

З.И. Абрамова¹, К.А. Гарипов², Г.П. Семаков¹, А.В. Бурцева¹, З.А. Афанасьева²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет; ²Казанская государственная медицинская академия, Казань

В патогенезе опухолевой резистентности, в основе которой лежит нарастание экспрессии Bcl2 и активация mTOR-пути, участвуют механизмы связанные с нарушением регуляции адаптивного иммунного ответа – индукция апоптоза в активированных Т-ЛФ. В результате ЛФ погибают, не успев выполнить киллерную функцию. По другим данным, аутофагия вызванная I131-терапией способствует резистентности к препаратам, которые нацелены на сигнальный путь PI3K/mTOR. Цель исследования – оценить аутофагию как потенциальную мишень для преодоления йодрезистентности при ДРЦЖ. Уровни экспрессии белков определяли Вестерн-блоттингом. Установлено, что в CD3⁺Т-ЛФ на фоне повышения экспрессии Bcl2 определяется высокий уровень p90Caspr3 как при первичном раке (C73pT1-3N0M0), так и в группе больных с йодрезистентным РЦЖ по сравнению с контролем. Оценка уровня ATG14, который служит ядром для начала сборки аутофагосомной мембраны, показала достоверное его увеличение при первичном и йодрезистентном раке. При оценке уровня экспрессии белков элонгации процесса (LC3-I/LC3-II) установили увеличение уровня этих белков по сравнению с контролем и достоверное повышение их уровня в группе с йодрефрактерностью по сравнению с группой больных до лечения. Нарастание соотношения LC3-I/LC3-II ($k > 1$) в обеих группах свидетельствует о высоком уровне инициации и протекания аутофагии, причем при развитии йодрезистентности данный процесс более интенсивный. Таким образом, йодрезистентность больных ДРЦЖ может быть связана с активацией аутофагии. Ранее (Тао Т, Ху Н, 2020) при АИТ была выявлена аномальная аутофагия тироцитов: в фолликулярных клетках ЩЖ избыток I131 подавлял экспрессию белка LC3-II. Мы показали, что при АИТ в Т-ЛФ на фоне увеличения экспрессии Bcl2 повышается экспрессия Beclin1. Однако процесс носит незавершенный характер, о чем свидетельствует как снижение соотношения LC3-I/LC3-II ($k < 1$), так и высокий уровень белка p62 связанного с LC3-II в аутофагосомах, то есть наблюдается корреляция в активации белков ПКГ в тироцитах и Т-ЛФ. Известно, что поглощение I131 клетками осуществляется Na/I-симпортером (NIS), который разлагается аутофагическим путем. Таким образом, ингибирование аутофагии и как следствие повышение уровня экспрессии NIS может помочь преодолеть резистентность к терапии радиоактивным йодом.

КОМБИНИРОВАННЫЙ ЭФФЕКТ ЦИСПЛАТИН-ТЕВА И ВОРТМАНИНА НА ИНДУКЦИЮ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО РАКА ЯИЧНИКА SKOV-3

З.И. Абрамова¹, В.Н. Югай¹, А.Д. Гафиуллина², З.А. Афанасьева²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет; ²Казанская государственная медицинская академия, Казань

При раке яичника одним из основных методов лечения является применение препаратов платины. Однако у многих пациентов в конечном итоге возникает рецидив болезни и резистентность к цисплатину. Ранее нашими коллегами было показано *in vitro* на SKOV-3 (Габбасов Р.Т. и др, 2020), что воздействие цисплатина индуцирует аутофагию, что может являться одним из возможных механизмов устойчивости к препарату, то есть подавления апоптоза. В связи с этим, нами был проведен анализ влияния Цисплатин-Тева в присутствии вортманина, ингибитора фосфотидил-инозитол-3-киназы, на тип гибели опухолевых клеток. Объектом исследования являлась культура клеток эпителиального рака яичника SKOV-3. Клетки росли в 6-луночных планшетах в течение 24 часов в присутствии Цисплатин-Тева, вортманина и с добавлением обоих препаратов. Вортманин растворяли в диметилсульфоксиде. Каждую группу клеток разделяли на две части, одну «окрашивали» Annexin V-FITC Apoptosis Staining / Detection Kit (ab14085, Abcam, USA), другую половину Autophagy Assay Kit (ab139484, Abcam, USA). Оценку экспрессии маркерных белков оценивали методом проточной цитометрии (BD FACSCalibur, USA). При химиотерапии пациентов наиболее желаемым исходом является уменьшение количества клеток опухолевой ткани за счёт гибели путём апоптоза, который рассматривается в качестве одного из суррогатных маркеров чувствительности/резистентности больного к проводимой терапии. Чтобы показать взаимосвязь апоптоза и аутофагии опухолевых клеток *in vivo* в ответ на воздействие Цисплатин-Тева, мы использовали вортманин – фармакологический ингибитор макроаутофагии. (Abliz A. et al., 2015). Нами было установлено достоверное (на 8%) увеличение количества апоптотических клеток растущих в присутствии цисплатина и снижения некротических клеток по сравнению с контролем. Инкубация клеток в присутствии вортманина – показала, что в культуре уровень клеток на ранней стадии апоптоза снижался до уровня контроля. При комбинированном использовании Цисплатин-Тева и вортманина установлено статистически значимое (на 30%) увеличение содержания апоптотических клеток на фоне контроля. Цель дальнейших исследований – поиск механизма синергического эффекта терапевтических препаратов и ингибиторов аутофагии для повышения чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ КОНЬЮГАТОВ ПИНОСТРОБИН ХАЛКОНА С ТРИТЕРПЕНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

И.В. Галяутдинов¹, З.Р. Зилеева¹, Л. М. Закирова^{1,2}, И.П. Байкова², Е.В. Третьякова²

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН; ²Уфимский институт химии УФИЦ РАН, Уфа

В данной работе было изучено влияние конъюгатов пиностробин халкона с литохоловой и тритерпеновыми кислотами на метаболическую активность условно-нормальных клеток эмбриональной почки человека (HEK293) и опухолевых клеточных линий карциномы легкого (A549), гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2), нейробластомы (SH-SY5Y), клеток колоректального рака (HTC116) с использованием витального красителя PrestoBlue®. Пиностробин халкон (2',6'-дигидрокси-4'-метоксихалкон) выделен в виде красных кристаллов из тополиных почек *Populus nigra*. В качестве конъюгатов использовали олеановую, урсоную, глицирретовую и 3-оксо-литохоловую кислоты. Результаты оценки метаболической активности полученных соединений показывают, что пиностробин халкон снижает цитотоксическую активность конъюгатов по сравнению с исходной кислотой (значения IC50 больше 200 мкМ). Способность подавлять метаболическую активность клеток эмбриональной почки человека (HEK293), нейробластомы (SH-SY5Y), клеток колоректального рака (HTC116) наблюдалась только у производного пиностробина халкона с урсоновой кислотой (значения IC50 36.26, 61.69 и 56.68 мкМ соответственно). В то же время в отношении клеток карциномы легкого (A549) и гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2) аналогичного эффекта не наблюдалось (значения IC50 больше 200 мкМ). Работа выполнена в соответствии с планами госзадания ИБГ УФИЦ РАН №АААА-А21-121011990119-1 и УФИХ УФИЦ РАН № АААА-А20-120012090029-0.

НАРУШЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ БЕЛКАМИ GAPDH И Hsp70 СНИЖАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ К ГИПОКСИИ

М.А. Микеладзе¹, Е.А. Дугышева¹, В.Г. Карцев², Б.А. Маргулис¹, И.В. Гужова¹, В.Ф. Лазарев¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ²ИнтерБиоСкрин, Черноголовка

Гипоксия является одним из физиологических факторов, влияющих на развитие солидных новообразований, в том числе глиобластом. Уровень гипоксии внутри опухоли варьируется от легкой до тяжелой, в зависимости от доступности кровеносных сосудов близлежащих здоровых тканей. Адаптивный ответ при слабой гипоксии обусловлен активацией транскрипционного фактора HIF-1a, который индуцирует экспрессию целевых генов, участвующих во многих жизненно-важных процессах, одним из которых является гликолиз. Решающий этап гликолиза – превращение глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-бисфосфоглицерат, которое катализируется глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (GAPDH), поэтому количество активного фермента имеет решающее значение для энергетического метаболизма раковых клеток в условиях ограниченной оксигенации. Вместе с тем, тяжелая гипоксия инактивирует антиоксидантную систему, что ведет к продукции активных форм кислорода и азота. Все эти события влекут за собой химические модификации GAPDH, в том числе окисление и нитрозилирование, что приводит к инактивации фермента и его переходу в состояние, склонное к образованию цитотоксичных агрегатов. Однако, раковая клетка снабжена надежными цитопротекторными системами, основанными на белках шаперонах, одним из которых является Hsp70. Hsp70 способен распознавать и утилизировать белки с нарушенной конформацией во время стресса, в том числе GAPDH, тем самым предотвращая гибель раковых клеток. Мы предположили, что ингибирование Hsp70-опосредованного шаперонирования поврежденного фермента будет способствовать накоплению цитотоксичных олигомеров GAPDH в условиях гипоксии. В качестве ингибитора шаперонной активности Hsp70 использовали препарат АЕАС, ранее изученный в нашей лаборатории. Мы установили, что АЕАС блокирует взаимодействие Hsp70 с денатурированным

GAPDH, стимулируя агрегацию последнего при гипоксии. Потенциал препарата АЕАС как противоопухолевого агента был подтвержден нами как на клеточной модели, так и на модели *in vivo* на крысах. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 20-315-70049.

ЭКСПРЕСС ДИАГНОСТИКА МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

В.Е. Франкевич, В.В. Чаговец, Н.Л. Стародубцева, В.В. Кометова, В.В. Родионов

НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ, Москва

Рак молочной железы, наиболее распространенная форма рака среди женщин в мире. В 40-50% случаев рак молочной железы сопровождается метастатическим поражением лимфатических узлов. Гистологический анализ биоптата сигнального лимфоузла занимает 20-30 минут и не исключает ложноотрицательных результатов. Таким образом, необходимо создание инновационных экспрессных методов для выявления метастаз в лимфатических узлах во время операции. Цель. Изучить механизмы метастазирования в сигнальные лимфатические узлы при раке молочной железы и разработать малоинвазивный метод диагностики метастатического поражения сигнальных лимфатических узлов с помощью прямого масс-спектрометрического анализа Масс-спектрометрия, цитологическое исследование, метаболомное и протеомное исследование биопсийной ткани сигнальных лимфоузлов. В работе показан новый экспресс-метод молекулярного профилирования ткани молочной железы и сигнальных лимфатических узлов, на основе внутренне-экстрактивной электроспрейной ионизации в сочетании с масс-спектрометрией. Отличительной особенностью данного метода ионизации является возможность экстрагировать и ионизировать молекулы всего образца ткани, что значительно повышает чувствительность, точность и воспроизводимость анализа по сравнению с существующими аналогами, и как следствие, достоверность данных и точность идентификации метастатического поражения. Диагностический потенциал методики был оценен на образцах биопсийной ткани сигнальных лимфоузлов 50 пациентов с инвазивным раком молочной железы. Вещества, ассоциированные с метастазированием, были идентифицированы с использованием tandemного масс-спектрометрического анализа и классического ВЭЖХ-МС анализа экстрактов тканей. Разработанные биоинформатические подходы позволили построить молекулярную модель механизма метастазирования в сигнальные лимфатические узлы при инвазивном раке молочной железы. Впервые подход прямой масс-спектрометрии был применен для диагностики пациентов с раком молочной железы. Результаты наших исследований дают возможность разработать новые способы ранней диагностики и лечения заболевания. *Благодарность: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (соглашение № 19-515-55021).*

ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕКТРА микроРНК ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

М.В. Юрова^{1,2}, М.Ю. Бобров¹, В.Е. Франкевич¹, Г.Н. Хабас¹, С.В. Павлович^{1,2}

¹НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва

Функциональная кластеризация генов-мишеней отображает их участие в регуляции клеточного цикла, сигнальных путей факторов роста, апоптоза и репарации ДНК, что может служить подтверждением их специфичности для рака яичников (РЯ). Цель. Изучить диагностическую значимость экзосомальных микроРНК плазмы крови при РЯ. Проведено транскриптомное исследование состава микроРНК плазмы крови у больных с первично выявленным РЯ, пациентов с эндометриозом (Э; группа сравнения) и здоровых добровольцев группы контроля (К). Экзосомальные РНК использовали для создания библиотек кДНК малых РНК. Анализ микроРНК проводили методом высокопроизводительного секвенирования. Были отобраны микроРНК, имеющие усредненное количество прочтений по группам сравнения не менее 10, при коэффициенте ложных обнаружений <0.1 и кратности изменений $\geq 1,5$. Нормализация данных и оценка дифференциальной экспрессии в группах сравнения были проведены с помощью сервиса DESeq2. По данным секвенирования идентифицировано 252 прочтения. Для каждой группы были установлены микроРНК, уникальные для соответствующей пары сравнения: 16 микроРНК для «Э-К», 17 – для «РЯ-К» и 26 – для «РЯ-Э», среди которых были отобраны субстраты: для «Э-К» – hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-484, для «РЯ-К» – hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-150-5p. С использованием биоинформатических подходов был проведен функциональный анализ клеточных процессов и каскадов внутриклеточной сигнализации, потенциально регулируемых дифференциально экспрессируемыми микроРНК. В результате анализа был выявлен ряд генов-мишеней микроРНК (AKT1, ATM, BARD1, BAX, BCL2, BRCA1, CASP3, CDK4, CHEK1, CHEK2, JAK1, MDM2, PLK1, PTEN, RB1, SMAD2, SMAD3, TP53), входящих в состав интегрального опухолевого пути (Integrated Cancer Pathway). Заключение. Наличие дифференциально экспрессированных микроРНК в экзосомах плазмы крови свидетельствует о специфическом изменении их состава при РЯ. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ, название проекта «Разработка метода дифференциальной диагностики образований яичников методом масс-спектрометрии высокого разрешения», № 20-65-46014.*

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВА НОВЫХ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИДОКСИНА И ЖИРНЫХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Р.Р. Казакова, М.Н. Агафонова, Е.С. Булатова, М.Н. Мансурова, А.Э. Сабирова, С.В. Сапожников, Н.В. Штырлин,
Ю.Г. Штырлин

Научно-образовательный центр фармацевтики, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

На сегодняшний день четвертичные аммониевые соли (ЧАС) являются одним из перспективных классов антисептических и дезинфицирующих средств, однако их применение ограничивается высокой токсичностью и формированием к ним у микроорганизмов резистентности. Модификация ЧАС заместителями различной природы является возможным путем решения данной проблемы.

Ранее в работе [1] нашей группы было синтезировано 43 новых ЧАС на основе пиридоксина и жирных карбоновых кислот. На первом этапе была изучена их антибактериальная активность в отношении пяти штаммов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, в качестве препаратов сравнения использовали активно применяемые антисептики мирамистин, хлоргексидин и бензалкония хлорид. На следующем этапе для 9 наиболее активных соединений были изучена цитотоксичность на условно-нормальных клетках человека: эмбриональных клетках почек, мезенхимальных стволовых клетках и фибробластах кожи человека, а также антибактериальная активность в отношении клинических штаммов бактерий. По результатам проведенных исследований *in vitro* было отобрано два соединения (рис. 1) для *in vivo* экспериментов, в которых была изучена их острая токсичность при пероральном введении и накожном нанесении мышам.

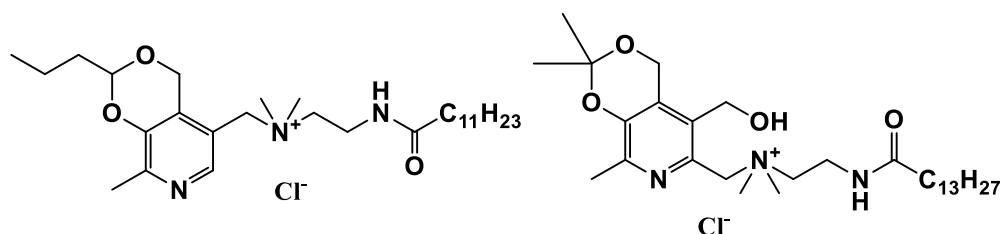


Рисунок 1. Структуры соединений-лидеров.

Оба соединения при пероральном введении оказались более безопасны (ЛД₅₀ > 2000 мг/кг), чем бензалкония хлорид (ЛД₅₀ 180 мг/кг), мирамистин (ЛД₅₀ 1000 мг/кг) и хлоргексидин (ЛД₅₀ 1260 мг/кг). ЛД₅₀ при накожном нанесении составила более 2500 мг/кг. Таким образом, вышеописанные соединения могут стать многообещающей основой для разработки антисептических и дезинфицирующих средств. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения проектной части государственного задания в сфере научной деятельности № 0671-2020-0053 и гранта РФФИ № 18-33-20051.

1. S.V. Sapozhnikov, A.E. Sabirova, N.V. Shtyrilin, A.Y. Druk, M.N. Agafonova, M.N. Chirkova, R.R. Kazakova, D.Y. Grishaev, T.V. Nikishova, E.S. Krylova, E.V. Nikitina, A.R. Kayumov and Y.G. Shtyrilin, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 211, 113100

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ *IN VITRO* СОЕДИНЕНИЙ ФТОРХИНОЛОНОВОГО РЯДА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИДОКСИНА

Е.С. Булатова, М.Н. Агафонова, А.Р. Каюмов, Ю.Г. Штырлин

Научно-образовательный центр фармацевтики, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Инфекционные заболевания остаются одной из ведущих причин смертности в мире благодаря распространению возбудителей, характеризующихся устойчивостью к известным противомикробным препаратам. В этой связи разработка препаратов, обладающих высокой антибактериальной активностью и не вызывающих выработку резистентности у микроорганизмов, является актуальной задачей современного здравоохранения.

Целью данного исследования являлось изучение антибактериальной активности полученных ранее в нашей исследовательской группе [патенты РФ №2636761, 2634122 и 2713932] широкого ряда соединений фторхинолонового ряда, содержащих фрагменты производных пиридоксина. На первом этапе анализ антибактериальной активности на музейных штаммах грамположительных и грамотрицательных бактерий показал, что величины минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для 16 соединений сопоставимы или превосходят таковые для коммерческих фторхинолонов (лемефлоксацин, норфлоксацин, ципрофлоксацин и моксифлоксацин). На втором этапе для соединений, проявивших наибольшую активность, методом серийных разведений были определены значения МИК на 18 устойчивых клинических тест-штаммах. Безопасность соединений-лидеров *in vitro* далее была исследована с помощью метаболического МТТ-теста на условно-нормальных клетках человека (HSF – фибробласты кожи человека, Ch.L – клетки печени, MSK – мультипатентные клетки). В результате проведенного исследования установлено, что 6 новых соединений проявляют эффективность в отношении всех клинических штаммов бактерий и при этом обладают низкой токсичностью по отношению к условно-нормальным клеткам человека. На примере одного из соединений показано, что при краткосрочной инкубации наблюдаются значительные изменения протеомного профиля клеток *St. aureus*.

Таким образом, можно сделать вывод, что некоторые новые производные фторхинолонового ряда, содержащие пиридоксиновый фрагмент, представляют интерес для дальнейшей разработки высокоэффективных и безопасных антибактериальных лекарственных средств. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения проектной части государственного задания в сфере научной деятельности №0671-2020-0053.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ХАЛКОНСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИДОКСИНА

О.В. Бондарь, Р.С. Павельев, С. Алрхмун, Р. Карут, И.И. Рахмаев, М.В. Пугачев, Ю.Г. Штырлин

Научно-образовательный центр фармацевтики, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Функционализация природных биологически активных соединений является одним из важнейших подходов к созданию новых лекарственных средств. Пиридоксин является кофактором более ста ферментативных реакций в организме человека и получение его производных, содержащих фрагмент халконов (1,3-диарилзамещенных α,β -непредельных кетонов) представляет несомненный интерес для получения биологически активных соединений.

В настоящей работе по реакции Виттига получено 11 новых халконсодержащих производных пиридоксина, исследована их цитотоксичность *in vitro* в отношении опухолевых клеток аденокарциномы простаты человека (PC-3) и условно-нормальных фибробластов кожи человека (HSF). Установлено, что соединения 1 и 2 (рисунок 1) характеризуются наибольшей противоопухолевой активностью и селективностью. Эти соединения далее были протестированы на более широкой панели опухолевых клеток, выявлена активность в отношении клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7, карциномы почек A-498, карциномы толстого кишечника HCT-116. Цитотоксические концентрации IC50 соединений 1 и 2 для клеток MCF-7 составили 3.8 и 3.6 μM , а индекс селективности 6.5 и 13.4 соответственно. По сравнению с цитостатиком доксорубицином исследованные соединения проявляют несколько меньшую активность, однако, превосходят его по индексу селективности.

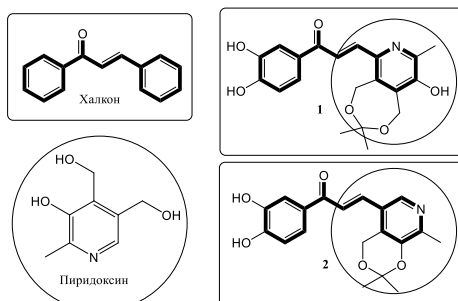


Рис. 1. Структуры исследуемых соединений.

Поскольку соединения 1 и 2 содержат ароматическую гидроксильную группу, то нами была исследована их антиоксидантная активность. По данным тестов *in vitro* соединения 1 и 2 нейтрализуют радикалы DPPH и ABTS более эффективно, чем аскорбиновая кислота и Trolox (водорастворимый аналог витамина E). Эти же соединения, в тесте с лецитиновыми липосомами и тиобарбитуровой кислотой, проявили сопоставимую по эффективности с реперным Trolox способность к ингибированию перекисного окисления липидов. Также было установлено, что исследуемые соединения способны подавлять окислительный стресс клеток человека, индуцированный перекисью водорода. Таким образом, показано, что исследуемые производные пиридоксина представляют интерес для дальнейшей разработки на их основе лекарственных средств. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения проектной части государственного задания в сфере научной деятельности № 0671-2020-0053.

НОВЫЙ СПОСОБ СНИЖЕНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ ОЛОВА – КАНДИДАТОВ В ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

М.А. Додохова, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, М.С. Алхусейн-Кулягинова

Ростовский государственный медицинский университет МЗ РФ, Ростов-на-Дону

Последние десятилетия внимание исследователей привлекают соединения олова, обладающие широким спектром фармакологической активности. В 2004 г. FDA был одобрен препарат на основе комплекса олова – пурлитин, для лечения макулярной дегенерации, который в настоящее время проходит клинические испытания для терапии рака молочной железы. Сложности использования перспективных соединений олова заключаются в их высокой неспецифической токсичности. Одним из возможных способов модулирования цитотоксичности является введение в молекулу протекторных антиоксидантных групп, обеспечивающих защитное действие по отношению к здоровым клеткам. Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование острой токсичности оловоорганических соединений с протекторными фенольными группами – (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензилтиолат) триметилолова (Me-4) и бис(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензилтиолат) диметилолова (Me-3) при однократном внутрижелудочном введении крысам линии Wistar. Соединения различались как числом фенольных, так и метильных групп при атоме олова. Исследование проводили на 33 крысах Wistar (самки) весом 190–210 г методами «фиксированной дозы» по протоколу OECD 420. Классифицирование соединений производилось согласно гармонизированной системе классификации опасности и маркировки химической продукции (СГС). Средняя доза вещества, вызывающая гибель половины животных испытываемой группы (LD50) при однократном внутрижелудочном введении, для Me-3 превышает 2000 мг/кг, что позволяет отнести это соединение к V классу токсичности; для Me-4 значение LD50 находится в пределах 5 – 50 мг/кг (II класс токсичности). Таким образом показано, что увеличение числа протекторных антиоксидантных 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензильных групп в молекуле соединения олова в 2 раза привело к снижению острой токсичности более чем 40 раз, что свидетельствует о возможности применения данного подхода для модулирования токсичности перспективных кандидатов в лекарственные средства противоопухолевого действия.

ПОЛИЛИПОСОМАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

А.А. Ежов¹, И.Д. Гроздова², Н.С. Мелик-Нубаров², А.А. Ефимова², Г.Г. Кривцов³, Е.А. Литманович², А.А. Ярославов²
¹Физический факультет и ²Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Липосомы – известное и хорошо зарекомендовавшее себя средством доставки лекарств с доступными и нетоксичными исходными компонентами. Размер однослойных липосом ограничивает количество полезной нагрузки, что можно преодолеть, собирая мультилипосомные комплексы (МЛК) из десятков липосом с лекарственными препаратами на полимерном каркасе и увеличивая количество липосом, поглощаемых клетками при каждом акте эндоцитоза. Сборка липосом часто требует необычных липидов с модифицированными головными группами, однако МЛК можно получить и электростатически связывая анионные липосомы с катионными гидрогелями, сохраняя липосомальную мембрану и водорастворимую полезную нагрузку внутри. Цель настоящей работы – изготовление электростатически стабилизированных МПК из биосовместимых компонентов, исследование цитотоксичности таких МПК и их эффективности для доставки лекарств в клетки в культуре. Для уменьшения токсичности в качестве матрицы для сборки МПК использовался положительно заряженный полисахарид хитозан. Низкая линейная плотность заряда хитозана обеспечивает низкую цитотоксичность. Хитозан подвержен ферментативному расщеплению, а сшивка макромолекул анионами придает ему хемосенсибилизирующие свойства. Линейные молекулы хитозана связывались с помощью сульфат-анионов в наночастицы – каркасы для отрицательно заряженных липосом из кардиолипина и лецитина, нагруженных доксорубицином (DOX). Такие МПК биосовместимы и биоразлагаемы. Было изучено их влияние на внутриклеточное распределение DOX и выживаемость клеток. Связывание десятков липосом с наночастицами хитозана заметно увеличивает количество DOX, поглощаемого клеткой за акт эндоцитоза. МЛК, содержащий около 55 липосом (МПК-55), может вводить в клетки в 4–5 раз больше DOX, чем отдельные липосомы. Эффективность МПК при доставке лекарств определяется зарядом МПК. МПК-55 оказался оптимальным по количеству липосом и проявлял хемосенсибилизирующие свойства. Эффекты исследовались на трех типах клеток: фибробластах мыши, чувствительных и устойчивых к лекарствам опухолевых клетках. Показано, что МПК могут использоваться для эффективной внутриклеточной доставки полезных нагрузок в различные культивируемые клетки, для, например, идентификации внутриклеточных мишеней полезной нагрузки.

ИЗУЧЕНИЕ СТОХАСТИЧЕСКОЙ УПАКОВКИ Cas БЕЛКОВ В ЭКЗОСОМЫ НА ЛИНИЯХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Н.И. Пономарева^{1,2}, А.П. Костюшева¹, В.Г. Воля¹, С.А. Брезгин¹, В.И. Гегечкори², В.П. Чуланов^{1,2}, Д.С. Костюшев¹
¹НМИЦ фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний МЗ РФ; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва

CRISPR/Cas системы представляют собой комплексы Cas белка и РНК-проводника, направляющего белок к заданным участкам генома. Системы CRISPR/Cas могут использоваться для генетического редактирования, исправления и внесения генетических мутаций и др. Отсутствие эффективных и целевых методов доставки *in vivo* является одним из главных препятствий для клинического использования CRISPR/Cas. Экзосомы и другие внеклеточные везикулы представляют собой биологические наночастицы, которые обладают высокой биосовместимостью, безопасностью и могут применяться для доставки лекарственных средств. Целью данного исследования являлось изучение возможности использования экзосом для стохастической упаковки и доставки Cas белков. Клетки раковых и нетрансформированных клеточных линий человека были ко-трансфицированы плазмидами, кодирующими Cas9-BFP с Rab27-EGFP (фактор, участвующий в продукции экзосом) либо с CD63-EGFP (конститутивный белок экзосом). Колокализацию Cas9 белка с Rab27 и CD63 изучали с помощью конфокальной микроскопии. Оценку колокализации проводили с помощью коэффициентов Мандерса. Коэффициенты колокализации белков сравнивали с фактической упаковкой Cas9 белка в экзосомы по обработке клеток HEK293T и анализу флуоресцентного сигнала с помощью проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Значения колокализации M1 и M2 значительно отличались среди линий клеток человека. В линиях с наиболее высокими показателями колокализации коэффициенты M1 и M2 составляли 0,53-0,96 и 0,89-0,99, соответственно. По полученным данным колокализация Cas9 с белком Rab27 была более высокой (M1=0,81-0,96) в сравнении с CD63 (M1=0,53-0,58), что свидетельствует о значительной колокализации Cas9 белков с белками CD63 и, в большей степени, с белком Rab27. Показано, что даже при высокой колокализации Cas9 с маркерами экзосом, уровни стохастической упаковки оказываются низкими. Результаты проведенной работы демонстрируют высокую вариабельность уровней колокализации Cas9 с факторами, участвующими в биогенезе экзосом, среди клеточных линий, а также низкий уровень стохастической упаковки белка Cas9 в экзосомы. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-15-00373.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ БИМЕДИЦИНСКИХ ВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ДОБАВКАМИ

П.М. Тюбаева^{1,2}, А.А. Ольхов^{1,2,3}, С.Г. Карпова², А.В. Лобанов^{1,2}, А.А. Попов^{1,2}

¹Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова; ²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; ³ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

Создание биосовместимых полимерных материалов с особыми свойствами является актуальным направлением биохимии и биоинженерии. Биополимерные материалы находят применение в области транспорта биологически активных и лекарственных веществ, в качестве матриц пролонгированного действия, матриц для клеточной инженерии, антибактериальных терапевтических систем и др. Для создания биомедицинских волокнистых материалов и полимерных систем с контролируемой структурой, свойствами и установленным временем биорезорбции в организме используют различные функциональные добавки, в том числе комплексы порфиринов с металлами. Целью данной работы являлось изучение влияния комплексов тетрафенилпорфирина с цинком, марганцем и железом на надмолекулярную структуру и эксплуатационные свой-

ства ультратонких волокон, полученных методом электроформования на основе полимера природного происхождения поли(3-гидроксипропирата) (ПГБ), а также установление возможностей их применения в современных медицинских средствах. В работе установлены существенные различия в структуре ПГБ с 1-5 масс. % комплексов FeCl₂TPP, ZnTPP, MnTPP, показано влияние комплексов на морфологию полимерного волокна, комплекс физико-механических и диффузионных свойств, кинетику биодegradации нетканого материала и изделий медицинского назначения на их основе. Предложен подход к решению актуальной проблемы формирования бисовместимых волокон определенной морфологии, с набором заданных эксплуатационных свойств. Впервые обнаружен высокий антимикробный и гомеостатический эффект от полученных материалов.

РАЗРАБОТКА CD19-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА LT19

А.Н. Чикаев¹, Т.Н. Беловеж¹, С.В. Кулемзин¹, А.В. Филатов², А.А. Горчаков¹, А.В. Таранин¹

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск; ²ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва

Адоптивная клеточная терапия Т-лимфоцитами, модифицированными химерными антигенными рецепторами (CAR), является одним из наиболее перспективных и активно развивающихся современных средств иммунотерапии рака, в особенности онкогематологических заболеваний В-клеточной природы. Наиболее часто и успешно используемая поверхностная мишень В-клеток, в отношении которой клинически опробованы CAR-T клетки, это белок CD19. Клинические испытания показали, что применение CD19-специфичных CAR-T для терапии острого лимфобластного лейкоза и хронического лимфоцитарного лейкоза позволило достичь полной или частичной ремиссии у 70–80% больных, для которых все терапевтические опции были исчерпаны. Однако далеко не все пациенты реагируют на CAR-T терапию, а у многих из ответивших на лечение может возникнуть рецидив из-за ускользания антигена и/или плохой персистенции CAR-T-клеток. Чтобы решить эти проблемы и расширить репертуар целевых эпитопов, мы решили разработать CAR на основе нового CD19-специфического моноклонального антитела LT19. Нами были разработаны лентивирусные конструкции, кодирующие два CAR 2-го поколения на основе одноцепочечного фрагмента МКА LT19 с антигенраспознающей частью в формате Vh-Vk и Vk-Vh. Поверхностная экспрессия CAR-кодирующих конструкций была подтверждена с помощью проточной цитометрии (FACS), а также путем оценки уровня лиганд-специфической активации по экспрессии маркера CD69. Цитотоксическая активность LT19-CAR-T против CD19⁺ клеток-мишеней HEK293T *in vitro* измерялась с помощью FACS и RTCA-анализатора iCelligence. Было показано, что оба варианта полученных CAR-T демонстрируют выраженную цитотоксичность *in vitro* в отношении CD19⁺ клеток. В настоящее время проводятся расширенные эксперименты по характеристике полученных конструкций, а также картирование эпитопа, узнаваемого LT19. Согласно предварительным данным, LT19 распознает эпитоп, отличный от фрагмента, узнаваемого МКА FMC63, которое используется в четырех CAR-T-препаратах, одобренных FDA для применения в клинике. Таким образом, CAR на основе LT19 может применяться в случаях, когда активность FMC63-CAR будет субоптимальной. Кроме того, полученные данные могут стать основой для разработки би-специфичных CAR. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №20-415-540024, 18-29-07025

N4-АЛКИЛЦИТИДИНЫ – ЭФФЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ-ДЕСТРУКТОРОВ

Л.А. Александрова¹, О.В. Шевченко¹, М.В. Ясько¹, С.Д. Негря¹, П.Н. Сольев¹, И.Н. Карпенко¹, О.В. Ефременкова², Д.А. Авданина³, Г.К. Нураева³, С.Н. Кочетков¹, А.А. Жгун³

¹Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН; ²НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе; ³ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Мицелиальные грибы (или плесень) вносят значительный вклад в разрушение объектов культурного наследия, в том числе, произведений масляной и темперной живописи. В связи с этим актуальной задачей является создание новых антисептиков широкого спектра действия, избирательно действующие на биодеструкторы и инертные в отношении самих материалов, из которых созданы произведения искусства [1]. Нами осуществлен дизайн и синтез репрезентативного набора производных 2'-дезоксцитидина с протяженными алкильными заместителями по N4 остатку основания и модификациями по 3' положению углеводного фрагмента [2]. Показана высокая ингибирующая активность ряда полученных соединений в отношении штаммов мицелиальных грибов, выделенных с произведений темперной живописи, представленных в коллекции Третьяковской Галереи (сублетальные дозы 0,3–0,7 мМ). Наибольшую активность проявили 3'-амино-N4-додецил-2',3'-дидезокси-5-метилцитидин и его 3'-аминоалкилированные производные. Оценена, так же, ингибирующая активность полученных соединений в отношении ряда грамположительных бактерий (в том числе, *Mycobacterium smegmatis* и *Staphylococcus aureus*, MIC=24–200 мМ). Наиболее перспективными являются соединения, содержащие гидроксильную группу в положении 3' нуклеозида, ввиду их сравнительно малой токсичности в совокупности со значительной активностью. Исследование проведено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00094).

[1] Zhgun et. al., *PLoS ONE*, 15 (2020), e0230591.

[2]. Alexandrova et. al., *Eur. J. Med. Chem.*, 215 (2021), 113212

РОЛЬ ЭРГОСТЕРИНА В РЕЗИСТЕНТНОСТИ ДРОЖЖЕЙ К ТРИТЕРПЕНЫМ ГЛИКОЗИДАМ

С.С. Соколов¹, Е.С. Глаголева², Д.А. Кнорре¹

¹Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и ²Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Тритерпеновые гликозиды — группа вторичных метаболитов растений, состоящих из агликона тритерпеновой природы с одним или несколькими остатками сахаров. Многие тритерпеновые гликозиды проявляют противогрибковую и антибактери-

альную активность. Наличие остатков сахаров предотвращает диффузию тритерпеновых гликозидов через плазматическую мембрану, поэтому их основной мишенью является плазматическая мембрана патогенов. Однако взаимосвязь между структурой тритерпенового гликозида, его биологической активностью и составом мембраны-мишени остаётся недостаточно изученной: большинство исследований выполнено на *in vitro* системах с искусственными мембранами, в то время как контролируемо изменять состав мембраны живой клетки технически сложно. В своей работе мы исследовали эффект трех тритерпеновых гликозидов женьшеня (гинзенозидов) на клетки дрожжей с мутациями, приводящими к изменению стеринавого состава плазматической мембраны. Мы исследовали три гинзенозида: с остатками сахаров, прикрепленными к агликону в положении С-3 (гинзенозид Rg3), С-20 (соединение К) и обоим положениям (гинзенозид F2). F2 проявлял большую цитостатическую активность в отношении дрожжей дикого типа, чем два других исследованных соединения. При этом прерывание биосинтеза эргостерина на этапе зимостерина за счет делеции гена ERG6, кодирующего дельта(24)-стерол-метилтрансферазу, приводило к увеличению цитостатического действия Rg3, но не остальных двух гинзенозидов. Делеции генов ERG2, ERG3, ERG5, ERG4, кодирующих ферменты, которые осуществляют последующие этапы биосинтеза эргостерина, не оказывали такого эффекта. Цитостатическое действие Rg3 и соединения К было значительно снижено в штамме UPC2-1, в котором нарушена система регуляции синтеза эргостерина, и поэтому увеличено его содержание в плазматической мембране. Наши результаты показывают, что изменения состава стерина плазматической мембраны живой клетки меняет профиль цитостатического действия гинзенозидов. Мы предполагаем, что, изменяя содержание различных тритерпеновых гликозидов в своих тканях, растения могут создавать оптимальные условия для роста одних микроорганизмов и подавлять рост других, в зависимости от состава и содержания стерина в их плазматической мембране.

НОВЫЕ ФЛЕКСИМЕРНЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕОЗИДОВ: ХИМИЧЕСКИЙ, ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОДЫ СИНТЕЗА

Е.С. Матюгина¹, Б.З. Елецкая², И.Д. Константинова², В.Барай³, А.В. Ажаев³, К.Л.Сили-Радке⁴, А.Р.Хомутов¹, С.Н. Кочетков¹, А.Л. Хандажинская¹

¹Институт молекулярной биологии РАН, Москва; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ³Меткинен Кемистри, Куопио Финляндия; ⁴Университет Штата Мэриленд, Балтимор, США

Аналоги природных гетероциклических оснований и нуклеозидов долгое время служили ключевыми химиотерапевтическими препаратами для лечения вирусных инфекций и рака. Проблемы, связанные с развитием лекарственной устойчивости, привели к дизайну нуклеозидов, способных обходить точечные мутации в активном центре фермента-мишени, тем самым обеспечивая механизм преодоления явления резистентности. Одними из таких соединений являются флексимеры - нуклеозиды, в которых гетероциклическое пуриновое основание расщеплено на два компонента, например имидазол и пиримидин. Гибкость подобных аналогов обеспечивает свободное вращение вокруг углерод-углеродной связи, позволяя флексимеру взаимодействовать с альтернативными аминокислотами в активном центре фермента, что ранее было недоступно для природного нуклеозида. Исследования показали, что повышенная гибкость нуклеозида обеспечивает более эффективное связывание с ферментом по сравнению с соответствующими ингибиторами с жесткой структурой. Мы представляем серию новых пиразол-содержащих флексимерных оснований и соответствующих аналогов 8-аза-7-деза нуклеозидов. Химический синтез оснований осуществлялся реакцией кросс-сочетания Сузуки-Мияуры. Рибо и 2'-дезоксирибо- флексимеры получали классическими методами гликозилирования аналогов гетероциклических оснований. Флексимерные основания оказались хорошими субстратами пуриннуклеозидфосфорилазы (PNP), что позволило с помощью реакции ферментативного трансгликозилирования синтезировать серию рибо- и дезоксирибонуклеозидов. Кроме того пиразол-содержащие флексимеры были получены с использованием клеток *E. coli*, экспрессирующих нуклеозидфосфорилазы. В результате сравнения трех методов синтеза целевых флексимеров предпочтительным для их наработки оказался биотехнологический подход, который позволил получить пиразол-содержащие β-D-рибо- и β-D-2'-дезоксирибо-флексимеры с чистотой > 97-99%. Изучение биологических свойств флексимерных оснований и аналогов нуклеозидов проводится в настоящее время. Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-10048).

С-МЕТИЛИРОВАННЫЕ АНАЛОГИ СПЕРМИНА: СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

М.А. Хомутов, А.И. Салихов, А.Р. Хомутов

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

Спермин (Spm, 1,12-диамино-4,9-диазадодекан) и спермидин (Spd, 1,8-диамино-4-азаоктан) вместе с их предшественником путресцином (1,4-диаминобутан) формируют группу биогенных полиаминов, жизненно необходимых для нормального роста клеток всех типов и присутствующих в них в μМ-мМ концентрациях. Исследование индивидуальных клеточных функций Spm и Spd затруднено легкостью их взаимопревращений и частичной взаимозаменяемостью. Кроме того, ферменты катаболизма полиаминов, помимо поддержания клеточного пула полиаминов на нормальном уровне, служат еще и источником токсичных перекиси водорода и акролеина. Все это делает создание функционально активных метаболитически устойчивых миметиков Spm весьма актуальным, а исследование их биологической активности позволит получить новую информацию о клеточных функциях полиаминов и ферментах их метаболизма [1]. Неизвестных ранее 2,11- и 3,10-диметилспермины и их диастереомеры были получены в результате конвергентных синтезов, исходя из соответствующих аминокислот [2, 3]. Исследование взаимодействия этих аналогов с ферментами метаболизма полиаминов и эффектов в культуре клеток показали, что биохимические свойства С-метилированных аналогов Spm можно регулировать, изменяя положение метильных заместителей [2]. Изменение конфигурации хирального центра позволяет регулировать свойства аналогов на более тонком уровне, что привело к (R,R)-1,12-диметилспермину, который оказался весьма полезен при изучении синдрома Шнайдер-Робинсона на модельных мышах [4]. Обсуждаются возможности создания новых химических регуляторов ферментов катаболизма Spm на основе его С-метилированных производных. Работа поддержана грантом РФФИ 17-74-20049.

1. Хомутов М.А. и соавт. “С-метилированные аналоги спермина и спермидина: синтез и биологическая активность”. *Биорг. химия*, 45, 588–614 (2019)
2. Khomutov M., et. al. “Unforeseen possibilities to investigate the regulation of polyamine metabolism revealed by novel C-methylated spermine derivatives”. *J. Med. Chem.*, 62, 11335-11347 (2019)
3. Хомутов М.А. и соавт. “Синтез (3R,10R)- и (3S,10S)-диастереомеров 3,10-диметилспермина”. *Биорг. химия*, 46(6), 686-692 (2020)
4. Murray Stewart T., et. al. “(R,R)-1,12-Dimethylspermine can mitigate abnormal spermidine accumulation in Snyder-Robinson syndrome”. *J. Biol. Chem.*, 295, 3247-3256

ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ЭВОЛЮЦИИ И БИОСИНТЕЗА ПОЛОВЫХ ФЕРОМОНОВ ZYGAENIDAE (LEPIDOPTERA)

К.А. Ефетов, Е.Е. Кучеренко

Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь

Эволюционные взаимоотношения в отряде Lepidoptera постоянно уточняются, так как изучение ядерных и митохондриальных генов, строения РНК, биохимии феромонов даёт возможность пересмотреть филогению Lepidoptera, первоначально основанную только на данных морфологии и биологии. Мы сопоставили химическое строение аттрактивных молекул у представителей семейства Zygaenidae и у систематически близких семейств Sesiidae и Cossidae, а также взятого в качестве сестринской группы семейства Tortricidae. К настоящему времени все известные половые феромоны и аттрактанты Zygaenidae представлены лишь двумя типами соединений: сложными эфирами бутанола-2 и ненасыщенных жирных кислот (характерны для подсемейства Procridae) и сложными эфирами уксусной кислоты и ненасыщенных жирных спиртов (характерны для подсемейства Zygaeninae). Алкенилацетаты являются половыми феромонами и/или аттрактантами у представителей всех вышеперечисленных семейств, поэтому с большой долей вероятности можно сказать, что указанная группа соединений – эволюционно более древняя, чем сложные эфиры бутанола-2 и жирных кислот. Появление последних в качестве половых феромонов является апоморфным признаком трибы Procradini подсемейства Procridae (строение аттрактивных молекул у Procridae известно только для представителей этой трибы).

В ходе анализа было отмечено структурное сходство углеводородных радикалов привлекающих молекул Zygaenidae и других Lepidoptera. Все известные половые феромоны и аттрактанты Zygaenidae имеют непределенный длинноцепочечный углеводородный радикал, содержащий двенадцать, четырнадцать или шестнадцать атомов углерода. Перечисленные особенности структуры характерны и для многих других представителей Lepidoptera. Общие правила строения половых феромонов и аттрактантов у видов разных семейств одного отряда являются отражением генетически детерминированных закономерностей, связанных с общим филогенетическим происхождением и, вероятно, объясняются особенностями биосинтеза компонентов половых феромонов и работой ферментов десатураз.

Малая изученность феромонных систем Zygaenidae осложняет анализ, тем не менее молекулярная структура аттрактивных соединений может быть дополнительным признаком для изучения родственных отношений между таксонами и реконструкции эволюции Lepidoptera.

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У ТЕЛОК ПРИ СТАНОВЛЕНИИ ПОЛОВОЙ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗРЕЛОСТИ

В.А. Сафонов

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж

Интенсивные процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) способны служить источником повреждения клеток и тканей, отрицательно сказываясь на здоровье животных. Процессы ПОЛ в норме уравниваются системой антиоксидантной защиты (АОЗ), представленной ферментативным и неферментативным звеньями. Целью нашей работы было изучение активности ферментов АОЗ у телок красно-пестрой и черно-пестрой пород. Исследование проводилось на базе племенхоза «Дружба», расположенного в Павловской районе Воронежской области. Оценку состояния АОЗ проводили в 9-10 месяцев – период становления половой цикличности (n=13), 14-15 месяцев – период стабилизации полового цикла (n=13) и в 18-20 месяцев – период достижения физиологической зрелости (n=13). Результаты анализа крови обрабатывались математическими методами, принятыми в биологических и ветеринарных исследованиях.

Нами было установлено, что становление половой и физиологической зрелости у телок проходит на фоне интенсивных процессов свободнорадикального окисления: уровень малонового диальдегида в 9-10 мес. равен $1,34 \pm 0,09$ мкМ/л и аналогичен таковому у коров во 2 мес. стельности, он возрастает по мере взросления животных, составляя в 14-15 мес. $1,63 \pm 0,12$ и в 18-20 мес. $1,69 \pm 0,11$ мкМ/л. По этой причине во время становления половой зрелости повышается активность каталазы с $32,5 \pm 0,94$ в 9-10 мес. до $33,9 \pm 2,25$ мМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{л} \cdot \text{мин}$ в 14-15 мес. и глутатионпероксидазы с $9,6 \pm 0,44$ в 9-10 мес. до $10,1 \pm 1,05$ мМ G-SH/л·мин в 14-15 мес. Уровень супероксиддисмутазы практически одинаков во все рассматриваемые периоды: в 9-10 мес. – $0,88 \pm 0,06$, в 14-15 мес. – $0,90 \pm 0,05$, в 18-20 мес. – $0,86 \pm 0,04$ усл.ед./мг Hb и соответствует физиологическому уровню. При достижении животными физиологической зрелости показатели ферментативного звена антиоксидантной защиты остаются на том же уровне, в некоторой степени возрастает активность каталазы – до $35,2 \pm 2,05$ мМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{л} \cdot \text{мин}$ в 18-20 мес.

Таким образом, полученные результаты показывают, что при достижении телками возраста 18-20 мес., что соответствует времени достижения физиологической зрелости, в их организме стабилизируется баланс перекисного окисления липидов и ферментативного звена АОЗ.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ ДИССОЦИАЦИИ КОМПЛЕКСОВ ДНК-АПТАМЕРОВ С РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИМ ДОМЕНОМ S-БЕЛКА ВИРУСА SARS-CoV-2

Ф.И. Грабовенко¹, Л.А. Абросимова¹, Т.С. Зацепин^{1,2}, М.Э. Зверева¹

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет; ²Сколковский институт науки и технологий, Факультет наук о жизни, Москва

Цель текущего проекта — разработка сенсорной системы прямого определения вируса SARS-CoV-2 с использованием метода гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). Для специфического узнавания вирусного S-белка планируется использовать аптамер с ГКР-активной меткой. Рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка SARS-CoV-2 играет ключевую роль в проникновении вируса в клетку-хозяина [1], и поэтому представляется потенциальной мишенью для создания методов детекции вирусных частиц. В исследовании [2] было описано получение ДНК-аптамеров, по мнению авторов, специфически связывающих RBD S-белка SARS-CoV-2. В связи с этим, важной подзадачей текущей работы было получить оценку специфичности взаимодействия иммобилизованных аптамеров из работы [2] с RBD и провести отбор новых аптамеров с большей специфичностью, чем у описанных ранее. Для этого было проведено планирование последовательностей и мест введения модификаций; были синтезированы биотинилированные олигонуклеотиды, моделирующие аптамеры из статьи [2]. Для оценки специфичности взаимодействия модифицированных аптамеров с RBD были определены константы диссоциации (Kd) соответствующих комплексов методом биослойной интерферометрии (BLI). Также был начат отбор новых аптамеров. В настоящей работе были подобраны условия проведения BLI-измерений: установлено, что в буфере, использованном в исследовании [2] для оценки величин Kd, наблюдается неспецифическое связывание RBD с поверхностью сенсора, которое может быть устранено включением TWEEN и BSA в состав буфера. Значения Kd комплексов аптамер-RBD, полученные в оптимизированных условиях, имели схожие порядки величин с константами, определёнными ранее в работе [2], что подтверждает высокую аффинность модифицированных аптамеров по отношению к белку RBD. Авторы выражают благодарность сотрудникам Сколтеха2 Денису Мельник и Наталье Логвиной за помощь в выделении белка и синтезе олигонуклеотидов. Работа поддержана грантом РФФИ: 20-04-60477.

1. Yao H. et al. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus // *Cell*. – 2020. – Т. 183. – №. 3. – С. 730-738. E13.
2. Song Y. et al. Discovery of aptamers targeting the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein // *Analytical Chemistry*. – 2020. – Т. 92. – №. 14. – С. 9895-9900.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ *M. TUBERCULOSIS* К БЕДАКВИЛИНУ И ЛИНЕЗОЛИДУ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПАХ

А.И. Уштанит, А.Н. Любимова, Д.В. Зименков

Центр высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Туберкулез каждый год уносит миллионы жизней во всем мире. Одним из основных факторов, определяющих успешность терапии, и снижающих вероятность трансмиссии опасных штаммов, является быстрое определение резистентности возбудителя к максимально большому количеству противотуберкулезных препаратов. Молекулярные методы широко применяются для детекции мутаций, приводящих к устойчивости *M. tuberculosis* к препаратам первого ряда – рифампицину, изониазиду, этамбутолу, и ряду резервных – фторхинолонам и инъекционным препаратам. Схемы терапии на основе бедаквилина и линезолида были введены в практику с 2014 года, и к настоящему времени, благодаря эффективности и безопасности, бедаквилин, линезолид и фторхинолоны нового поколения являются препаратами выбора для лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. Устойчивость к линезолиду обусловлена появлением мутаций в гене рибосомального белка rplC, или в гене rrl, кодирующем 23S рРНК. При этом доминирующей в клинических образцах заменой является замена С154R в RplC, обнаруживаемая в 70-80% устойчивых изолятов. Для гена rrl выявлено ограниченное разнообразие мутаций, локализованных в области пептидил-трансферазного центра. В случае бедаквилина, действующего на бактериальную АТФ-синтазу, помимо замен в с-субъединице, нарушающих связывание с мишенью, в устойчивых изолятах обнаруживается большое разнообразие мутаций в гене rv0678. Rv0678 – транскрипционный репрессор оперона mmpL5-mmpS5, кодирующего эффлюксный насос, обеспечивающий эффективный вывод бедаквилина из клетки. Был разработан биочип, позволяющий выявлять детерминанты устойчивости в бедаквилину и линезолиду, в частности, анализировать всю последовательность гена rv0678 за счет перекрывающихся олигонуклеотидных зондов. Разработанная система многопараметрического анализа была валидирована на 115 ДНК клинических изолятов, охарактеризованных как фенотипически, так и таргетным секвенированием детерминант устойчивости. Использование разработанного алгоритма обработки флуоресцентного сигнала обеспечивает выявление мутантных форм rv0678 в смешанных образцах. Внедрение разработанного метода дополнит ряд тест-систем на основе гидрогелевых биочипов, зарегистрированных и успешно применяющихся во многих лабораториях учреждений противотуберкулезной службы РФ.

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ СКРИНИНГА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ РНК-ТЕРАПИИ ДЛЯ FLNC КАРДИОМИОПАТИИ

Ю.В. Чуланова^{2,3}, М.Ю. Шубина^{1,2}, Т.В. Егорова^{1,2}, М.В. Бардина^{1,2,3}

¹Институт биологии гена РАН; ²ООО «Марлин Биотех»; ³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена РАН, Москва

Филамин С (ген FLNC) является белковым компонентом Z-дисков поперечно-полосатых мышц. Недавно у российского пациента с рестриктивной кардиомиопатией была выявлена уникальная гетерозиготная мутация FLNC с.7416_7418del. Учитывая доминантное проявление мутации, а также склонность мутантных форм филамина С к образованию агрегатов, предполагается, что патология развивается вследствие образования токсичного белкового продукта. Для таких мутаций может быть применен подход РНК-направленной терапии с селективным подавлением синтеза мутантной формы белка с помощью РНК-направленной терапии. В данной работе мы создали две упрощенные клеточные тест-системы для скрининга потенциальных препаратов РНК-терапии и проверили чувствительность обеих тест-систем с помощью двух контрольных shRNA. Первая тест-система основана на коммерческой плазмиде psiCHECK2, кодирующей люциферазы Renilla (RL) и Firefly (FL). В 3' некодирующую область RL вставили фрагмент гена FLNC (678 bp). Скрининг shRNA проводится путем ко-трансфекции с репортерной плазмидой в клетки HEK293T. Снижение активности RL свидетельствует об успешном таргетировании FLNC с помощью shRNA, активность FL служит внутренним контролем. Данная тест-система позволяет проводить быстрый скрининг потенциальных shRNA, однако лишь косвенно отражает снижение продукции мутантного филамина С. Для второй тест-системы полноразмерная кодирующая область гена FLNC (8178 bp) была заклонирована в экспрессионный вектор. При ко-трансфекции данных плазмид с shRNA-конструкциями, эффективность подавления FLNC можно оценивать на уровне РНК методом количественной ПЦР и белка с помощью специфических антител к филамину С (292 кДа). В люциферазной тест-системе успешное shRNA-индуцированное подавление транскрипта с участком FLNC приводило к снижению активности RL до ~15% от контроля. В системе с полноразмерным филамином контрольные shRNA снижали экспрессию РНК до ~5% и белка до уровня, недетектируемого с помощью Вестерн-блоттинга. В настоящее время мы проводим скрининг эффективных shRNA, обладающих селективностью для подавления экспрессии мутантного варианта FLNC с.7416_7418del, наиболее перспективные из которых могут быть использованы для создания генотерапевтического препарата.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОФЛЮИДНОГО ФОТОННО-КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА

Ф.В. Ширшиков, Т.В. Митько, Р.И. Шакуров, С.В. Сизова, Д.В. Басманов, Ю.А. Беспятых

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Эффективная молекулярная диагностика и типирование устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* играют важную роль в улучшении эпидемиологической ситуации по туберкулезу в России. Целью настоящего исследования стала разработка способа типирования микобактерий на платформе микрофлюидного фотонно-кристаллического биосенсора. Для сполитипирования штаммов *M. tuberculosis* были синтезированы 43 олигонуклеотидных ДНК-зонда для детекции спейсеров DR-локуса, последовательности которых опубликованы ранее (Bespyatykh et al., 2014). Дополнительно на 3'-конец зондов добавлялось несколько нуклеотидов, позволяющих увеличить сайт гибридизации с одноцепочечной ДНК спейсера до 20 пар оснований. Терминальный 3'-концевой нуклеотид зонда модифицировался биотином для иммобилизации на стрептавидине. При оптимизации методики в качестве мишени для зондов использовались синтетические олигонуклеотиды, комплементарные последовательностям спейсеров в геноме *M. tuberculosis*. Для перевода спейсеров в одноцепочечную форму планируется использовать двухстадийную ПЦР с использованием на первой стадии пары праймеров, комплементарных прямым повторам, а на второй стадии — по одному праймеру, комплементарному каждому спейсеру DR-локуса, с более низкой температурой отжига. Все эксперименты проводились с использованием биосенсора на поверхностных волнах в одномерном фотонном кристалле. В ходе данной работы осуществлен дизайн зондов для типирования возбудителя туберкулеза, подобрана их оптимальная длина для гибридизации с ДНК-мишенью. Экспериментально показано связывание с биосенсором модельных олигонуклеотидов. Предварительно были проведены эксперименты по модификации поверхности фотонного кристалла из диоксида кремния молекулами (3-аминопропил)триэтоксисилана, на который наносился слой насыщенного оксирановыми группами декстрана, необходимого для повышения сорбционной емкости биосенсора по отношению к стрептавидину. Таким образом, нами разработана методика дизайна зондов и предложена модельная система из олигонуклеотидов для детекции одноцепочечной ДНК из раствора с помощью фотонно-кристаллического биосенсора. Данный подход позволит в дальнейшем расширить панель диагностических зондов, в том числе для выявления маркеров резистентности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-75-10144.

ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАН, ИОННЫЙ БАЛАНС ЭРИТРОЦИТОВ И КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СПОСОБНОСТИ ГЕМОГЛОБИНА

В.Н. Бикеева, А.Н. Кукина, В.В. Ревин, Н.В. Громова, Ю.А. Мишина, А.В. Костяева

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск

Исследованы изменения липидного состава мембран, ионного баланса эритроцитов, показателей кислородсвязывающей способности гемоглобина в условиях различных значений pH среды. Объектом исследования служили эритроциты человека, полученные из цельной крови доноров (практически здоровые люди (n=47), мужского пола в возрасте от 23 до 42 лет). Исследование проведено с одобрения Локального этического комитета при Мордовском государственном университете. Эритроцитарную массу инкубировали в растворах суспендирования с разными значениями pH (норма – 7,35–7,4, алкалоз – 7,8 и ацидоз – 6,8), при стабильной температуре +37°. Время инкубации составило 15, 30 и 60 мин. Для выделения липидов из эритроцитов использовали метод Блайя–Дайера. Исследование кислородсвязывающих свойств гемоглобина эритроцитов выполняли

методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). Определение содержания ионов калия, натрия, магния и кальция в эритроцитарной массе крови человека проводили методом капиллярного электрофореза. Установлено, что при смещении pH среды инкубации эритроцитов в сторону как алкалоза, так и ацидоза снижалось количество таких фракций фосфолипидов, как фосфатидилэтаноламин, фосфотидилхолин, фосфотидилсерин и фосфотидоинозитол. Одновременно происходило увеличение количества лизоформ фосфолипидов. Также действие на эритроциты нефизиологических значений водородного показателя приводило к ионному дисбалансу. Так, при смещении pH в сторону ацидоза наблюдали снижение содержания в эритроцитах ионов натрия и калия и увеличение – ионов магния и кальция. В условиях алкалоза показаны противоположные изменения ионного состава. Исследование КР-спектров эритроцитов человека показало, что в условиях алкалоза увеличивались такие КР-соотношения, как I1375/(I1355+I1375) (относительное количество оксигемоглобина), I1355/I1550 (относительная способность всего гемоглобина в пробе связывать лиганды, в том числе и O₂), (I1355/I1550)/(I1375/I1580) (средство гемоглобина к лигандам, прежде всего к O₂), I1375/I1172 (выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец). Одновременно уменьшалась относительная способность гемоглобина выделять лиганды (соотношение I1375/I1580). В условиях ацидоза изменения данных показателей имели противоположную направленность.

АКТИВНОСТЬ ДНК АПТАМЕРА ИНГИБИТОРА ТРОМБИНА И ДРУГИХ АНТИКОАГУЛЯНТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Д.М. Никулина, Т.А. Шишкина, О.А. Волошан, О.В. Петрова, Д.А. Горшков, Л.И. Наумова
Астраханский государственный медицинский университет МЗ РФ, Астрахань

При коронавирусной инфекции в условиях гипоксемии широко применяются антикоагулянты. В ранее проведенных нами исследованиях *in vivo* было показано, что в группе изученных ДНК аптамеров ингибиторов тромбина наибольшей антикоагулянтной активностью обладал RE31. С учетом возможного влияния отрицательных внешних или внутренних факторов мы изучили в эксперименте на животных эффективность RE31 в условиях длительного хранения, на моделях животных с гипоксией и под воздействием сероводорода. Последний был выбран с учетом его ингибирующего влияния на систему цитохромов. Объектом сравнения был определен фондапаринукс (арикстра), препарат выбора в кардиохирургической практике на послеоперационном этапе. Оба антикоагулянта являются синтетическими препаратами.

Для оценки состояния системы свертывания крови использовали протромбиновое время (ПВ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). ПВ в комплексе с АЧТВ, характеризующим эффективность внутренних процессов свертывания крови, являются важными показателями образования сгустка крови. При длительном хранении (3 года) активность аптамера RE31 практически не изменилась.

В условиях длительной гипоксии (до 4 месяцев) показатели ПВ были близки контрольным значениям: опыт 15,04±0,69 и контроль 15,28±1,69. Все значения АЧТВ были в разной степени выше контрольных: от 229,48±21,01 до 31,87±2,92 против 29,96±3,76. В том же временном диапазоне воздействие сероводорода на фоне гипоксии дало некоторое удлинение ПВ, в среднем, до 17,20±2,25 при вышеуказанном контроле и значительное увеличение значений АЧТВ от 199,46±50,52 до 38,90±5,02 против контрольных 29,96±3,76. Введение аптамера RE31 при гипоксии привело к увеличению всех показателей по ПВ (до 21,17±1,99) и АЧТВ (до 155,17±46,18). При введении аптамера RE31 в условиях гипоксии+сероводород результаты были аналогичными по ПВ и более высокими по АЧТВ. Арикстра максимальную активность проявляет через 3 часа: плюс 18,8% к контрольному значению. При этом АЧТВ не дает значительных изменений. На фоне арикстра+гипоксии+сероводород показатели ПВ повышаются максимально на 41,6%, а АЧТВ на 138,14%.

Показано усиление биологического эффекта аптамера RE31 и арикстры в условиях гипоксии различного генеза, что необходимо учитывать при подборе и коррекции антикоагулянтной терапии.

КОНТРАКТИЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ COVID-19

Н.Г. Евтюгина¹, А.Д. Пешкова¹, С.И. Сафиуллина¹, С.С. Санникова², И.А. Андрианова¹, А.И. Хабирова¹,
Р.Р. Хисматуллин¹, Р.И. Литвинов¹

¹Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет; ²Городская клиническая больница № 16, Казань

COVID-19 – респираторная инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2. COVID-19 часто сопровождается тромбоцитопенией. Целью работы было изучение функционального состояния тромбоцитов при COVID-19, включая их сократительную способность, обусловленную актомиозиновым комплексом. Конракция тромбоцитов вызывает сжатие (ретракцию) сгустков крови и тромбов. Обследованы 235 пациентов в остром периоде COVID-19 со среднетяжелой и тяжелой формами болезни на фоне антикоагулянтной и иммуносупрессивной терапии. Функциональное состояние тромбоцитов изучали проточной цитометрией в сопоставлении с продукцией маркеров воспаления и тяжести заболевания. Сократительную функцию тромбоцитов оценивали по кинетике контракции сгустков крови в сочетании со сканирующей электронной микроскопией сгустков крови и изолированных тромбоцитов. Повышенная экспрессия Р-селектина и активного интегрина αIIbβ3 сочеталась с гиперпродукцией цитокинов, что указывает на воспалительную активацию тромбоцитов при COVID-19, что подтверждается их морфологическими изменениями по данным электронной микроскопии. У пациентов с COVID-19 была угнетена контракция сгустков крови, особенно при тяжелом течении заболевания и летальных исходах, а также при наличии сопутствующих заболеваний. Наблюдалось достоверное торможение всех стадий контракции: снижение средней степени и скорости контракции, уменьшение площади под кинетической кривой, а также удлинение лаг-периода. Строение и клеточный состав сгустков крови зависели от полноты контракции; сгустки со сниженной контракцией характеризовались высокой порозностью и низким содержанием многогранных эритроцитов (полиэдроцитов), деформированных в результате компрессии. Результаты показывают, что при COVID-19 происходит хроническая активация тромбоцитов с вторичной контрактильной дисфункцией. Нарушение контракции сгустков крови может быть одним из протромботических механизмов при COVID-19. Данные

подтверждают важную патогенетическую роль тромбоцитов при COVID-19 и обосновывают информативность лабораторного мониторинга гематологических показателей, включая кинетику контракции сгустков крови. Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства КФУ (Приоритет-2030) и грантов РФФИ 19-015-00075 и РНФ 21-75-00010.

ПРОТЕОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГРАДИЕНТА БЕЛКОВ В БИОПТАТАХ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ДВУХ ОТДЕЛОВ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

А.Л. Ковалева¹, Е.А. Полуэктова¹, М.А. Ковалева², Л.А. Новикова², Л.И. Ковалев²

¹Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) МХ РФ; ²Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Отделы кишечника человека выполняют разные функции желудочно-кишечного тракта, и, соответственно, кишечный барьер разных отделов должен иметь определенную специфичность белкового состава. Протеомные технологии позволяют оценить такую специфичность в образцах биопсий слизистой оболочки кишечника. В настоящее время известно только исследование протеомными технологиями градиента содержания муцинов (положительный градиент экспрессии в дистальном направлении ЖКТ) в разных отделах кишечника. Нами был проведен анализ белкового состава двумерным электрофорезом с масс-спектрометрической идентификацией специфичных фракций в образцах биоптатов слизистой оболочки двенадцатиперстной и сигмовидной кишки человека в норме (n=10) и при синдроме раздраженного кишечника (n=10), который показал градиентные отличия содержания не менее чем по 17 продуктам разных генов. Для 8 из них было идентифицировано наличие двух электрофоретических фракций (PDIA3, APOA4, ALDOB, ALDOA, 3 α -HSD, GSTA1, RBP2). Восемь из них относились к ферментам, продуктам генов PDIA3, APOA4, ALDOB, ALDOA, 3 α -HSD, CBR1, PSMA5, GSTA1, пять – продукты генов транспортных белков, APOA4, RBP2, FABP2, HNRNP2B1, PPIA. Также градиент выявлен для компонента прогестеронового рецептора – PGRMC2, субъединицы 0 митохондриальной АТФ синтазы – ATP5PO. Один представитель относился к белкам теплового шока – HSPA8, как и белок-регулятор SFN, а белок EZR можно отнести к структурным. Количественные различия содержания достигали 10-кратной величины в разных отделах кишечника по отдельным белкам. Продукты генов EZR, APOA4, ALDOB, 3 α -HSD, GSTA1, ATP5PO и FABP2 в биоптатах слизистой оболочки сигмовидной кишки не детектировались. По результатам компьютерной денситометрии в двенадцатиперстной кишке содержание альдолазы А составляет не более 15 \pm 1,5%, а 85% составляет альдолаза В. Эти результаты могут играть роль при проведении иммуногистохимического анализа образцов слизистой оболочки разных отделов кишечника и представлять определенный интерес для лучшего понимания механизмов развития заболеваний кишечника.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШЕЧНИКА У ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ И БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА

А.Л. Ковалева¹, Е.А. Полуэктова¹, М.А. Ковалева², Т.Ю. Исайкина², Л.И. Ковалев²

¹Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) МХ РФ; ²Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Синдром раздраженного кишечника (СРК) – одно из наиболее распространенных заболеваний желудочно-кишечного тракта у человека. В качестве потенциальных звеньев механизма развития заболевания в настоящий момент рассматривают нарушения кишечной проницаемости и кишечного барьера, в том числе за счет нарушения белков, формирующих плотные контакты. Протеомными технологиями (двумерным электрофорезом в сочетании с времяпротетной и тандемной масс-спектрометрией) были исследованы протеомные профили биоптатов слизистой оболочки двенадцатиперстной и сигмовидной кишки в контроле и у пациентов с СРК с преобладанием диареи. Был выявлен ряд количественных и качественных различий между контролем и пациентами по белку AGR2, печеночной изоформе белка, связывающего жирные кислоты (I-FABP или FABP-1), глутатион-S-трансферазе и ретинол-связывающем белке 2. У пациентов обнаружено наличие крупных фрагментов белковых продуктов генной экспрессии (29 генов) – HSPA5, NIPSNAP1, APOA1, POTE, CLCA1, hCLCA1, PNB, PDNB, SULT1A4, AKR7A2, NADH, ALDOB, PGK1, KRT1, KRT5, KRT10, KRT19, PDIA3, ACADS, ANXA2, FCGBP, PLC alpha, CAPZA1, AIMP1, AGR2, CTSD, CA1, LMNA, MZB1, свидетельствующих о повышенной скорости гибели энтероцитов. Также у двух пациентов было обнаружено гетерозиготное носительство с новыми вариантами аминокислотных замен, представленными в базе данных NCBI SNP, но пока не ассоциированными с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. У одного пациента в продукте гена ACADS (короткоцепочечной митохондриальной ацил-КоА дегидрогеназы) была выявлена аминокислотная замена 209G/S. Фермент связан с обменом короткоцепочечных жирных кислот, и, возможно, подобная замена может приводить к нарушению функции фермента. У другого пациента выявлена двойная аминокислотная замена в гене MYL6 (медленной легкой цепи миозина) в позициях 143-144FV/E-I/L. Данный ген вовлечен в регуляцию моторной функции, и его мутация также может быть ассоциирована с изменением моторики кишечника.

КЛЕТочНАЯ МОДЕЛЬ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ И ТУЧНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ АТЕРОГЕНЕЗА

О.Н. Мальцева, Д.А. Тянянский *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург*

Атеросклероз – хроническое заболевание с поражением крупных и средних артерий, сопровождающееся воспалительным процессом. Сосудистая система выстлана изнутри эндотелиальными клетками и обеспечивает транспорт различных молекул, включая провоспалительные медиаторы. Близость расположения тучных клеток к сосудистому эндотелию позволяет продуктам их секреции действовать непосредственно на стенку сосуда и эндотелиальные клетки, попадать в кровоток и распространяться, способствуя развитию местных и системных эффектов. Увеличение сосудистой проницаемости под действием

медиаторов воспаления, выделяемых тучными клетками, может вести к усилению трансэндотелиального транспорта и отложению липопротеинов в стенке сосуда. Таким образом актуальным является изучение молекулярно-клеточных механизмов влияния активированных тучных клеток на трансэндотелиальный транспорт атерогенных липопротеинов низкой плотности, который на данный момент слабо изучен. Целью работы было изучение влияния тучных клеток на эндотелиальные клетки *in vitro*. Была создана двухкамерная модель сокультивирования эндотелиальных и тучных клеток. Эндотелиоциты человека линии EA.hy926 культивировали в среде DMEM в трансвеллах до образования конфлюэнтного монослоя. В нижнюю камеру были помещены активированные тучные клетки человека линии НМС-1. В верхнюю камеру добавляли исследуемые вещества и проводили инкубацию в течение 24 часов с отбором проб из верхней и нижней камер. Проникновение анализируемых белковых молекул в нижнюю камеру через монослой предметом изучения. Пробы анализировали с помощью биохимических и иммунологических методов. Транспорт белка был рассчитан как процентное отношение количества белка в нижней камере к количеству добавленного белка. В нижней камере системы обнаруживались белковые молекулы, концентрация которых увеличивалась со временем. Контролем служил транспорт без эндотелиального монослоя, он был более стремительным. При добавлении в верхнюю камеру факторов воспаления трансэндотелиальный транспорт повышался. В присутствии тучных клеток в нижней камере наблюдалось снижение переноса белковых молекул. Полученные данные свидетельствуют об адекватности рассматриваемой модели для дальнейшего изучения влияния тучных клеток на барьерные функции эндотелия в условиях действия факторов атерогенеза.

ЛИРАГЛУТИД, СИНТЕТИЧЕСКИЙ АГОНИСТ РЕЦЕПТОРА ГЛЮКАГОН-ПОДОБНОГО ПЕПТИДА 1 ТИПА, СТИМУЛИРУЕТ РАЗВИТИЕ БЕЖЕВОГО ФЕНОТИПА У БЕЛЫХ АДИПОЦИТОВ 3Т3-L1

Е.Д. Мамонтова^{1,2}, С.С. Мичурина², Н.В. Подкуйченко², Е.Л. Соркина³, Ю.С. Стафеев², М.Ю. Меньшиков², М.В. Шестакова³, Е.В. Парфенова²

¹МГУ им. М.В. Ломоносова⁴ ²НМИЦ кардиологии МЗ РФ; ³НМИЦ эндокринологии МЗ РФ, Москва

Ожирение – одна из самых распространенных патологий среди населения, которая связана с разрастанием белой жировой ткани. Ее основная функция – запасание липидов. Другим типом жировой ткани является бежевая, которая может образовываться в результате трансдифференцировки белой. Одна из основных функций бежевой жировой ткани – диссипация энергии в тепло. Одним из возможных индукторов трансдифференцировки является синтетический агонист рецептора глюкагон-подобного пептида 1 типа лираглутид, препарат, который вводится пациентам с морбидным ожирением в виде подкожных инъекций. Таким образом, целью данной работы стало изучить локальный эффект лираглутида на белую и бежевую дифференцировки. Для этого мы дифференцировали преадипоциты 3Т3-L1 в белые и бежевые адипоциты согласно стандартным протоколам, к группе клеток в качестве индуктора добавляли лираглутид. Затем для качественной и количественной оценки адипогенеза проводили окрашивание липофильным красителем OilRed. Экспрессию белков-маркеров адипогенеза оценивали методом Вестерн блоттинг. В данной работе мы продемонстрировали, что лираглутид повышает количество белых адипоцитов, а также способствует образованию у них нескольких липидных капель, что является признаком бежевых адипоцитов. Лираглутид не влиял на экспрессию белка маркера адипогенеза PPAR γ ни в белых, ни в бежевых адипоцитах. Мы показали, что лираглутид усиливает экспрессию белка UCP-1 в белых адипоцитах. Это может свидетельствовать в пользу того, что лираглутид стимулирует формирование бежевого фенотипа у белых адипоцитов. Мы не наблюдали данные эффекты лираглутида на бежевых адипоцитах.

РОЛЬ ИМПОРТЕРОВ МЕДИ CTR1 И DMT1 В МЕТАБОЛИЗМЕ МЕДИ КЛЕТОК ЛИНИИ H1299

Ю.А. Орлов¹, Е.Ю. Ильичева^{1,2}, Е.А. Скоморохова^{1,2}, М. Броджини³, Л.В. Пучкова^{1,2}

¹Университет ИТМО, Санкт-Петербург; ²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; ³Институт фармакологии им. Марио Негри, Милан, Италия

Ионы меди (Cu) используются в качестве каталитического кофактора рядом жизненно важных купроэнзимов и играют роль аллостерического регулятора белков, контролирующих сигналинг и транскрипцию. Однако свободные Cu приводят к образованию активных форм кислорода, и поэтому токсичны. Отсутствие свободных Cu в клетке обеспечивается согласованной работой компонентов её транспортной системы. Импортёры Cu в клетку – ключевое звено этой системы. У человека описано два импортёра: CTR1, высоко аффинный транспортер меди, переносящий в клетку Cu(I), и DMT1, транспортер двухвалентных ионов металлов, через который переносится Cu(II). К настоящему моменту роли CTR1 и DMT1 изучены плохо. Остаются вопросы, связанные с внеклеточными донорами Cu для каждого из них, субстратной специфичностью и существованием селективных внутриклеточных акцепторов для Cu. Цель работы – изучить вклад CTR1 и DMT1 в клеточный импорт Cu, путём нокаута их генов. В работе клетки H1299 с делецией *CTR1*, *DMT1* или обоих генов сразу (DKO), получили, используя технологию CRISPR/cas9, все клеточные линии имели сравнимую скорость деления. Отсутствие одного из транспортеров влекло за собой повышение экспрессии другого, а также резкое падение концентрации Cu в цитоплазматической фракции и фракции внутриклеточных мембран, нокаут обоих переносчиков снижал этот показатель, по данным ААС, ниже фоновых значений. В то же время в митохондриях и ядрах клеток DKO количество Cu упало только на 50% от контрольного. Подобную картину наблюдали и в экспериментах с ионами серебра (Ag), которые электронно схожи с Cu(I), и потому часто используются для отслеживания путей переноса Cu. Исключением стало лишь то, что в случае Ag, нокаут CTR1 приводил к более существенному снижению концентрации металла, чем нокаут DMT1, что хорошо согласуется с данными о транспорте Cu(I) CTR1 и предпочтительности Cu(II) для DMT1. Нокаут CTR1 увеличивал активность гена HIF1 α (как и нокаут DMT1), снижал экспрессию SOD1, NF- κ B. Отсутствие DMT1 повышало экспрессию CCS и XIAP. Вероятно, что для некоторых акцепторов CTR1 или DMT1 служат специфическими донорами. Полученные результаты демонстрируют, что CTR1 и DMT1 лишь частично компенсируют функции друг друга и не являются единственными переносчиками Cu в клетку. *Работа поддержана грантом РФФИ № 19-315-90129.*

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА КОНТРАКЦИЮ СГУСТКОВ КРОВИ, ОПОСРЕДОВАННУЮ АКТОМИОЗИНОВЫМ КОМПЛЕКСОМ ТРОМБОЦИТОВ

А.Д. Пешкова, Н.Г. Евтюгина, Н.Н. Хаертдинов, Г.Ф. Ситдикова, Р.И. Литвинов

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

Нарушение обмена веществ с повышением уровня гомоцистеина в крови, известное как гипергомоцистеинемия (гГЦ), связано с риском тромботических осложнений. Несмотря на большое клиническое значение, связь между гГЦ и предрасположенностью к тромбозу недостаточно изучена. Одной из наименее исследованных реакций свертывания крови и тромбообразования является процесс спонтанного сжатия (контракции) сгустка крови под действием активированных тромбоцитов. Влияние гомоцистеина на контракцию сгустков крови было изучено *in vitro* на образцах крови человека и крыс, а также на экспериментальной модели гГЦ, в которой крыс кормили большими дозами метионина. Инкубация крови с экзогенным гомоцистеином в течение 1 минуты достоверно увеличивала скорость и степень контракции. Эти результаты согласуются с прямой активацией тромбоцитов под действием гомоцистеина, которая, по данным проточной цитометрии, проявлялась ~5-кратным увеличением фибриноген-связывающей способности тромбоцитов и ~2-кратным увеличением экспрессии P-селектина. Длительная 15-минутная инкубация крови с гомоцистеином приводила к дозозависимому снижению параметров контракции, вероятно, вследствие энергетического истощения активированных тромбоцитов. Результаты *ex vivo* показывают, что при умеренно повышенном (10–50 мкМ) и высоком (50–122 мкМ) уровнях гомоцистеина в крови крыс наблюдается повышение степени и скорости контракции, однако высокий уровень гомоцистеина сопровождался удлинением лаг-периода. Кроме того, гГЦ сопровождалась тромбоцитозом в сочетании со сниженным количеством эритроцитов и гипофибриногенемией. Эти данные дают основание предполагать, что при гГЦ тромбоциты активируются (прямо и/или косвенно), что приводит к увеличению степени и скорости контракции, особенно в сочетании со снижением уровня фибриногена и эритроцитов. В то же время чрезмерная активация тромбоцитов может привести к их истощению и нарушению сократительной способности, что делает сгустки крови и тромбы более крупными и блокирующими кровоток. Таким образом, гГЦ модулирует контракцию сгустков крови, которая представляет собой недооцененный про- или антитромботический механизм. *Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и гранта РФФИ 20-15-00100.*

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ОМЕНТИНА-1 И PPAR γ В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ОЖИРЕНИИ, МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

И.А. Побожьева^{1,2}, К.В. Драчева¹, А.А. Пантелеева^{1,2}, Д.Л. Бровин², Е.А. Полякова², О.Д. Беляева², О.А. Беркович², Е.И. Баранова², С.Н. Пчелина^{1,2}, В.В. Мирошникова^{1,2}

¹НИЦ «Курчатовский институт», Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина;

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

Оментин-1, один из важнейших адипокинов жировой ткани, является потенциальным биомаркером сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с ожирением. Рецептор PPAR γ , активируемый пролифератором пероксисом, обеспечивает транскрипционный контроль адипогенеза и секреции адипокинов. Целью данной работы было исследование экспрессии генов оментина-1 и PPAR γ в жировой ткани у пациентов с ожирением, метаболическим синдромом (МС) и ишемической болезнью сердца (ИБС). Образцы подкожной и висцеральной жировой ткани (ПЖТ и ВЖТ) были получены у 62 человек с/без ожирением и МС. Дополнительно были собраны образцы ПЖТ от 60 пациентов с ИБС. Уровни мРНК оментина-1 и PPAR γ определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Уровень оментина-1 в ПЖТ измеряли методом вестерн-блот. Уровень мРНК PPAR γ в ПЖТ был выше по сравнению с ВЖТ и положительно коррелировал с параметрами ожирения. Кроме того, уровень мРНК PPAR γ в ПЖТ был снижен у пациентов с ИБС и ожирением. Снижение соотношения уровня мРНК PPAR γ в ПЖТ к ВЖТ ассоциировано с увеличением уровня инсулина в плазме крови и индекса инсулинорезистентности НОМА-IR. Экспрессия гена оментина-1 была повышена в ВЖТ по сравнению с ПЖТ и не была ассоциирована с МС или ИБС. Уровень белка оментина-1 в ПЖТ был выше у мужчин. Были показаны гендерные различия: у мужчин наблюдалась отрицательная корреляция между уровнем мРНК PPAR γ в ПЖТ и уровнями мРНК и белка оментина-1, в то время как у женщин наблюдалась положительная корреляция между уровнями мРНК PPAR γ и оментина-1 в ПЖТ. Снижение уровня мРНК PPAR γ в ПЖТ ассоциировано с ожирением и инсулинорезистентностью. Гендерные особенности регуляции экспрессии гена оментина-1 могут быть связаны с активностью PPAR γ . Исследование поддержано грантом РФФИ (а 20-015-00502).

ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ, В ЧАСТНОСТИ АНТИНЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОЙ, АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ (*FUCUS VESICULOSUS* И *PELVETIA CANALICULATA*) И ГРАВИЛАТА РЕЧНОГО (*GEUM RIVALE*) В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

М.М. Грашина^{1,2,3}, А.А. Орлова⁴, М.Н. Пovyдыш⁴, Е.Р. Тараховская², В.С. Лемешева², Д.А. Мешалкина¹,

А.А. Фролов^{1,5}

¹Кафедра биохимии и ²Кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербургский государственный университет; ³Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Кафедра молекулярной биотехнологии; ⁴Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург; ⁵Leibniz-Institute of Plant Biochemistry, Department of Bioorganic Chemistry, ФРГ

Паркинсонизм – это сложный синдром, проявляющийся в виде различной степени двигательного дефицита, акинезией, ригидностью, тремором и постуральными нарушениями, а также других неврологических нарушений, которые становятся очевидными по мере прогрессирования заболевания. Основными патофизиологическими механизмами, лежащими в основе болезни Паркинсона, являются дисфункция митохондрий и окислительный стресс, приводящий к агрегации белков и гибели клеток. На данный момент большое внимание уделяется природным соединениям как потенциальному источнику новых

антинейродегенеративных препаратов. Полифенолы, в частности, танины растений и флоротанины бурых водорослей, привлекают особое внимание исследователей благодаря своим выраженным биологическим эффектам. Для изучения их нейропротекторных, в частности, анти-паркинсонических эффектов, нами были изучены этилацетатный и водный экстракты зеленых частей растения *Geum rivale* и экстракты талломов бурых водорослей *Fucus vesiculosus* и *Pelvetia canaliculata*. Для изучения нейропротекторных свойств экстрактов, нами была создана клеточная модель болезни Паркинсона. Для этого использовалась клеточная культура нейробластомы человека SH-SY-5Y, имеющая нейроноподобную морфологию после дифференцировки и имитирующая токсическое поражение дофаминергических клеток в присутствии параквата и образование альфа-синуклеин-позитивных цитоплазматических включений. С помощью теста цитотоксичности мы определили, что дифференцированные клетки стабильнее реагируют на паракват, чем недифференцированные. В ряде независимых экспериментов мы получили кривую «доза–эффект» и определили исходя из неё LD₅₀ для дифференцированных клеток, составившую 800 мкмоль/л. Модель была проверена на эталонных нейропротекторных соединениях – селегилине и ресвератроле. Анализы растительных изолоатов выявили отсутствие нейропротекторных свойств экстрактов гравилата. В свою очередь, экстракты клеточных стенок бурых водорослей показали значительную антипаркинсоническую активность, что, наиболее вероятно, связано с их выраженными антиоксидантными свойствами. Так, экстракты клеточных стенок были активны в интервале концентраций 0,001–0,1 и 0,001 до 0,002 мг/мл, соответственно.

ПРИМЕНЕНИЕ НОВОГО АКТИВАТОРА СИНТЕЗА МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО БЕЛКА HSP70 В КАЧЕСТВЕ ПОДХОДА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Е.А. Дутышева¹, М.А. Тресцова², Н.Д. Аксёнов¹, И.А. Утепова^{2,3}, В.Н. Чарушин^{2,3}, О.Н. Чупахин^{2,3}, И.В. Гужова¹, Б.А. Маргулис¹, В.Ф. Лазарев¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ²Уральский федеральный университет, Екатеринбург; ³Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

Болезнь Альцгеймера (БА) занимает первое по распространённости место среди нейродегенеративных заболеваний. Согласно современной амилоидной гипотезе, одной из основных причин заболевания является нарушение протеостаза, приводящее к отложению агрегатов патогенных белков β-амилоида и тау-белка внутри и вне нервных клеток, что влечёт за собой их дисфункцию и гибель с последующим прогрессированием когнитивной дисфункции. На данный момент лечение БА заключается только во временном облегчении симптомов заболевания. Белок-шаперон HSP70 (Heat shock protein 70), способен поддерживать клеточный протеостаз за счет регуляции фолдинга белков и направления на рефолдинг или деградацию белков с экспонированными гидрофобными последовательностями и дезинтеграции уже образовавшихся агрегатов. Противострессовая активность HSP70 заключается в блокировании выхода цитохрома C из митохондрий, предотвращении сборки апоптосом и активации caspase-3. Hsp70 играет немалую роль в регуляции стресса ЭР и сигналинга от TNF рецепторов. Ранее в нашей лаборатории было обнаружено безопасное соединение, индуцирующее синтез HSP70 в наномолярных концентрациях – пирролилхиноксалин (PQ29). Для проверки эффективности применения PQ29 в терапии БА, была сформирована модель заболевания с использованием дифференцированных в нейрональный фенотип мезенхимальных стволовых клеток человека (MSC-DP), культивируемых с амилоидным пептидом. Через 24 часа инкубации с 30 мкМ β-амилоида, в 4 раза увеличилось количество клеток с апоптозом, а через 50 часов индекс клеточного роста снизился на 25%. При этом добавление в этих же условиях PQ29 привело к снижению клеточной гибели до контрольных значений, а индекс клеточного роста возрос до 95%. Было также показано, что через 6 дней культивирования MSC-DP в присутствии β-амилоида интенсивность окраски β-галактозидазы увеличилась более чем в 2,5 раза. При внесении в культуральную среду с β-амилоидом PQ29 этот показатель стал сравним с контрольным значением. Таким образом, применение нового индуктора синтеза многофункционального цитопротекторного белка HSP70 приводило к увеличению жизнеспособности и уменьшению старения нейронов на клеточной модели болезни Альцгеймера. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда РФФ №18-74-10087.

МЕХАНИЗМЫ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ЭКЗОГЕННОЙ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

М.В. Зорин, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис, В.Ф. Лазарев Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Многие нейродегенеративные заболевания связаны с нарушением белкового гомеостаза клетки. Накопление белков ненативной конформации и их агрегирование может привести к протеотоксическому стрессу и гибели клетки. Одним из мажорных цитоплазматических белков является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), участвующая во многих метаболических и регуляторных процессах клетки. ГАФД является одним из «датчиков» стресса клетки, легко взаимодействуя с активными формами кислорода или азота. При окислении или нитрозилировании фермент теряет нативную конформацию и становится склонен к быстрому формированию агрегатов. Окисленная ГАФД также способна запускать апоптоз клетки. При массивном разрушении клеток, ГАФД, вместе с другими белками и органеллами, попадает в межклеточное пространство. Субъединицы фермента, способны проникать в цитоплазму соседних клеток-акцепторов, что приводит к их гибели. Такие процессы могут происходить вследствие черепно-мозговой травмы, инсульта и при нейродегенеративных патологиях. Однако механизмы цитотоксического действия ГАФД на неповреждённые клетки до сих пор неизвестны. Работа была выполнена на мезенхимальных стволовых клетках пульпы зуба человека MSC-DP, прошедших дифференцировку в нейрональный фенотип. Экзогенную ГАФД вносили в культуральную среду в концентрации 25, 50 и 100 мкг/мл в зависимости от эксперимента. Мы показали, что экзогенная ГАФД действительно проникает в клетки-акцепторы и обнаруживается в цитоплазматической и ядерной фракциях. С помощью ЛДГ-теста было показано, что культивирование перепрограммированных нейронов человека в присутствии экзогенной ГАФД в концентрации 100 мкг/мл вызывает гибель 25% клеточной популяции. Мы выяснили, что экзогенная ГАФД, проникнув в клетку, ко-локализуется с убиквитин-лигазой SIAH1 и транспортируется в ядро клетки. Внесение в культуральную среду ГАФД вызывает повышение количества мРНК проапоптотических генов белков PUMA, p21 и BAX в клетках-акцепторах. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 18-74-10087.

ПРЯМОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В СРЕДНИЕ ШИПИКОВЫЕ НЕЙРОНЫ СТРИАТУМА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

Н.А. Красковская¹, И.Б. Безпрозванный² ¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; ²Юго-Западный медицинский центр штата Техас, Даллас, США

В настоящем проекте разрабатывается новый подход к моделированию болезни Хантингтона (БХ) *in vitro*. При БХ в первую очередь поражаются средние шипиковые нейроны (СШН) стриатума, дегенерация которых приводит к нарушениям двигательной активности, семантически объединенных термином «хорея», которая является основным симптомом данного заболевания. Наиболее распространённым способом получения нейрональных клеток из соматических клеток пациентов является использование индуцированных плюрипотентные стволовые клеток (iPS). Однако применение iPS для моделирования возраст-ассоциированных нарушений имеет ряд недостатков, связанный с переходом через плюрипотентное состояние. Поэтому вопрос насколько «молодые» популяции нейронов, такие как iPS, моделируют патофизиологические процессы, происходящие в «зрелых» клетках при развитии БХ, остается открытым. Принципиально новый подход к моделированию БХ, основанный на прямом репрограммировании фибробластов пациентов в нейроны при помощи микро-РНК был предложен в качестве альтернативы iPS. Ключевым элементом данного подхода является сохранение всей эпигенетической информации и сохранение возраст-ассоциированного фенотипа, что позволяет изучать патофизиологические особенности развития заболевания на каждой стадии нейропатологии. В настоящей работе был оптимизирован оригинальный протокол репрограммирования, что позволило получить гомогенную популяцию СШН. В частности, >95% клеток окрашены на маркеры зрелых нейронов MAP2 и β -тубулин III. Кроме того, в оптимизированном протоколе >90% клеток окрашены на маркер нейронов стриатума – гаммааминомасляную кислоту (GABA) и маркер СШН белок DARPP-32, в отличие от оригинального протокола, где только 70% клеток окрашивались на GABA, и 60% окрашивались на DARPP-32. Кроме того, в условиях ко-культивирования с нейронами коры, репрограммированные СШН способны к формированию синапсов, что морфологически выразилось в появлении на дендритном древе СШН дендритных шипиков. Таким образом, модифицированный протокол позволяет получить гомогенную популяцию СШН, что существенно снижает вариабельность в функциональных исследованиях и облегчает интерпретацию полученных результатов, что может быть полезно при изучении возраст-ассоциированных молекулярных основ патогенеза БХ.

ИММУНОГЛОБУЛИНЫ G БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ И РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ ОБЛАДАЮТ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, ЗАВИСЯЩЕЙ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

И.А. Меднова¹, Л.П. Смирнова¹, Н.М. Кротенко², А.Р. Васильева², А.В. Семке¹, С.А. Иванова¹

¹НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ; ²Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Согласно результатам многочисленных исследований доказана патофизиологическая роль окислительного стресса в развитии многих заболеваний, в том числе рассеянного склероза (РС) и шизофрении (Ш). В 2020 году была выявлена супероксидсмутазная (СОД) активность IgG у больных с РС. В связи с этим было интересно в сравнительном аспекте оценить СОД активность IgG при Ш и изучить ее связь со стадией заболевания. Кроме этого, в работе были изучены каталитические свойства абзимов с СОД активностью. В исследование включили 45 больных РС (25 человек ремитирующим типом течения (РРС) и 20 человек с вторично-прогрессирующим типом течения (ВППС)), 66 больных Ш (33 в острой фазе (ОШ) и 33 в ремиссии (РШ)) и 34 здоровых добровольца (К). IgG из сыворотки крови выделяли с помощью аффинной хроматографии. Гомогенность препаратов антител доказывали с помощью электрофореза в ПААГ и высокоэффективной гель-фильтрации в условиях кислого шока. СОД активность IgG определяли спектрофотометрически. Кинетические параметры СОД реакции оценивали с помощью метода нелинейной регрессии с использованием программы OriginPro 8.6i в обратных координатах Лайнуивера-Берка. Ингибиторный анализ СОД активности абзимов проводился с использованием специфических и неспецифических ингибиторов. Доказано, что IgG Ш и РС обладают СОД активностью, которая является собственным свойством антител. СОД активность IgG у К оказалась в 4 раза ниже, чем у больных ВППС ($p = 0,002$) и в 2 раза ниже, чем у больных РРС ($p = 0,018$). Похожая тенденция наблюдалась при Ш: у больных с РШ выявлена максимальная СОД активность абзимов ($p=0,001$). Анализ кинетических параметров СОД реакции продемонстрировал более высокое значение K_m для IgG, чем для фермента СОД, что говорит о большем сродстве абзимов к субстрату. Специфический ингибитор СОД – триэтилентетрамин – в концентрации 50 ммоль полностью ингибировал СОД активность IgG, в то время как неспецифический ингибитор – ЭДТА в аналогичной концентрации ингибировала СОД активность IgG на 45%. Результаты ингибиторного анализа говорят о сходном механизме катализа абзимов и ферментов. На основании полученных данных можно предположить, что СОД активность IgG играет роль в защите от ОС при Ш и РС. *Работа поддержана грантом РНФ № 18-15-00053.*

ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ TRPA1 КАНАЛА КУРИЦЫ

Л.Ф. Мухаметшина^{1,2}, Г.М. Солюс², Д. Джаппи³, А.В. Розов³, О.В. Подгорный^{2,4}, В.В. Белоусов^{2,3,4}

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;

³Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России; ⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Одним из способов управления активностью нейронов является термогенетика. Суть метода заключается в том, что при нагревании клеток, экспрессирующих термочувствительные каналы надсемейства TRP, происходит повышение уровня цитозольного кальция, который в свою очередь выполняет роль важного вторичного мессенджера и активатора внутриклеточных процессов. Преимущество термогенетики перед оптогенетикой заключается в неинвазивном нагревании клеток с помощью инфракрасного излучения, которое хорошо проникает через ткани и менее фототоксичное, и в высокой проводимости каналов TRP по сравнению с проводимостью опсинов. Для термогенетической активации клеток млекопитающих порог активации канала должна лежать в узком диапазоне от 39 до 41–42°C. Перспективным кандидатом для этой цели является TRPA1 канал

курицы, температура активации которого по литературным данным составляет 40°C. В связи с этим в экспрессионный вектор была клонирована открытая рамка считывания TRPA1 канала курицы. Изначально активность канала тестировали на линейной культуре, где визуализацию ответа клеток наблюдали с помощью сенсора GCaMP6s, интенсивность флуоресценции которого увеличивается при связывании ионов кальция. В клетках линии HEK293, котрансфицированных экспрессионным вектором и кальциевым сенсором, статистически значимое повышение флуоресценции примерно в 2 и 3 раза наблюдали при нагревании клеток до 41°C и 43°C соответственно, в то время как при действии аллилизотиоцианата, химического агониста TRPA1 каналов, амплитуда ответа увеличивалась примерно в 4 раза. После тестирования активности канала на клетках линии HEK293, мы решили показать возможность стимуляции нейронов млекопитающих путем химической активации TRPA1 канала курицы электрофизиологическим методом. Для этого в первичной культуре нейронов гиппокампа эмбрионов мыши мы экспрессировали исследуемый канал. При действии аллилизотиоцианата регистрировали деплазматизацию плазматической мембраны трансфицированного нейрона и генерацию потенциалов действия. Таким образом, TRPA1 канал курицы проявляет функциональную активность при его гетерологичной экспрессии в клетках линии HEK293 и первичной культуре нейронов гиппокампа мыши, и данный канал может быть использован для термогенетической активации клеток млекопитающих.

АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ И ЭКСПАНСИЯ CAR-T КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИСКУССТВЕННЫХ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ

В.М. Украинская, А.В. Степанов *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва*

Развитие CAR-T терапии привело к немедленному успеху в лечении В-клеточных лейкозов и лимфом. Это также открыло возможности для разработки новых методов, направленных на лечение солидных опухолей. Производство функциональных CAR-T клеток требует надежных протоколов для *ex vivo* / *in vitro* экспансии модифицированных T-клеток. Этот шаг является непростым, особенно если для создания CAR-T клеток используются невирусные протоколы доставки с низкой эффективностью. Современные протоколы размножения CAR-T клеток основаны на инкубации с высокими дозами рекомбинантных цитокинов для поддержания пролиферации, неспецифической стимуляции поверхностными антителами для индукции перекрестного связывания TCR или ко-культивирования с антиген-экспрессирующими питающими клеточными линиями. Эти подходы несовершенны, поскольку неспецифическая стимуляция приводит к быстрому разрастанию CAR-отрицательных T-клеток, а удаление питающих клеток из смешанных культур требует дополнительных стадий очистки. Пытаясь разработать улучшенный протокол для CART клеточной экспансии, мы воспользовались преимуществами клеточных мембранных везикул и простыми структурными требованиями взаимодействия CAR с антигеном. Наш подход заключался в создании антигенных микросфер из обычных клеточных линий, стабильно экспрессирующих поверхностно-связанные антигены CAR (антигенные везикулы, AV), и последующее их использование для стимуляции и экспансии CAR-T клеток. Мы разработали быстрый, эффективный и недорогой способ для создания, стабилизации и очистки антигенных везикул. В качестве доказательства концепции мы протестировали специфичность наших везикул на нескольких парах CAR-антиген. Данные, представленные в этой работе, демонстрируют, что наш протокол производства антигенных везикул позволяет вызывать более сильную стимуляцию, пролиферацию и функциональную активность CAR-T клеток, по сравнению с уже существующими протоколами. Мы прогнозируем, что эта новая методология значительно улучшит возможность получения популяций функциональных CAR-T клеток для терапии. *Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 192904087_мк.*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА NAD В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ E14 В ПЛЮРИПОТЕНТНОМ И ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОМ СОСТОЯНИИ

М.В. Антипова¹, В.А. Куликова¹, М.П. Светлова¹, К.Б. Нериновский², А.П. Якимов^{1,3}, А.А. Никифоров¹

¹Институт цитологии РАН; ²Санкт-Петербургский государственный университет; ³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) играет ключевую роль в клеточном метаболизме и сигналинге. Известно, что NAD-зависимые процессы принимают участие в регуляции плюрипотентности и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток млекопитающих. Оптимальная концентрация NAD в клетках поддерживается путем его биосинтеза из различных предшественников. В данной работе, используя модель эмбриональных стволовых клеток мыши (мЭСК) E14 и метод количественной оценки метаболитов ЯМР-спектроскопией, мы охарактеризовали различия метаболического профиля мЭСК E14 в плюрипотентном и дифференцированном состоянии. Для поддержания плюрипотентности мЭСК E14 в среду добавляли фактор LIF, для запуска дифференцировки – ретиноевую кислоту. Мы показали, что концентрация тотального NAD в плюрипотентных клетках составляет 134,6 нмоль/мг, через 48 часов после запуска дифференцировки – 177,5 нмоль/мг, через 96 часов – 101,3 нмоль/мг. Чтобы оценить эффективность деамидированного и амидированного путей биосинтеза NAD, клетки инкубировали в стандартной среде с никотинамидом (Nam) в качестве единственного предшественника NAD. Чтобы подавить синтез NAD из Nam клетки обрабатывали ингибитором фермента NamPRT – FK866, что приводило к резкому снижению уровня NAD. Добавление амидированных (NR, NMN) предшественников к клеткам, обработанным FK866, восстанавливало NAD до контрольного уровня. После добавления деамидированных (NA, NAR) предшественников мы наблюдали накопление динуклеотида NAAD, который принимает участие во всех деамидированных путях синтеза NAD. Однако рост уровня NAD наблюдался незначительный. На основании этих данных можно предположить, что в мЭСК E14 активность фермента NADS, который катализирует образование NAD из NAAD, подавлена, что приводит к накоплению NAAD. Важно отметить, что значительное накопление NAAD также наблюдалось в плюрипотентных мЭСК E14, культивируемых в присутствии Nam, и без добавления деамидированных предшественников. Уровень NAAD падал в процессе дифференцировки и уже через 96 часов после добавления ретиноевой кислоты данный динуклеотид не детектировался. Возможно, NAAD в плюрипотентных клетках синтезируется по кинурениновому пути из триптофана через хинолиновую кислоту. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00319).*

РОЛЬ БИОСИНТЕЗА ГЕМА В МОРФОГЕНЕЗЕ И РЕАГРЕГАЦИИ КЛЕТОК ГУБОК (DEMOSPONGIA, PORIFERA)

Ю.Э. Ерюкова¹, Г.Р. Газизова², О.А. Гусев^{2,3}, Е.И. Шагимарданова², Ю.В. Люпина¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ³KFU-RIKEN Translational Genomics Unit, RIKEN National Science Institute, Yokohama, Japan

Кислород необходим клеткам живых организмов для обеспечения их энергией, но может наносить серьезный ущерб, участвуя в образовании свободных радикалов. Гем – простетическая группа, входящая в состав белков, присутствует в клетках всех живых организмов, в том числе у позвоночных и беспозвоночных животных. Губки (Porifera), одна из базальных групп многоклеточных животных, которая отделилась от общей ветви многоклеточных животных более восьмисот миллионов лет назад. Как древнейшие из Metazoa, клетки губок содержат самые древние гем-связывающие железосодержащие белки – нейроглобин и андроглобин, обладающие высоким сродством к кислороду по сравнению с другими глобиновыми белками. Отличительной особенностью губок является клеточная пластичность, способность к частичному или полному восстановлению тела из отдельных диссоциированных клеток, т.н. реагрегация. Реагрегация клеток губок – энергозатратный процесс, который требует участия кислорода и нейроглобина. В нашей работе мы исследовали роль активации пути биосинтеза гема в процессе реагрегации двух видов губок – морской *Halisarca dujardini* и пресноводной *Spongilla lacustris*, и последующего морфогенеза клеток, т.е. перехода клеток в дифференцированное состояние. Для этой цели мы использовали 5-ALA в качестве активатора биосинтеза гема и ингибитор ALAD (Morpholok-1) для его инактивации. Было установлено, что в процессе реагрегации в клетках морской губки *Halisarca dujardini* увеличивается скорость движения клеток, в них повышается плотность митохондрий и экспрессия нейроглобина по сравнению с такими же показателями в тканях тела. Методом транскриптомного и протеомного анализа выявлено изменение экспрессии ALAD в процессе формирования клеточных агрегатов через 24 часа после диссоциации. Клетки губок обоих исследованных видов при добавлении 5-ALA в инкубационную среду двигались менее хаотично, чем в контрольной группе, но морфологические параметры агрегатов через 24 часа после диссоциации не отличались от таковых в контрольной группе. Ингибирование биосинтеза гема снижало скорость движения клеток и нарушало начальные этапы образования агрегатов. Таким образом, активация цитозольного этапа биосинтеза гема играет ключевую роль в реализации пластичности клеток губок при реагрегации.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* КАК МЕХАНИЗМ КОЛЛЕКТИВНОЙ ЗАЩИТЫ ОТ АМФОТЕРИЦИНА В

Н.А. Киреева¹, С.С. Соколов², Е.А. Смирнова², К.В. Галкина^{1,2}, Ф.Ф. Северин², Д.А. Кнорре^{1,2}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Стресс-индуцированная гибель микроорганизмов — сложноорганизованный процесс, протекание которого зависит от функций многих генов. Так, например, делеция гена переносчика стерина LAM2 увеличивает выживаемость клеток дрожжей в присутствии высоких концентраций полового феромона и ксенобиотика амиодарона. Это можно объяснить как неоптимальной настройкой механизмов защиты в клетках дикого типа, так и их адаптацией: мертвые клетки могут способствовать выживанию живых за счет увеличенной абсорбции токсичных соединений из среды. Многие биохимические процессы продолжают идти в клетке даже после того, как она потеряла способность к пролиферации. Чтобы проверить, могут ли мертвые клетки защитить живые, мы сравнили выживаемость клеток *Saccharomyces cerevisiae* при воздействии ксенобиотиков в присутствии дополнительно добавленных живых или мертвых клеток. Мы различали исходно присутствующие в среде (исследуемые) и добавленные клетки с помощью селективных ауксотрофных маркеров. Добавление как живых, так и мертвых клеток увеличивало резистентность исходной культуры к гидрофобным токсинам и антимикотикам, а также сурфактантам. При этом, мертвые клетки защищали живые клетки от макролидных антимикотиков в значительно большей степени, чем эквивалентное количество живых клеток. Более того, добавление живых клеток $\Delta lam1 \Delta lam2 \Delta lam3 \Delta lam4$ и $\Delta rmp3$, сверхчувствительных к макролидному антимикотику амфотерицину В (AmB), предотвращало гибель клеток в исходной суспензии, обработанной AmB, более эффективно, чем добавление клеток контрольного штамма, устойчивого к AmB. Таким образом, повышенная чувствительность субпопуляции микроорганизмов к определенному антибиотику проявляла себя как элемент механизма коллективной защиты микроорганизмов от стресса. Мы предполагаем, что гибель клеток в присутствии макролидов сопровождается пермеабиллизацией плазматической мембраны, в результате чего во внешнюю среду экспонируются мембраны клеточных органелл, богатые эргостерином. При этом суммарная абсорбционная ёмкость клетки по отношению к амфотерицину В (суммарное количество сайтов доступного эргостерола) многократно возрастает. *Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ №18-14-00151.*

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ Sp/KLF В МОРФОГЕНЕЗЕ И РЕАГРЕГАЦИИ КЛЕТОК ГУБОК (DEMOSPONGIA, PORIFERA)

Г.А. Рубиновский¹, Г.Р. Газизова², О.А. Гусев^{2,3}, Е.И. Шагимарданова²

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ³KFU-RIKEN Translational Genomics Unit, RIKEN National Science Institute, Yokohama, Japan

Транскрипционные факторы играют ключевую роль в развитии многоклеточного организма. Эволюция многоклеточных животных связана с развитием совершенной системы регуляции экспрессии генов. Губки (Porifera), одни из самых древних ныне существующих многоклеточных животных, которые, предположительно обособились до становления тканевой организации. Они имеют более ограниченный набор транскрипционных факторов, чем билатеральные животные. Транскрипционные факторы семейства Sp/KLF (Kruppel-like factors) – белки с консервативным ДНК-связывающим доменом из трех цинковых пальцев на С-конце полипептидной цепи. KLFs могут как активировать, так и репрессировать экспрессию большого числа генов и, благодаря этому, регулируют различные клеточные процессы, контролируют пролиферацию клеток и

новообразования. На основе транскриптомных сборок для холодноводной беломорской губки *Halisarca dujardini* мы идентифицировали представителей семейства транскрипционных факторов KLFs и связанного с ним SP, провели филогенетический анализ и описали функциональные домены белков. В целом, губки имели более бедный репертуар белков семейства KLF и SP, чем билатеральные животные. Анализ дифференциальной экспрессии в ходе реагрегации губки после механической диссоциации показал участие некоторых транскрипционных факторов в процессах морфогенеза.

Hsp70 СПОСОБСТВУЕТ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОМУ ПЕРЕХОДУ В КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

С.А. Владимирова^{1,2}, А.Д. Никитина¹, Б.А. Маргулис¹, И.В. Гужова¹

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

Развитие колоректального рака на фоне гипергликемии связано с более агрессивным протеканием болезни и возникновением метастазов, в частности за счет запуска в клетках программы эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Во время этого процесса эпителиальная клетка претерпевает ряд изменений, которые способствуют приобретению ей мезенхимного фенотипа. ЭМП протекает под контролем факторов транскрипции (Snail, Slug, Twist), регулирующих экспрессию E-кадгерина и виментина. В процесс метастазирования вовлечено сразу несколько систем протеостаза, и мы изучили роль одной из них, основанной на Hsp70, в ЭМП. Мы исследовали роль Hsp70 в ЭМП, проанализировав влияние уровня этого белка на запуск данного процесса. Клеточную линию DLD1 с нокаутом Hsp70 и соединение U-133 использовали для изучения развития ЭМП в клетках с низким и высоким уровнями экспрессии Hsp70; для индукции ЭМП клетки в течение недели культивировали на среде с высоким содержанием глюкозы (80 мМ). После этого оценивали пролиферацию и миграцию клеток с помощью системы xCELLigence и теста на зарастание царапины. Для анализа изменения уровня маркеров ЭМП, а также локализации E-кадгерина, были использованы ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг и конфокальная микроскопия. Мы показали, что в условиях гипергликемии нокаут Hsp70 снижал подвижность клеток одновременно с уровнями мРНК маркеров ЭМП (Slug, Snail и Twist) в клетках DLD1. В то же время, обработка клеток U-133 повышала их миграционную активность вместе с другими маркерами ЭМП. Следовательно, снижая экспрессию Hsp70 в клетках карциномы, можно подавлять ЭМП. Затем мы изучили влияние фармакологических ингибиторов Hsp70 на ЭМП. Нами были использованы соединение PES для подавления шаперонной активности белка и CL-43 для подавления его синтеза. Используя те же методы, мы показали, что использование обоих ингибиторов привело к снижению миграции клеток, а также к восстановлению экспрессии E-кадгерина вместе со снижением уровня факторов транскрипции, модулирующих ЭМП. Мы пришли к выводу, что повышение экспрессии Hsp70 может способствовать ЭМП, в то время как использование ингибиторов данного шаперона может снизить риски метастазирования клеток колоректального рака у пациентов с диабетом. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-74-20161.*

КОМБИНАЦИЯ ДНКазы I И CART ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

Д.В. Волков, А.В. Степанов, А.Г. Габибов

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

Одним из перспективных направлений в терапии злокачественных новообразований является адаптивная иммунная терапия T-клетками, модифицированными химерными антигенными рецепторами (T-cells modified by chimeric antigen receptors, CART). Ключевым препятствием в CART терапии солидных опухолей является опухолевое микроокружение (tumor microenvironment, TME). Наряду с «ядром» из опухолевых клеток в TME имеется несколько слоев, включающих клетки иммунитета хозяина. Нейтрофилы тоже являются составной частью TME и вовлечены в развитие опухоли. В процессе нетоза – регулируемой формы гибели – они выделяют внеклеточные ловушки (NETs), содержащие наряду с нитями ДНК и гистонами разные гранулы и растворенные ферменты. Недавние работы показали, как NETs могут стимулировать развитие рака – разрывом межклеточных связей и изменением фенотипа клеток опухоли, захватом циркулирующих опухолевых клеток и препятствуя действию цитотоксических клеток иммунитета. Один из перспективных способов разрушения NETs – введение дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) I, которая значимо уменьшает их количество и способность опухоли к метастазированию. Цель нашего исследования – комбинация адаптивной иммунной терапии CART и ДНКазы I-ориентированного подхода для разрушения пространственной преграды из NETs в контексте TME.

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ОКСИЛИПИНОВ НА УРОВНЕ ТРАНСКРИПЦИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

М.В. Гурылева¹, Д.В. Чистяков², М.Г. Сергеева²

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным онкологическим заболеванием среди женщин. Среди молекулярных характеристик опухолей особое место занимают оксилипины – окисленные метаболиты полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), их биосинтез и метаболизм. Для оксилипинов характерны различные функции в патогенезе онкозаболеваний, такие как влияние на пролиферацию клеток или метастазирование. Известно, что изменения в метаболизме опухолей в значительной степени определяются на уровне транскрипции. Цель. Изучение роли оксилипинов в патогенезе РМЖ с использованием методов транскриптомного анализа и машинного обучения. Материалы и методы. Данные экспрессии генов были взяты из базы данных GEO (7 датасетов, 5670 образцов). При помощи алгоритма DESeq2 из списка генов, связанных с метаболизмом оксилипинов, были отобраны дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) между нормой и различными молекулярными подтипами РМЖ (Luminal A, Luminal B, Her2+, Basal-like). На отобранных генах были построены

классифицирующие модели RF на языке программирования R с использованием пакета randomForest. Отбор важных признаков производился алгоритмом Boruta, реализованном в R. Результаты. Было выявлено 48 ДЭГов, связанных с метаболизмом оксипиринов. Модель классификации опухолевых, прилегающих к опухоли и здоровых тканей имела сбалансированную точность разделения классов 0.98. Это указывает на важную роль оксипиринов в изменении опухолевого фенотипа и косвенно на изменение метаболизма оксипиринов в прилегающих к опухоли тканях. Модель классифицирующая молекулярные подтипы РМЖ указывает на значительную гетерогенность в метаболизме оксипиринов в люминальных подтипах. Среди наиболее важных генов экспрессия FABP7, FABP5, PLA2G7, PLAG2 была повышена в базальных подтипах, а гены ELOVL2, CYP4F8, FASN – повышены в люминальных подтипах РМЖ. Выводы. Выявлены наиболее важные ДЭГи метаболизма оксипиринов между образцами ткани РМЖ и здоровыми образцами, которые могут являться потенциальными мишенями для дальнейшей разработки направленной фармакотерапии рака молочной железы. *Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-29-01243.*

ИНГИБИРОВАНИЕ FLT3 У ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК TNP-1 СПОСОБСТВУЕТ ПРИОБРЕТЕНИЮ МАКРОФАГАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ И УСТОЙЧИВОСТИ К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОМУ АПОПТОЗУ

Я.В. Евстратова, М.И. Кобякова, А.И. Ломовский, Р.С. Фадеев

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Изучение механизмов устойчивости лейкозных клеток к цитокину TRAIL – одному из основных молекулярных эффектов противоопухолевого иммунитета, остается актуальной задачей. Ранее мы показали, что снижение экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL (DR4 и DR5) и, соответственно, повышение устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу, может происходить на фоне направленной дифференцировки лейкозных клеток в моноцитарно-макрофагальном направлении и при созревании моноцитов периферической крови в макрофаги. Известно, что FLT3-сигнальный путь может связывать дифференцировку клеток с чувствительностью к действию TRAIL через модуляцию DR4 и DR5. В данной работе мы изучили влияние ингибирования FLT3 на дифференцировку клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) TNP-1 в макрофагальном направлении и устойчивость к TRAIL-индуцированному апоптозу. В работе использовали клетки ОМЛ TNP-1. Ранее мы показали, что 98±1% популяции клеток TNP-1 несет FLT3. Для ингибирования FLT3 использовали высокоспецифичный ингибитор Quizartinib. Клетки TNP-1 инкубировали в течение 96ч. с 1µM Quizartinib (TNP-1Q). Анализ макрофагальной дифференцировки и экспрессию DR4, DR5 осуществляли методом проточной цитометрии с помощью панели моноклональных антител к CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD36, CD45, CD68, CD136, HLA-DR, а также к DR4 (CD261) и DR5 (CD262). Цитотоксическое действие izTRAIL оценивали по интенсивности восстановления клетками резазурина. Анализ экспрессии макрофагальных маркеров у клеток TNP-1Q в сравнении с контрольными клетками показал, что у 22±1% популяции клеток TNP-1Q появился маркер CD11b, у 9±1% маркер CD33 и увеличился % клеток, несущих HLA-DR с 21±1% до 34±2%. Анализ DR4 и DR5 показал, что у TNP-1Q снижается % клеток, несущих DR4 с 65±2% до 18±2%, и DR5 с 71±8% до 20±4% в сравнении с TNP-1. Полученные данные согласуются с анализом действия izTRAIL на данные клетки. Было показано, что 82±6% клеток TNP-1, и только 11±2% клеток TNP-1Q чувствительны к izTRAIL. Таким образом, ингибирование FLT3 у клеток ОМЛ TNP-1 приводит к приобретению макрофагальных признаков и устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу, что сопровождается снижением экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №20-34-90061.*

ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, Н.В. Литвяков

НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН, Томск

Целью представленного исследования явилось проведение полнотранскриптомного анализа опухоли молочной железы в процессе НХТ в зависимости от статуса гематогенного метастазирования. В исследование включены 60 больных РМЖ T1-4N0-2M0 (IIA–IIIB стадии) люминального В HER2-негативного подтипа, в возрасте 22–68 лет (средний 46,2±0,4). Все пациенты получали 4-8 курсов системной НХТ по схемам FAC, AC, CAX, CP, ACT, AT. Материалом для исследования служили парные образцы биопсийного материала до лечения и операционного материала для каждого из пациентов. Была выделена РНК из исследуемого материала при помощи набора RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany). Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводился на микрочипе Clarion™ S Assay human (ThermoFisher Scientific, USA). Анализ данных микрочипа осуществлялся при помощи программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0. Проведено сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии. Было показано, что количество дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) в опухоли до лечения у больных с наличием и без гематогенного метастазирования составило 24 гена (19 Up-regulated, 5 Down-regulated). После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с наличием и без гематогенного метастазирования различались по 154 ДЭГ (36 Up-regulated, 118 Down-regulated). Построение диаграммы Венна показало, что ДЭГ у пациенток с наличием/отсутствием гематогенного метастазирования до лечения и после НХТ пересекаются по 1 гену – EHD2 (19q13.33). Известно, что EHD2 может иметь важное значение в качестве фактора прогрессирования для пациенток с РМЖ. Было показано, что EHD2 является негативным регулятором миграции и инвазии в клетках рака молочной железы. Проведено сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии. *Благодарность: Работа поддержана грантом РФФИ 18-29-09131.*

КОНТРОЛИРУЕМЫЕ Т-КЛЕТКИ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ХИМЕРНЫМИ АНТИГЕННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ, НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА БАРНАЗА–БАРСТАР ДЛЯ АДОПТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА

Р.С. Калинин¹, В.О. Шипунова¹, Д.В. Волков¹, И.В. Черников², М.А. Зенкова², А.А. Шульга¹, С.М. Деев¹, А.В. Степанов¹, А.Г. Габиров¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

В борьбе с опухолевыми заболеваниями наиболее перспективным направлением персонализированной медицины является иммунная клеточная терапия с применением Т-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR-T). CAR-T терапия позволила добиться впечатляющих результатов в борьбе с гематологическими онкологическими заболеваниями. Однако широкое применение CAR-T терапии затруднено из-за осложнений, ассоциированных с неконтролируемой гиперактивацией и неспецифической цитотоксичностью. В результате чего возникает риск развития опасных для жизни побочных эффектов, таких как «цитокиновый шторм» и синдром лизиса опухоли. Поэтому сохранение возможности контролировать терапевтические клетки в режиме реального времени является крайне актуальной задачей. Для создания контролируемых CAR-T нами была изменена основная парадигма адоптивной клеточной терапии, которая подразумевает непосредственный контакт опухолевой клетки и CAR-T клетки. Новизна технологии заключается в применении третьего компонента, который является промежуточным звеном между раковыми и терапевтическими клетками. Модульность такого подхода также позволит расширить диапазон антигенов при использовании одних и тех же CAR-T клеток. Нами выбрана молекула-посредник в состав которой входит дарпин-миметик антитела, распознающий раковый антиген HER2 нео, и слитую с ним барназу (бактериальная РНКаза), которая специфически связывается со своим природным ингибитором – барстаром, он в свою очередь входит в распознающий домен CAR. Мы показали работу нашего подхода на репортерной клеточной системе на основе линии Jurkat с NFAT промотором, под которым стоит ген люциферазы, а также на настоящих CAR-T показали дозозависимую цитотоксичность. Стоит заметить, что без молекулы-посредника CAR-T анергичны, что в дальнейшем позволит сделать безопасную и контролируемую CAR-T терапию. Далее планируется провести эксперименты *in vivo*. Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 17-74-30019).

ХРОСОМНЫЕ ТРАНСЛОКАЦИИ ПРИ ЛИМФОМЕ МАНТИЙНОЙ ЗОНЫ ПРИВОДЯТ К ДЕРЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ И ИЗМЕНЕНИЯМ ЯДЕРНОЙ АРХИТЕКТУРЫ

А. Карпухина^{1,2}, Ф. Салл¹, О. Яровая², Е. Васецкий^{1,2}, Д. Жермини¹

¹UMR9018, Université Paris-Saclay, CNRS, Gustave Roussy, Villejuif, France; ²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Для многих гематологических и солидных опухолей характерны рецидивирующие хромосомные транслокации. Сбалансированные транслокации, часто наблюдающиеся в злокачественных новообразованиях лимфоидной природы, приводят к появлению двух абберантных производных хромосом (der) и часто сопровождаются гиперэкспрессией онкогена с одной из них. Большинство исследований сосредоточены именно на хромосоме, с которой гиперэкспрессируется онкоген, однако во многих случаях, например при мантийноклеточной лимфоме, гиперэкспрессии онкогена недостаточно для малигнизации, что указывает на наличие дополнительных факторов онкогенеза, потенциально на другой производной хромосоме. Мантийноклеточная лимфома (МКЛ) – агрессивная В-клеточная неходжкинская лимфома, которая в 85% случаев вызывается сбалансированной транслокацией t(11;14). Эта транслокация приводит к перемещению локуса 11q13, содержащего ген циклина D1 (CCND1), в локус 14q32, содержащий ген тяжелой цепи иммуноглобулина (IGH), и последующей гиперэкспрессии онкогена CCND1 с производной хромосомы 14 под влиянием энхансера в локусе IGH. Поскольку гиперэкспрессии CCND1 недостаточно для возникновения опухоли, в данной работе мы исследовали другую производную хромосому, der11. Вблизи точки транслокации на производной хромосомы 11 мы обнаружили 88 генов, которые были deregulированы как в клеточной линии лимфомы мантийной зоны (GRANTA-519), так и в В-клетках больных МКЛ. Мы обнаружили, что крупный участок der11, содержащий deregulированные гены, перемещается из своего нормального положения на периферии ядра в направлении к ядерному центру и ядрышку, где часть генов deregulируются под влиянием ядрышкового белка нуклеолина. Результаты данной работы могут помочь выявить неизвестные ранее онкогены, способствующие возникновению МКЛ, и понять механизмы их активации.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ ZMPSTE24 НА МИГРАЦИОННУЮ И РЕПАРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Т.У. Латыпова¹, С.В. Лаврушкина^{2,3}, И.И. Киреев^{1,2}

¹Биологический факультет; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и ³Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Механические свойства ядра определяются ядерной ламиной, состоящей из белков ламин А- и В-типа. Наибольший интерес представляют ламин А-типа, так как они вносят наибольший вклад в вязкоупругие свойства ядра. Снижение экспрессии ламин А-типа характерно для некоторых типов рака. Посредством этого ядро становится менее жестким, что приводит к увеличению инвазивной способности опухолевых клеток, так как ядро, будучи самой крупной и жесткой органеллой клетки, является лимитирующим фактором в процессе миграции. При нарушении процессинга преламина А, в частности ингибировании конечной стадии его созревания, осуществляемой Zn-металлопротеазой ZMPSTE24, сохраняется фарнезилный остаток на его С-конце. Так как посредством данного остатка возможно закоривание в ядерной оболочке, накопление преламина А приводит к изменению механических свойств ядра. Так, увеличение жесткости ядерной оболочки происходит при аккумуляции мутантной формы преламина А – прогерина. Мы предположили, что накопление нормального преламина А приводит к схожим результатам. В качестве ингибиторов конечной стадии созревания преламина А мы использовали лопинавир и батимастат. Для оценки миграционной способности опухолевых клеток линии HT1080 при воздействии ингибиторов мы

использовали две модели: гель на основе коллагена I типа и камеры Бойдена. Накопление преламина А привело к снижению скорости миграции клеток и способности к прохождению через поры фильтров камер Бойдена. В процессе миграции опухолевые клетки зачастую находятся под влиянием механического стресса, что может приводить к разрыву ядерной оболочки, повреждениям ДНК и, как следствие, увеличению генетической нестабильности клеток. С помощью окрашивания клеток на маркер двухпочечных разрывов γ H2AX мы показали, что при накоплении преламина А происходит увеличение доли клеток со спонтанными повреждениями ДНК. С другой стороны, такие клетки менее подвержены повреждениям ДНК при прохождении через узкие поры камер Бойдена. Таким образом, лопинавир и батимастат представляют собой потенциальные препараты для антиопухолевой терапии так как они не только снижают миграционную способность опухолевых клеток, но и предположительно увеличивают их устойчивость к повреждениям ДНК. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (17-15-01290) и РФФИ (19-015-00273).*

МЕЛАТОНИН УСИЛИВАЕТ ДЕЙСТВИЕ АВТ-737 НА КЛЕТКИ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА ТНР-1

А.И. Ломовский, Ю.Л. Бабурина, Я.В. Евстратова, М.И. Кобякова, Р.С. Фадеев, О.В. Крестинина

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Поиск и исследование механизмов действия новых препаратов для терапии острых миелоидных лейкозов является актуальной задачей. Одним из таких препаратов является – мелатонин (МЕЛ) (N-ацетил-5-метокситриптамин) – гормон, секретруемый шишковидной железой. Известно, что помимо биологических функций, МЕЛ проявляет противоопухолевое действие при раковых заболеваниях. Ранее мы показали, что МЕЛ в концентрации 1 мМ снижал пролиферативную активность клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) на модели клеточной линии HL-60. Также МЕЛ вызывает снижение мембранного потенциала митохондрий и активацию продукции активных форм кислорода (АФК). МЕЛ способен усиливать действие препаратов таких как ретиноевая кислота (АТРА), цитарабин и навитоклак-737 (АВТ-737). В данной работе мы исследовали действие МЕЛ и его совместное действие с таргетным препаратом АВТ-737 на модели клеток ОМЛ линии ТНР-1. Анализ цитотоксичности оценивали по интенсивности восстановления клетками резазурина и окрашиванием клеток трипановым синим. Анализ изменения мембранного потенциала митохондрий и продукцию АФК проводилось по интенсивности флуоресценции красителей DiOC6(3) и DCFDA. Показано, что при инкубации клеток с МЕЛ в концентрации 1 мМ и сниженной концентрации АВТ-737 – 2 мкМ в течении 24ч способствовало снижению прироста клеток на 30% и 3%, соответственно, но действие данных веществ не приводило к гибели клеток. Однако совместное применение привело к снижению пролиферативной активности клеток на 50%, при этом вызвало гибель 20% клеток. Далее было обнаружено, что МЕЛ способствует снижению мембранного потенциала в 2 раза и приводит к повышению продукции АФК примерно в 6 раз. АВТ-737 не оказывал влияния на мембранный потенциал митохондрий и продукцию АФК. При совместном действии МЕЛ и АВТ-737 изменения мембранного потенциала и продукции АФК были близки с действием одного МЕЛ. Таким образом, МЕЛ оказывает антипролиферативное действие на клетки ОМЛ линии ТНР-1. Так же МЕЛ вызывает нарушение функционирования митохондрий приводя к снижению мембранного потенциала и активации продукции АФК, что может привести к окислительному стрессу. МЕЛ может усиливать действие АВТ-737, вызывая гибель клеток. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90014.*

ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРА СИНТЕЗА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ШАПЕРОНОВ CL-43 В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВА АДЪЮВАНТНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

А.Д. Никитина¹, С.А. Владимирова^{1,2}, Н.Е. Кокорева^{1,2}, Б.А. Маргулис¹, И.В. Гужова¹

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

Шаперонная система – одна из наиболее действенных цитопротекторных систем клетки основана на белке теплового шока 70 (HSP70). С помощью этой системы у клетки вырабатывается устойчивость к многочисленным стрессовым факторам физико-химического происхождения и к широкому кругу противоопухолевых терапевтических средств. Это приводит к снижению эффективности препаратов, в частности цитостатиков и индукторов апоптоза. Поэтому исследователи приходят к выводу, что увеличить эффективность химиотерапии можно за счет снижения уровня шаперона в клетке, то есть применения ингибитора синтеза HSP70. Один из таких ингибиторов был найден нами и представляет собой соединение из группы карденолидов, получившее название CL-43. Целью нашей работы было исследовать эффективность комбинирования названного ингибитора CL-43 с другими препаратами мешенного характера при подборе терапии колоректального рака. Для того, чтобы максимально приблизить наше исследование к клиническим, мы получили 2 линии клеток опухоли кишечника с разными клиническими оценками туморогенности – HCC8 (T3NxMx) и HCC9 (T2N0M0). С помощью метода иммуноблотинга мы показали, что применение CL-43 приводит к снижению HSP70 в клетках на 50% в обеих линиях. В качестве второго компонента комбинации мы исследовали два препарата мешенного характера: хлорохин (ингибитор аутофагии) и PAC1 (активатор каспазы-3). С помощью прибора xCELLigence, мы установили, что применение комбинации CL-43 с хлорохином оказалось наиболее эффективным, поскольку оба препарата по отдельности не оказывали существенного токсического воздействия, однако их комбинация уже через 20 часов приводила к гибели 93% и 86% популяции для линий HCC8 и HCC9 соответственно, что свидетельствует о синергетическом эффекте. Комбинация CL-43 с PAC1 была менее эффективна, но в тоже время существенно снижала темпы пролиферации опухоли, при отсутствии токсического эффекта обоих препаратов. Таким образом мы показываем, что использование комбинаций на основе CL-43 может быть эффективной мерой при подборе терапии колоректального рака. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-74-20161.*

ВЛИЯНИЕ МНОГОКРАТНОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

М.О. Политко¹, А.Ю. Цидулко¹, О.А. Пашковская², А.И. Прокаева¹, Д.К. Соколов¹, А.А. Жеравин², Э.В. Григорьева¹
¹ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины; ²НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, Новосибирск

Лучевая терапия является неотъемлемой частью современного метода лечения злокачественных опухолей головного мозга, но, несмотря на активную адъювантную радиохимическую терапию, у большинства пациентов в течение первого года развивается рецидив заболевания. Чтобы повысить эффективность проводимой терапии, необходимо исследовать молекулярные механизмы воздействия облучения на нормальную ткань головного мозга. Ранее нами было показано, что облучение влияет на экспрессию коровых белков протеогликанов (ПГ), однако его влияние на углеводные цепи гликозаминогликанов оставалось неизученным. В данной работе было исследовано влияние облучения на гликозилированные компоненты внеклеточного матрикса здоровой ткани головного мозга – хондроитинсульфат (ХС) и гепарансульфат (ГС). Для этого проводили облучение головного мозга мышей C57BL/6 (3 раза с интервалом 24 часа, разовая доза 7 Гр) на линейном ускорителе ElektaAxesse. Содержание ХС и ГС определяли методом дот-блот с использованием специфических антител на углеводные эпитопы ХС и ГС через 24, 48 и 72 часа после облучения. Облучение не влияло на содержание ХС, однако приводило к снижению содержания ГС в 1,5 раза в коре головного мозга животных. Молекулярные механизмы такого снижения ГС могут быть связаны с подавлением транскрипционной или ферментативной активности системы биосинтеза ГС, либо со снижением экспрессии коровых белков ГСПГ. Однако согласно данным ОТ-ПЦР транскрипционная активность генов ферментов биосинтеза ГС и коровых белков основных ПГ не изменялись. Вероятно, показанное снижение содержания ГС после облучения определяется снижением ферментативной активности ферментов биосинтеза ГС, что является предметом наших дальнейших исследований. В целом, полученные результаты впервые показывают, что многократное облучение ткани головного мозга экспериментальных животных приводит к изменению содержания гликозилированных компонентов нормальной ткани мозга, что может вносить свой вклад в трансформацию внеклеточного матрикса ткани головного мозга в про-опухолевое микроокружение. *Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект №18-29-01036).*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ВОСПАЛЕНИЯ И ОПУХОЛЕВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

И.А. Савин, А.В. Сенькова, А.В. Марков, М.А. Зенкова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Воспаление является универсальным ответом организма, направленным на экзогенные и эндогенные факторы. Длительная персистенция воспаления приводит к его хронизации. В свою очередь, хроническое воспаление является основным источником инициации опухолевой трансформации и развития опухоли. Более того, рост опухоли сопровождается иммунными нарушениями, которые приводят к уклонению опухоли от иммунного надзора. Этот процесс поддерживает хроническое воспаление и обуславливает дальнейшие сбои в работе иммунной системы, что замыкает цикл воспаление-нарушение иммунитета-прогрессирование опухоли. В настоящее время перспективным направлением терапии воспалительных и опухолевых заболеваний является ген-направленная терапия. В данной работе с помощью биоинформатического анализа баз данных полногеномного микрочипирования были отобраны потенциальные гены мастер-регуляторы острых и хронических воспалительных процессов, а также связанных с ними опухолевых заболеваний (Timp1, Trem2, C3, Elane, Serpina3, Adam8, Zfp281, Tyrobp, Irf8). Для валидации данных биоинформатического анализа использовали мышиные модели овалбумин-индуцированной астмы, колита и колит-ассоциированного рака. Уровень экспрессии потенциальных генов мастер-регуляторов оценивали в тканях легких и кишечника с помощью метода qRT-PCR с зондами TaqMan. При остром воспалении наиболее up-регулируемыми оказались гены, участвующие в регуляции внеклеточного матрикса и межклеточных взаимодействий (Timp1, Adam8), а также гены, важные для иммунного ответа и воспаления в целом (C3, Trem2). Экспрессия данных генов была наиболее повышена при колите и оставалась на высоком уровне при хронизации воспаления и развитии аденом в кишечнике, что делает перспективным их использование в качестве мишеней для ген-направленной терапии острого и последующего хронического воспаления, приводящего к онкотрансформации. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-74-30011.*

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СТРОМА-АССОЦИИРОВАННЫХ ПРОМОТОРОВ В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ ОРГАНИЗМЕ *Danio rerio*

П.И. Селина¹, А.И. Куртова², Е.Е. Воронежская², В.В. Плешкан¹, С.В. Костров¹

¹Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт»; ²Институт биологии развития им. Н.К. Колцова РАН, Москва

Разработка генетических конструкций, содержащих промоторы, ассоциированные с элементами опухолевой стромы, является перспективным направлением комплексного терапевтического воздействия на ключевые компоненты опухолевого очага. Нами проанализирована эффективность функционирования экспрессионных конструкций, содержащих в своем составе ранее охарактеризованные с использованием клеточных культур промотор гена фактора роста соединительной ткани (CTGF) и промотор гена белка активации фибробластов (FAP) человека, в организменной модели *Danio rerio* при введении в желток оплодотворенных яйцеклеток до первого деления дробления. Оценка уровня экспрессии трансгена, находящегося под контролем анализируемых промоторов, проводили с использованием гена люциферазы светлячка *Photinus pyralis*. Показано, что уровень люциферазной активности, обеспечиваемой конструкцией с CTGF промотором, значительно не изменялся в период наблюдения и статистически не отличался от активности, обеспечиваемой контрольным вектором с промотором предранних генов цитомегаловируса человека (CMV). В случае введения плазмиды с промотором FAP наблюдали выраженную динамику накопления активности люциферазы. Люминесцентный сигнал увеличивался в 45 раз за период от 24 до 96 часов после введения векторной ДНК и достигал значений, сопоставимых с уровнями, обеспечиваемыми конструкциями с CTGF и CMV

промоторами. При использовании репортерного гена зеленого флуоресцентного белка было обнаружено, что в период от 24-ого до 96-ого часов после введения вектора происходит значительное увеличение количества экспрессирующих маркерный белок клеток, по-видимому, связано с пролиферацией определенной клеточной популяции во время эмбрионального развития. Полученные данные демонстрируют, что при оценке перспективности применения строма-ассоциированных промоторов в организменных системах необходимо учитывать соотношение различных популяций клеток и его изменение во времени, вносящие существенный вклад в эффективность функционирования промоторов в мультипопуляционной системе. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-15-00317.*

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ ТЕМОЗОЛОМИД МОДУЛИРУЕТ ТРЕВОЖНОСТЬ И ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СТАРЫХ КРЫС W1STAR

А.В. Суховских^{1,4}, Г.М. Казанская¹, С.В. Айдагулова², Д.К. Соколов¹, В.С. Ушаков¹, М.О. Политко¹, Н.В. Михневич¹, Е.Э. Кливер³, О.П. Молодых¹, Е.В. Колдышева¹, Э.В. Григорьева^{1,4}

¹ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины; ²Новосибирский государственный медицинский университет МЗ РФ; ³НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ; ⁴Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск

Темозоломид (ТМЗ) – алкилирующий противоопухолевый препарат, используемый для лечения злокачественных опухолей. Однако помимо цитостатического воздействия на опухолевые клетки, длительное применение ТМЗ вызывает тревожно-депрессивные расстройства, молекулярные механизмы возникновения которых изучены недостаточно. Мы предположили, что возникновение таких расстройств может быть связано с индуцированным ТМЗ нарушением структуры ткани головного мозга, в частности с изменением содержания основных гликозилированных компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) – хондроитинсульфат протеогликанов (ХСПГ). Целью данной работы являлось изучение влияния длительного применения ТМЗ на экспрессию ХСПГ, структуру ВКМ и тревожность старых крыс.

Старые крысы Wistar получали ТМЗ в течение четырех месяцев, тревожность и двигательная активность животных были изучены с помощью тестов приподнятого крестообразного лабиринта и открытого поля. Структуру ткани головного мозга оценивали на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином; анализ экспрессии основных ХСПГ (декорин, бигликан, люмикан, бревикан, нейрокан, агрекан, версикан, CSPG4/NG2, CSPG5, фосфакан) проводили методами ОТ-ПЦР и иммуногистохимии. Длительное введение ТМЗ приводило к увеличению показателей тревожности и снижению двигательной активности животных. Гистологический анализ коры головного мозга не выявил морфологических изменений (некрозов, отека нейроглии и серого вещества, кровоизлияний), однако была обнаружена тенденция к увеличению количества астроцитов. Общий паттерн ХСПГ в коре головного мозга под действием ТМЗ изменялся за счет значительного снижения экспрессии агрекана как на уровне мРНК (в 10 раз), так и на уровне его белковой молекулы (в 2,5 раза) и снижения содержания углеводных цепей ХС. Изменение состава гликозилированных компонентов ВКМ было ассоциировано с повышением тревожности и снижением двигательной активности животных.

Таким образом, полученные результаты впервые выявляют ХСПГ как одну из мишеней ТМЗ. Изменение экспрессии ХСПГ может вносить вклад в появление психогенных расстройств, что необходимо учитывать при терапии злокачественных опухолей. *Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект №19-75-00051). А.В. Суховских поддержана стипендией Президента Российской Федерации (СП-1816.2019.4).*

ИММУНОГЕННОСТЬ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НЕОАНТИГЕННОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА В МОДЕЛИ МЕЛАНОМЫ B16F10 У МЫШЕЙ

Е.И. Ушакова, Е.С. Лебедева, А.А. Федорова, А.В. Пичугин, Ф.Е. Френкель, М.М. Шмаров, Р.И. Атауллаханов

Отдел иммунной биотехнологии, ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва

Конструирование персонализированной терапевтической вакцины на основе неоантигенов опухоли – одно из новых и эффективных направлений в иммунотерапии злокачественных новообразований. Мы исследовали иммуногенность и протективные свойства профилактической неоантигенной вакцины на основе рекомбинантного аденовирусного вектора, кодирующего *Kif18B* (K739N) – уникальный мутационный неоантиген меланомы B16F10. Вакцину Ad-B16F10 использовали с молекулярным TLR4-адьювантом «Иммуномакс».

Вакцинный препарат Ad-B16F10 представляет собой рекомбинантный нереплицирующийся вектор на основе аденовируса человека 5 типа со вставкой экспрессионной кассеты ДНК, кодирующей мутацию в гене *Kif18B* (K739N). Ad-B16F10 был изготовлен в коллективе М.М. Шмарова (НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи). Вакцину в дозе 10^8 БОЕ в комплексе с адьювантом дважды вводили внутримышечно мышам C57Bl/6. После второй иммунизации мышам инокулировали 200 тыс. клеток меланомы B16F10. Антиген-реактивные CD4 и CD8 Т клетки, секретирующие IFN- γ , анализировали методом ELISPOT. Уровень антител к неоантигену *Kif18B* (K739N) и антигенам меланомы B16F10 в сыворотке крови иммунизированных мышей измеряли методом ИФА.

Двукратная вакцинация аденовирусным вектором Ad-B16F10, кодирующим неоантиген меланомы B16F10, в сочетании с агонистом TLR4 эффективно индуцировала генерацию значительного количества противоопухолевых CD4 Т клеток и CD8 Т клеток (0,5% от клеток селезенки). В крови иммунизированных мышей обнаруживали антитела (титр 1/100000), специфичные к целевому антигену *Kif18B* (K739N). Индуцированные аденовирусной вакциной противоопухолевые Т-клеточные и гуморальные реакции сопровождались заметным ингибированием возникновения и прогрессии опухоли B16F10. Так, у 50% мышей, иммунизированных Ad-B16F10 с агонистом TLR4, опухоли не возникли совсем, и еще у 33% мышей возникшие опухоли были в 10-20 раз меньшего размера, чем в контроле (без иммунизации).

Исследование показало высокую иммуногенность и протективные свойства Ad-B16F10 вакцины, кодирующей неоантигенный эпитоп *Kif18B* (K739N) меланомы B16F10. *Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 20-15-00391).*

ПРЕДИКТИВНАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ХРОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ ТРАНСМЕМБРАННЫХ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, К.А. Гаптулбарова, Е.А. Луцкая, Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская, Н.В. Литвяков
НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН, Томск

Одной из важных причин неэффективности проводимой химиотерапии при раке молочной железы (РМЖ), считают формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости у опухолевых клеток, которая обусловлена экспрессией энергозависимых АВС-транспортёров. Предыдущие наши исследования показали, что изменение экспрессии данных генов связано с эффективностью неoadъювантной химиотерапии (НХТ). Кроме этого, мы предполагаем, что другие aberrантные состояния генов или локусов хромосом, где локализованы данные гены могут влиять на эффект лечения и прогноз заболевания. Целью настоящей работы оценка хромосомных aberrаций и уровня транскриптов всех известных 49 генов АВС-транспортёров в опухоли молочной железы. В исследование было включено 129 больных РМЖ. ДНК и РНК выделяли из образцов опухолевой ткани до и после НХТ. Было проведено микроматричное исследование всех образцов опухоли на микрочипах CytoScan™ HD Array и Clariom™ S Assay, human. Установлено, что наличие делеции в генах ABCB1, ABCB4, ABCB8, ABCC7, ABCC11, ABCC12, ABCF2 и ABCG4 связано с объективным ответом на лечение ($p \leq 0.05$). Равно как и снижение экспрессии большинства исследуемых генов было связано с хорошим ответом на химиотерапию, тогда как повышение экспрессии обуславливало прогрессирование и стабилизацию опухоли. Анализ показателей безметастатической выживаемости показал, что наличие делеции ABCB1/4 и ABCC1/6 связано со 100% выживаемостью ABCB1/4 и ABCC1/6 (log-rank test $p=0,003$ и $p=0,01$). В заключении установлено наличие общего общеге профиля экспрессии генов АВС при раке молочной железы. Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что aberrантные состояние некоторых генов АВС-транспортёров, равно как и снижение экспрессии данных генов в процессе неoadъювантной химиотерапии, является предикторами эффективности терапевтического лечения и потенциальными прогностическими маркерами безметастатической выживаемости. Работа поддержана грантом РФФИ № 18-29-09131.

ВЕЗИКУЛЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ – ЭФФЕКТИВНЫЕ ДОСТАВЩИКИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЭКЗОГЕННЫХ БИОМОЛЕКУЛ

Л.А.Гараева^{1,3,5}, Р.А.Камышинский^{3,4}, Е.Ю.Варфоломеева^{1,3}, С.Б.Ланда¹, Ю.В.Киль¹, Е.Д.Путевич^{1,5},
Е.Ю.Комарова², А.Л.Конева^{1,3,5}, Т.А.Штам^{1,2,3}

¹НИЦ «Курчатовский институт»-ПИЯФ, Гатчина; ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ³НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ⁴Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, Москва; ⁵Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Разработка систем доставки терапевтических биомолекул при помощи экстраклеточных везикул (ЭВ), наноразмерных частиц, в последнее десятилетие вызывает достаточно обширный интерес в научной литературе. Было показано, что ЭВ, в частности экзосомы, полученные из биологических жидкостей человека, потенциально могли бы стать доставщиками siRNAs, miRNAs, экзогенных белков, а также системы CRISPR/Cas9 для терапии ряда заболеваний. Но в силу необходимости получения экзосом из биологических жидкостей в производственных масштабах подобные разработки имели ряд ограничений, поэтому внимание научного сообщества обратилось на везикулы растительного происхождения (PEVs). PEVs - небольшого размера везикулы, схожие по морфологии и размеру с экзосомами человека. Являясь природными переносчиками нуклеиновых кислот и белков, PEVs могли бы стать потенциальными участниками систем доставки терапевтических биомолекул, кроме того растения – неисчерпаемый источник таких везикул. Целью нашего исследования стала проверка возможности доставки экзогенных биомолекул к клеткам человека *in vitro*. В ходе работы PEVs были получены из сока грейпфрута (GF-EVs) при помощи последовательного ультрацентрифугирования с последующей характеристикой полученных везикул по размеру, концентрации и морфологии при помощи атомно-силовой и криоэлектронной микроскопии, анализа траектории наночастиц. Оценка возможности загрузки GF-EVs и доставки экзогенных биомолекул была осуществлена на клеточных моделях *in vitro*. Нагруженные флуоресцентно меченным белком теплового шока (HSP70) и бычьего сывороточного альбумина (BSA) GF-EVs сокультивировали с клетками колоректального рака человека DLD1 и HCT116. Эффективность доставки экзогенных белков GF-EVs в клетки оценивали при помощи проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Было показано, что белки, доставляемые GF-EVs, более эффективно накапливались в цитоплазме клеток, по сравнению со свободными белками. Также было продемонстрировано сохранение функциональности доставляемых экзогенных биомолекул при помощи системы xCELLigence RTCA DP. Результаты нашего исследования показывают, что нативные PEVs могут быть эффективными переносчиками экзогенных функциональных белков. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках гранта №19-74-201.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕСТНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ГИДРОГЕЛЕВОГО РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ

К.И. Мелконян¹, Т.В. Русинова¹, Я.А. Козмай¹, И.М. Быков¹, К.Г. Гуревич², А.С. Асякина^{1,3}, М.Л. Золотавина³

¹Кубанский государственный медицинский университет МЗ РФ, Краснодар; ²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова; ³Кубанский государственный университет, Краснодар

Большинство гидрогелевых раневых покрытий (ГРП) являются моно- и дикомпонентными материалами, поэтому создание поликомпонентного ГРП является весьма актуальной задачей. Для характеристики любого раневого покрытия необходима оценка его биосовместимости. Для этого применяется метод подкожной инъекции и гистологический анализ биоптатов тканей из области инъекции. Цель исследования – оценка местной токсичности созданного ГРП на основе дермы свиньи.

Основой для создания гидрогеля была нативная кожа поросёнка породы Ландрас толщиной 0,5 мм. Животное наркотизировали растворами золетила (1 мг/кг; Zoletil 100) и ксилазина (4 мл/кг; Rometar, Spofa). Далее образцы кожи массой 0,5 г при

температуре 25°C подвергались обработке 5 мл 5% NaOH (Вектон, РФ) и 3% H₂O₂ (Йодные Технологии и Маркетинг, РФ) в соотношении 1:1 (17 ч), отмывке в дистиллированной воде (4 раза) и нейтрализации с помощью 1 н. H₂SO₄ (Вектон, РФ; 1 ч). Для оценки местной токсичности производили подкожную инъекцию ГРП (1,5 мл) крысам породы Вистар (n=5). Животных наркотизировали растворами золетила (6 мг/кг; Zoletil 100) и ксилазина (0,5 мл/кг; Rometar, Spofa). Под кожу в межлопаточной области были выполнены инъекции исследуемого ГРП. Крыс выводили из эксперимента летальной дозой барбитуратов (150 мг/кг) на 3-и сутки после начала эксперимента. После обработки нативной дермы был получен полупрозрачный гелеобразный материал. На 3-и сутки эксперимента оценка местной токсичности ГРП показала, что в месте инъекции на кожных покровах и в подлежащих тканях не наблюдалось признаков воспалительного процесса. При гистологическом анализе образцов на 3-и сутки не было обнаружено некроза тканей, выраженного воспалительного ответа и неоангиогенеза. Полученный ГРП характеризовался частичной биодеградацией и был незначительно пропитан фибриновым экссудатом.

В результате эксперимента было показано отсутствие токсичности и способности к биодеградации созданного ГРП, что свидетельствует о возможности его применения как основы для формирования соединительной ткани при лечении поверхностных ранений кожи. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования его биохимического состава и биофизических характеристик, а также сравнительный анализ полученного гидрогеля с другими коммерческими ГРП.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОЛИЗИНОВ БАКТЕРИОФАГОВ vB_VcM_Sam46, vB_VcM_Sam112, Izhevsk, pHIS3501 и vB_BtS_B83

О.Н. Копцова, А.В. Скорынина, А.М. Шадрин *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино*

Эндолизины – это кодируемые бактериофагами ферменты, отвечающие за разрушение бактериальной клеточной стенки на финальной стадии литического цикла заражения бактерий. Эти ферменты рассматриваются как перспективные антибактериальные средства, в первую очередь, против бактериальных биопленок и бактерий с множественной антибиотикорезистентностью. К преимуществам эндолизинов относится то, что устойчивость к ним у бактерий формируется медленнее, чем к другим группам антибиотиков, и то, что некоторые эндолизины обладают более узконаправленным действием. В нашей работе исследовалось пять эндолизинов бактериофагов, выявленных и изученных сотрудниками нашей лаборатории: Ply35 фага pHIS3501, PlySam46 фага vB_VcM_Sam46, Ply57 фага Izhevsk, PlyB83 фага vB_BtS_B83, PlySam112 фага vB_VcM_Sam112. В качестве референсного эндолизина использовали PlyG гамма-фага, обладающего антибактериальной активностью против возбудителя сибирской язвы – *Bacillus anthracis*. При помощи базы данных UniProt были предсказаны доменные структуры исследуемых эндолизинов. Установлено, что (i) Ply35 и Ply57 содержат домены амидазы 2, как и PlyG; (ii) Ply57 – домен SH3; (iii) PlySam46 и PlySam112 – домены амидазы 3; (iiii) PlyB83 – домен гликозидазы GHF-25. Методом спот-теста был определен спектр антибактериальной активности эндолизинов по отношению к 35 штаммам *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Гены исследуемых эндолизинов были клонированы в плазмиду pET33 по сайтам NcoI и NotI. Суперпродукция белка осуществлялась в штамме *E. coli* BL21(DE3). Очистка белка проводилась методом аффинной хроматографии за His-tag. Определена термостабильность эндолизинов, их удельная ферментативная активность, специфичность действия по отношению к 32 штаммам группы *B. cereus*, влияние уровня pH и концентрации NaCl на ферментативную активность. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях, например, по применению эндолизинов против бактериальных биопленок.

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ДВОЙНЫМ МЕХАНИЗМОМ ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ БЕРБЕРИНА И ХЛОРАМФЕНИКОЛА

Ю.А. Павлова¹, А.Г. Терещенков², И.А. Остерман¹, Н.В. Сумбатян¹, А.А. Богданов^{1,2}

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

В настоящее время получение антибактериальных препаратов является актуальной задачей в виду существующей проблемы резистентности бактерий к антибиотикам. Хлорамфеникол – антибиотик широкого спектра действия, которое обусловлено взаимодействием с бактериальной рибосомой и остановкой синтеза бактериальных белков. Для полученных ранее производных хлорамфеникола с заменой дихлорацетильного остатка на аминокислотные, пептидные остатки и другие группыировки было показано, что такие соединения связываются с рибосомой аналогично хлорамфениколу и представляют интерес как новые антибактериальные препараты [1]. В данной работе синтетическим путем получена серия конъюгатов берберина и хлорамфеникола, соединенных линкерами различной длины. Предполагалось, что включение бербериновой группировки обеспечит проникновение соединения в клетку и, возможно, увеличит аффинность к рибосоме. Известно, что полученные ранее трифенилфосфониевые аналоги хлорамфеникола обладают антибактериальным действием не только за счет блокировки биосинтеза бактериальных белков, но и за счет снижения мембранного потенциала [2]. В данной работе нами исследована антибиотическая активность конъюгатов берберина и хлорамфеникола в отношении различных штаммов бактерий, в том числе устойчивых: *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis*-cfr, *Bacillus subtilis*-cat, *Escherichia coli* dTolC, *Escherichia coli* dTolC-cat. По результатам тестирования соединений в двойной репортерной системе pDualrep2 показано, что механизм действия полученных веществ, подобно хлорамфениколу, связан с остановкой трансляции. Эффективные константы диссоциации комплексов синтезированных веществ с рибосомой, полученные методом конкурентного вытеснения флуоресцентно меченного эритромицина, в несколько раз меньше, чем для хлорамфеникола. Результаты *in vitro* трансляции и рассчитанные значения IC₅₀ свидетельствуют, что полученные конъюгаты ингибируют пептидилтрансферазную реакцию лучше, чем хлорамфеникол. Рассчитанные концентрации полунгибирования роста клеток (GI₅₀) показывают, что конъюгаты берберина и хлорамфеникола являются нетоксичными для клеток млекопитающих. *Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант № 20-04-00873).*

1. Tevyashova A.N. *Antibiotics*, 2021, 10(4), 370;

2. Pavlova J.A. et al. *Antibiotics*, 2021, 10(5): 489;

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ МЕДИЦИНСКИХ РАДИОНУКЛИДОВ В ЛЯР ОИЯИ

Н.В. Аксенов

Лаборатория ядерных реакций им. Г.Н. Флерова, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

Рассматриваются возможности использования ускорительного комплекса Лаборатории ядерных реакций для получения медицинских радионуклидов. Показана возможность наработки альфа-излучателей, изомеров и перспективных же-эмитеров $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$, ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{236}Pu , ^{237}U , $^{193\text{m}}\text{m}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$, $^{108\text{m}}\text{Ag}$, $^{115\text{m}}\text{In}$, $^{117\text{g}}\text{In}$, $^{113\text{m}}\text{Cd}$ и др. в развиваемых в лаборатории методах с использованием фотоядерных реакций на ускорителе электронов микротроне МТ-25. Дальнейшее развитие работ связано с создаваемым радиохимическим комплексом и специализированным ускорителем для получения пучков электронов с энергией 40 МэВ и интенсивностью 3 мА.

КОНЪЮГАТЫ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ С МАКРОЦИКЛИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ

Г.Ю. Алешин¹, С.Ю. Хабирова¹, Т.В. Плахова¹, А.А. Щукина², А.Д. Зубенко²

¹Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

Относительно новым и перспективным направлением исследований в ядерной медицине является разработка биосовместимых наноматериалов, меченных радионуклидами для ранней диагностики и эффективного лечения онкологических заболеваний. В частности, наночастицы являются удобной платформой для создания комбинированных радиофармпрепаратов. При этом сами наноматериалы зачастую сами по себе обладают интересными свойствами для биомедицины. Наноразмерный диоксид церия интересен как потенциальный компонент радиофармпрепаратов, так как он обладает антиоксидантными свойствами, что позволяет использовать его как радиопротектор для минимизации ущерба ионизирующего излучения на здоровые органы и ткани. В то же время в злокачественных новообразованиях диоксид церия показывает прооксидантные свойства, что потенциально позволит усилить терапевтический эффект вводимого препарата. Одновременно с этим благодаря рН-чувствительности оксид церия проявляет векторные свойства и способен адресно доставлять препарат к пораженной ткани. В рамках данной работы синтезированы новые конъюгаты азакраун-лигандов и наночастиц диоксида церия. Конъюгация наночастиц с бифункциональными производными лигандов осуществлялась после функционализации поверхности наночастиц аминокислотными группами. Лиганды конъюгировались через незащищенную карбоксильную группу с аминокислотной группой на поверхности наночастиц путем образования амидной связи с использованием реагента HBTU. Подтверждение модификации поверхности наночастиц на каждой стадии подтверждалось сериями измерений ζ -потенциалов при различных значениях рН в диапазоне от 2 до 11 и определением изоэлектрической точки методом динамического светорассеяния. Дополнительно модифицированные наночастицы анализировались методами ИК и КР-спектроскопии. Эффективность конъюгирования также оценена с помощью термогравиметрии. Для полученных конъюгатов определены условия образования меченных комплексов с радионуклидами висмута, а также оценена их устойчивость в биологически значимых средах: физиологическом растворе, натрий-фосфатном буферном растворе и сыворотке крови. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конъюгаты наночастиц диоксида церия и азакраун-эфиров представляют собой перспективный материал для изучения с целью применения в ядерной медицине. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда No 21-73-00101, <https://rscf.ru/project/21-73-00101/>.*

ВОЗМОЖНОСТИ ПРОИЗВОДСТВА МЕДИЦИНСКИХ ИЗОТОПОВ В РОССИИ

Б.Л. Жуйков

Институт ядерных исследований РАН, Москва

В России имеется большой потенциал для развития производства перспективных медицинских изотопов. Кроме ультракороткоживущих радионуклидов для ПЭТ, в России радиоактивные изотопы и радиофармпрепараты получают в основном на предприятиях Г/К «Росатом» – ГНЦ НИИАР, ГНЦ РФ ФЭИ им. А.И. Лейпунского, НИФХИ им. Л. Я. Карпова, АО ИРМ, а также на других государственных предприятиях – НИИ ЯФ ТПУ, ФГУП «Завод «Медрадиопрепарат» ФМБА, РНЦРХТ им. А.М. Гранова Минздрава РФ и на частном предприятии ЗАО «Циклотрон». Уровень потребления радионуклидов для диагностики и терапии в России пока невелик и далеко не соответствует существующим возможностям их производства. Поэтому исследования и разработки целесообразно ориентировать на потребности развитых стран, организовывая с ними эффективную коллаборацию с последующим или одновременным внедрением в России.

В ИЯИ РАН в сотрудничестве с различными западными и российскими организациями разработаны новые методы производства ^{82}Sr , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{225}Ac и ряда других радионуклидов. В ИЯИ РАН также разработан генератор $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$ – ГР-01 и ряд его модификаций. Этот генератор был успешно внедрен в РНЦРХТ им. А.М. Гранова для ПЭТ-диагностики кардиологических, а также нейроонкологических заболеваний. Одна из модификаций такого генератора Rubigen® внедряется фирмой Naogen Pharma по лицензии ИЯИ РАН во Франции. В ИЯИ РАН разработано также несколько прототипов генератора $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ (α -эмитер), которые превосходят существующие аналоги. Также разрабатываются новые генераторы $^{211}\text{Pb}/^{223}\text{Ra}$, $^{230}\text{Pa}/^{230}\text{U}/^{226}\text{Th}$ и $^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$, которые перспективны для диагностики и терапии многих заболеваний. Пример ИЯИ РАН показал, что для эффективного создания новых технологий производства медицинских изотопов в России необходимы следующие условия:

1. Обеспечение основополагающего государственного финансирования для поддержания базовых установок и фундаментальных исследований.

2. Разработка принципиально новых технологий.
3. Развитие коллаборации с развитыми странами, где ядерная медицина уже получила большее развитие.
4. Эффективное распределение фондов для НИР ОКР: преодоление ведомственных барьеров, создание достаточно независимого и квалифицированного международного комитета.
5. Развитие конкуренции независимых производителей vs. монополии госкорпораций.

МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ

О.А. Коваль^{1,2}, Е.А. Патракова^{1,2}, М. Бирюков^{1,2}, О.С. Троицкая¹, Е.В. Милахина³, П.П. Гугин⁴, Д.В. Семенов¹, В.А. Рихтер¹, И.В. Швейгерт⁵, Д.Э. Закревский^{3,4}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский государственный университет; ³Новосибирский государственный технический университет; ⁴Институт физики полупроводников им. А.В. Ржаницина СО РАН; ⁵Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН, Новосибирск

Методы электрофизического и плазмохимического воздействия на злокачественные образования с использованием холодной плазмы атмосферного давления могут быть востребованы при разработке новых подходов в борьбе с злокачественными новообразованиями. В плазменно-стимулированных химических реакциях образуются различные активные кислородсодержащие и азотсодержащие соединения, которые являются основными триггерными молекулами гибели клеток при воздействии ХПС. В данной работе исследовали как непосредственно облучение клеток ХПС, так и опосредованное, при добавлении к клеткам культуральной среды, предварительно облученной ХПС.

Мы выявили условия облучения культуральной среды, вызывающие селективное снижение жизнеспособности A431 без снижения жизнеспособности здоровых клеток НЕК293. Аналогично опосредованному воздействию, были определены параметры прямого облучения клеток ХПС, при которых стимулировалась гибель клеток аденокарциномы легкого A549 без воздействия на здоровые клетки легкой линии Wi-38. Впервые усиление цитотоксического эффекта в отношении опухолевых клеток, предсказанное на основании данных компьютерного моделирования, было достигнуто введением в систему дополнительного заземленного электрода (заземленной подложки), что вело к увеличению продукции радикалов ОН над поверхностью жидкости вблизи биомшени.

Для понимания механизма индукции селективной гибели опухолевых клеток при воздействии ХПС был проведен анализ изменения транскриптома здоровых и опухолевых клеток, облученных ХПС. Оценку дифференциальной экспрессии генов проводили методом массового параллельного секвенирования на платформе Illumina NextSeq (РНК-Seq). Было показано, что генами раннего ответа являются гены, вовлеченные в каскад ответа на окислительный стресс, а при позднем ответе активируются гены системы репарации. Были выявлены универсальные для наших клеточных моделей индикаторные гены, уровень РНК которых модулируется воздействием ХПС – FOS, GADD45B и KLF2, а также специфические гены для опухолевых и нормальных клеток. Полученные данные позволили разработать модель механизма действия ХПС на уровне регуляции транскрипции. *Работа поддержана грантом РФФ № 19-19-00255.*

МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ФТОРА-18 В СЛОЖНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МОЛЕКУЛЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ АВТОМАТИЗАЦИИ

Р.Н. Красикова

Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург

В настоящее время в более 90% клинических исследований методом позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) применяются радиофармпрепараты (РФП) на основе фтора-18. Это обусловлено не только практически «идеальными» ядерно-физическими характеристиками радионуклида ($T_{1/2}$ 110 мин), но и удобством его получения в водной мишени циклотрона в форме [¹⁸F]фторида, используемого в синтезе важнейших радиотрейсеров на основе простых молекул ([¹⁸F]ФДГ, [¹⁸F]ФЛТ, [¹⁸F]ФЭТ и др.) методом прямого нуклеофильного радиофторирования. Однако условия реакций прямого радиофторирования (щелочная среда, высокие температуры, органические растворители) чаще всего непригодны для введения метки в сложные биологически активные молекулы, такие, как пептиды, протеины, биополимеры и др. Для этой цели используются так называемые «непрямые» методы синтеза с использованием меченых фторм-18 простых реакционноспособных соединений с различными функциональными группами (синтонов, простетических групп), процесс конъюгации которых с целевой молекулой протекает в мягких условиях. В дополнение к классическим «непрямым» методам, основанным на реакциях фторалкилирования и фторацелирования, для селективного введения метки в биомолекулы используют синтоны, способные вступать в реакции образования оксимов (оксимного лигирования), реакции кросс-сочетания типа Сузуки, Соногашеры и Бухвальда-Хартвига, катализируемые палладием, реакции [3+2]-циклоприсоединения и другие. Несмотря на огромный выбор методов и синтонов, лишь некоторые из них нашли применение в практике ПЭТ-радиохимии. Это в большой степени связано с необходимостью использования на стадии очистки синтона трудоемкого и длительного метода полупрепаративной ВЭЖХ, плохо поддающегося автоматизации. На примере различных классов РФП в докладе будут рассмотрены основные методы «непрямого» введения метки в биологически активные молекулы с использованием различных синтонов, включая методы автоматизации с применением на стадии очистки современных технологий твердофазной экстракции. *Работа поддержана грантом РФФИ – Германия, проект № 20-53-12030\20.*

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОМЕРА ^{195m}Pt ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЯДЕРНОЙ МЕДИЦИНЕ

А.Ш. Мадумаров, Н.В. Аксенов, Г.А. Божиков

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

В последнее время активно развивается радионуклидная терапия с применением Оже-эмиттеров. При этом наибольший интерес представляют радионуклиды, распад которых, помимо генерации Оже-электронов, сопровождается мягким γ -излучением, что обуславливает возможность их применения в тераностике. Такие радионуклиды и радионуклидные пары известны, например: ^{67}Ga , ^{117m}Sn , ^{123}I , ^{86}Y (^{90}Y), ^{64}Cu (^{67}Cu), ^{124}I (^{131}I), ^{195m}Pt . Один из самых высоких выходов Оже-электронов (36,6 электронов на распад) и мягкое γ -излучение (98,9 кэВ, 11,4 %) делают ^{195m}Pt привлекательным радионуклидом для тераностики. Однако известные в настоящее время и хорошо изученные методы получения ^{195m}Pt не обеспечивают наработку с большим выходом, большой удельной активностью и по доступной цене. В данной работе изучаются два новых метода получения платины.

Реакторный метод основан на реакции двойного захвата нейтронов на мишени иридия $^{193}\text{Ir}(n,\gamma)^{194}\text{Ir}(n,\gamma)^{195m}\text{Ir} \beta^- \rightarrow ^{195m}\text{Pt}$. Для того, чтобы сделать вывод о перспективности метода необходимо знать сечения всех протекающих ядерных реакций. Таким образом, целью данной работы было определение ранее неизвестного сечения реакции $^{194}\text{Ir}(n,\gamma)^{195m}\text{Ir}$. Две мишени обогащенного иридия с Cd фильтром и без облучали в течение 17 дней в реакторе ИБР-2 (ОИЯИ, Дубна). Образование побочного радионуклида ^{192}Ir привело к большому радиационному фону, поэтому для корректного определения сечения было сделано радиохимическое выделение целевого радионуклида ^{195m}Pt , находящегося в ультрамикроразбавлении, из материала мишени. Затем, основываясь на радиоактивности ^{195m}Pt в обеих мишенях, и, используя метод кадмиевой разности, мы определили, что тепловые нейтроны не продуктивны, а среднее сечение на резонансных нейтронах реакции $^{194}\text{Ir}(n,\gamma)^{195m}\text{Ir}$ составило 2940.

Второй метод – облучение смеси цисплатины и криптомелана в различных соотношениях на микротроне МТ-25 в ЛЯР ОИЯИ, где криптомелан выполнял функцию сборника ядер отдачи. Благодаря эффекту Сцилларда-Чалмерса мы достигли более высокой удельной активности ^{195m}Pt . В докладе будет произведено сравнение выхода и чистоты получаемого радионуклида с соответствующими величинами других известных методов.

ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ КОМПЛЕКСОВ Vi^{3+} И Sc^{3+} С БЕНЗОАЗАКРАУН-ЛИГАНДОМ И ИХ КОНЪЮГАТОВ С ОКРЕОТИДОМ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РФП

Е.В. Матазова¹, Б.В. Егорова¹, Г.Ю. Алёшин¹, А.В. Пашанова², Е.А. Конопкина¹, Н.А. Титченко¹, А.Д. Зубенко²

¹Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт элементоорганических соединений РАН

им. А.Н. Несмеянова, Москва

В качестве средств доставки РФП к раковым клеткам часто используют биомолекулы, которые образуют конъюгат с радиоактивным комплексом и селективно связываются с рецепторами на поверхности раковых клеток. Показано, что таргетная терапия с использованием альфа-излучателей – более эффективная альтернатива бета-излучателям для лечения отдельных кластеров раковых опухолей и метастаз ввиду высокой линейной передачи энергии и маленького пробега альфа-частицы. Перспективными альфа-излучателями для терапии онкологических заболеваний признаны $^{212/213}\text{Bi}$ радионуклиды с небольшими периодами распада 61 и 46 мин соответственно. Одновременно с терапией возможно проведение диагностики с использованием позитронных излучателей, например, с ^{44}Sc . Медицинские изотопы $^{212/213}\text{Bi}$ и ^{44}Sc можно получать генераторным способом, что упрощает их использование в рамках медицинских учреждений. В составе РФП такого типа обычно используют лиганды ДТРА или DOTA для связывания катиона с биомолекулой, однако показана невысокая устойчивость *in vivo* комплексов с ДТРА, а комплексы с DOTA образуются при нагревании до 98°C, что усложняет и удлиняет процесс конъюгирования с биомолекулами. Кроме того, учитывая небольшой период полураспада медицинских изотопов висмута, необходимо использование лиганда, быстро и прочно связывающего катион.

В работе рассмотрено комплексообразование ^{207}Bi (как модели $^{212/213}\text{Bi}$) и ^{44}Sc с новым бензоазакраун-лигандом L, который, в отличие от DOTA, связывает катионы уже при $T_{\text{комн}}$. Подобраны условия мечения и анализа комплексов, показана их устойчивость *in vitro* и исследовано биораспределение *in vivo*. В рамках данной работы получен конъюгат бензоазакраун-лиганда L с октреотидом, подобраны условия очистки конъюгата и мечения ^{207}Bi и ^{44}Sc , а также исследована устойчивость конъюгатов *in vitro* и биораспределение *in vivo*. Проведено сопоставление поведения конъюгатов с катионами Vi^{3+} и Sc^{3+} и представлена оценка применимости данных конъюгатов в качестве потенциальных РФП.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-73-10035

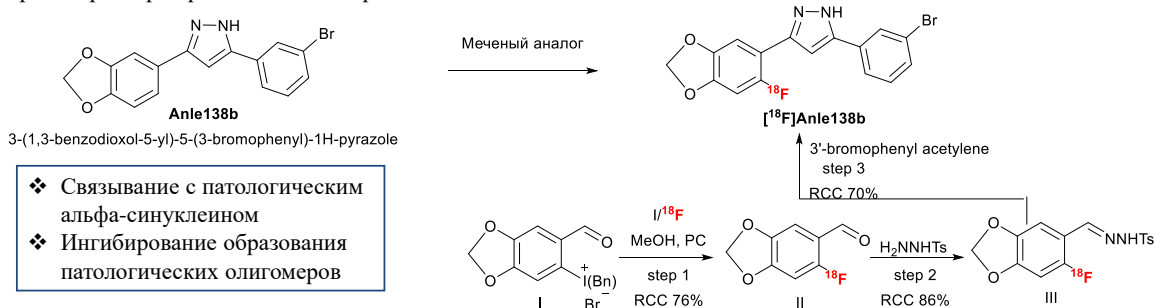
РАДИОХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ^{18}F -Anle138b, ПОТЕНЦИАЛЬНОГО РАДИОТРЕЙСЕРА ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ АГРЕГАЦИИ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА МЕТОДОМ ПЭТ

В.В. Орловская¹, О.С. Федорова¹, Р.Н. Красикова¹, F. Zarrad², Е.А. Urusova^{2,3}, В. Neumaier^{2,3,4}, В.Д. Zlatopolskiy^{2,3,4}

¹Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург; ²Institute of Neuroscience and Medicine, INM-5: Nuclear Chemistry, Forschungszentrum Jülich, Germany; ³Institute of Radiochemistry and Experimental Molecular Imaging University Clinic Cologne, Germany; ⁴Max Planck Institute for Metabolism Research, Cologne, Germany

Альфа-синуклеопатия – группа нейродегенеративных заболеваний, включающих болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви и множественную системную атрофию. Предполагается, что одной из причин нейродегенерации лежит агрегация белка – альфа-синуклеина. Несмотря на активный поиск кандидатов для визуализации этого процесса методом ПЭТ, радиофармпрепаратов с доказанной диагностической ценностью до настоящего времени не найдено.

В 2013 году был предложен олигомерный модулятор на основе дифенилпиразола – Anle138b, проявляющий структурно-зависимое связывание с альфа-синуклеином [1], и получение меченого фтором-18 производного в качестве потенциального ПЭТ радиотрейсера представляет интерес.



- ❖ Связывание с патологическим альфа-синуклеином
- ❖ Ингибирование образования патологических олигомеров

Для этой цели нами разработан оригинальный трехстадийный метод синтеза [¹⁸F]-Anle138b (на схеме), начиная с получения простатической группы, 6-[¹⁸F]фторпипероналя (6-[¹⁸F]FP – II). В качестве предшественника в синтезе 6-[¹⁸F]FP впервые предложена иодониевая соль пипероналя (I), использование которой не требует на стадии радиофторирования традиционных межфазных катализаторов (ТБАНСО₃ или K222/K₂CO₃). Раствор I в метаноле обеспечивает высокую степень элюирования [¹⁸F]F⁻, сорбированного на анионообменной смоле, а радиофторирование в смеси метанол/пропиленкарбонат (PC), минуя стадию испарения растворителя, – высокую радиохимическую конверсию (RCC). Последующие стадии трансформации 6-[¹⁸F]FP в соответствующий гидразид III и затем диазаметан в присутствии третбутоксид лития с последующей конъюгацией с 3-бромфенилацетиленом также протекают с высокой эффективностью. Проведение всех стадий синтеза в одном реакторе без промежуточных очисток является оптимальным решением для автоматизации процесса в современных модулях синтеза. Разработка метода выделения целевого продукта [¹⁸F]-Anle138b из реакционной смеси с помощью полупрепаративной радиоВЭЖХ находится в стадии завершения. Работа поддержана грантом РФФИ–Германия, проект № 20-53-12030.20.

[1] J. Wagner et al. *Acta Neuropathologica* v. 125, p. 795–813 (2013)

РЕАЛИЗАЦИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭМИТТЕРОВ ЭЛЕКТРОНОВ ОЖЕ ПУТЕМ ИХ ДОСТАВКИ В ЯДРА КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

А.С. Соболев^{1,2}

¹Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биологии гена РАН, Москва

Эмиттеры электронов Оже (ЭО) рассматриваются в настоящее время как перспективные радионуклиды для создания терапевтических и/или тераностических радиофармпрепаратов. Малый пробег ЭО и их достаточно высокая линейная передача энергии делает их использование привлекательным для лечения малых опухолей и микрометастазов, особенно в тех случаях, когда повреждение окружающих нормальных тканей должно быть сведено к нулю, например, при лечении опухолей мозга. Для решения этой задачи определяющим моментом становится избирательная доставка эмиттеров ЭО не только в заданный тип клеток, но и в их ядра как наиболее чувствительный компартмент к цитотоксическому действию ЭО. Такими средствами доставки являются рассматриваемые в докладе модульные нанотранспортеры (МНТ). Принцип, положенный в основу дизайна МНТ, – использование естественных процессов клеточного транспорта, благодаря чему МНТ, представляющие собой искусственные химерные полипептиды, способны проникать внутрь клеток-мишеней, а затем – в их ядра. На клеточных моделях показано, что доставляемые с помощью МНТ радионуклиды, испускающие ЭО (¹²⁵I, ¹¹¹In и ⁶⁷Ga), благодаря специфической доставке в различные раковые клетки-мишени (эпидермоидная карцинома, рак мочевого пузыря, глиобластома, меланома, рак шейки матки), а в них – в ядро, приобретают клеточную специфичность и намного большую эффективность. Разработаны также «гибридные» МНТ, полученные путем ковалентного присоединения непептидного лиганда (например, производного фолиевой кислоты) к безлигандному МНТ. Полученные «гибридные» фолат-МНТ специфически интернализуются раковыми клетками-мишенями со сверхэкспрессией фолатных рецепторов, проникали в их ядра и, доставляя радионуклид, эффективно поражали их. МНТ, несущие эмиттеры ЭО, продемонстрировал выраженную противоопухолевую активность на животных моделях. Разработанный подход позволяет создавать различные МНТ в зависимости от задачи, например, для создания новых МНТ для новых типов клеток-мишеней, нового целевого внутриклеточного компартмента и т. д. Различные варианты применения МНТ для разнообразных целей и задач позволяют рассматривать этот подход как базовый, на основе которого могут быть получены различные частные решения, иными словами, как платформу. Работа поддержана грантом РФФИ № 17-14-01304.

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ СИНТЕЗА 18F-РФП С ПРИМЕНЕНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ОДНОРАЗОВЫХ КАРТРИДЖАХ

О.С. Федорова, В.В. Орловская, Р.Н. Красикова

Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург

Реакция алифатического нуклеофильного радиофторирования является ключевой стадией синтеза большинства клинически значимых РФП для ПЭТ на основе фтора-18 (T_{1/2} 110 мин). [¹⁸F]Фторид получают облучением водной мишени циклотрона и выделяют методом твердофазной экстракции (ТФЭ) на анионообменном картридже, для чего, как правило, используются водно-органические растворы щелочных межфазных катализаторов (МФК) – K222/K₂CO₃ или тетрабутиламмоний

гидрокарбоната. Применение таких МФК часто приводит к образованию продуктов элиминирования и снижению выхода за счет возможной сорбции $[18F]$ фторида на стенках. Нами было предложено использование в качестве МФК нейтрального тетрабутиламмоний п-толуолсульфоната (ТБАОТs). Это позволило снизить количество предшественника при сохранении высокого радиохимического выхода реакции и исключить одну из трудоемких стадий синтеза – азетропную «сушку» $[18F]$ фторида благодаря хорошей растворимости ТБАОТs в органических растворителях. На основе данного подхода в ИМЧ РАН были разработаны новые методы синтеза двух важнейших РФП – O-(2-[$18F$]фторэтил)-L-тирозина ($[18F]$ ФЭТ), радиотрейсера для диагностики церебральных опухолей и 16α - $[18F]$ фтор- 17β -эстрадиола ($[18F]$ ФЭС), препарата для выявления эстроген-зависимых новообразований молочной железы. Методы были автоматизированы на модуле GE TRACERlab FX N Pro с внедрением очистки готового продукта на ТФЭ-картриджах вместо ранее применяемой очистки с помощью полупрепаративной радиоВЭЖХ. Использование ТБАОТs в качестве МФК обеспечивало высокий радиохимический выход: 40% для $[18F]$ ФЭТ и 33% для $[18F]$ ФЭС (без поправки на радиоактивный распад) при времени синтеза 32-35 мин. Уменьшение количества предшественника с 5 до 2 мг для $[18F]$ ФЭТ и с 2 до 0.3 мг для $[18F]$ ФЭС позволило разработать ТФЭ очистку с минимальным количеством картриджей. Выделение $[18F]$ ФЭТ выполнялось на трех последовательно соединенных картриджах tC18 Light и дополнительном картридже CM Plus (Waters). Благодаря ультра-малому количеству предшественника 0.3 мг, для выделения $[18F]$ ФЭС было достаточно одного картриджа, OASIS WAX 3cc (Waters). Оба РФП были получены с радиохимической чистотой более 99%; все параметры контроля качества соответствовали значениям, установленным Европейской фармакопеей. Работа поддержана грантом РФФИ №18-29-01015.

КОМПЛЕКСЫ Sc^{3+} , Y^{3+} , Eu^{3+} , Bi^{3+} С КОНЪЮГАТАМИ УЛЬТРАКОРОТКИХ ПЕПТИДОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ

А.О. Федотова¹, Б.В. Егорова¹, Г.А. Посыпанова², Н.А. Титченко¹, Д.С. Хачатрян^{2,3}, А.В. Колотаев^{2,3}, В.Н. Осипов⁴, С.Н. Калмыков^{1,2}

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²НИЦ «Курчатовский институт»; ³НИЦ «Курчатовский институт» – ИРЕА; ⁴НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва

Соматостатин (SST) – пептидный гормон, который связывается с семейством рецепторов, которые высоко экспрессируются на поверхности различных типов опухолей. Из-за быстрой биодegradации SST были разработаны его длительно действующие аналоги, и предполагается, что наличие последовательности -Phe-D-Trp-Lys-Thr- является важным фактором для сохранения эффективности производных SST. При этом короткие пептиды обладают более длительным периодом полувыведения и удобны с точки зрения их производства. Нами был синтезирован конъюгат Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DOTA (DOTA-P4), включающий ключевую последовательность аминокислот и хелатор DOTA. Поскольку в литературе нет данных об изучении меченя и сродства к рецепторам таких коротких линейных пептидов, целесообразно определить условия меченя DOTA-P4 катионами радионуклидов и показать сродство меченного конъюгата к клеткам, несущим рецепторы SST. Выбранные катионы Bi^{3+} и Ln^{3+} образуют стабильные комплексы с DOTA и являются перспективными для ядерной медицины. Комплексы DOTA-P4 с ^{44}Sc , ^{90}Y , ^{152}Eu и ^{207}Bi были получены и охарактеризованы с помощью тонкослойной хроматографии. Радиохимическую чистоту определяли с помощью гамма-спектрометрии или жидкостного сцинтилляционного счета. Исследования устойчивости *in vitro* проводили в физиологическом растворе, сыворотке и с биологически значимыми катионами металлов. Сродство к рецепторам анализировали методом конкурентного связывания с клетками IMR-32 (человеческая нейробластома) при 4°C. Нами были найдены оптимальные условия меченя M-DOTA-P4: 90°C; 0,2 мМ, pH 5, 20 мин (M= ^{44}Sc); 0,1 мМ, pH 4, 20 мин (M= ^{90}Y); 0,2 мМ, pH 8, 10 мин (M= ^{52}Eu); 0,2 мМ, pH 6, 10 мин (M= ^{207}Bi). Все комплексы демонстрируют устойчивость *in vitro* в течение 4–24 часов. Специфическое связывание DOTA-P4 с клетками IMR-32 достигает насыщения при 5 нМ, при этом неспецифическое связывание составляет 26% от общего. Кажущиеся константы диссоциации равны 0,10 и 2,25 нМ. Изменение положения хелатора относительно аминокислотной последовательности положительно влияет на мечение катионами с разными ионными радиусами. Впервые продемонстрировано связывание конъюгата короткого пептида линейного типа с рецепторами SST. Полученные результаты перспективны для экспериментов с DOTA-P4 *in vivo* на мышцах с привитыми опухолями.

РАДИОМЕЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА UBI 29-41 ДЛЯ ВЫСОКОТОЧНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОСТНОЙ ИНФЕКЦИИ

Е.С. Стасюк¹, А.Г. Першина^{1,2}, М.С. Ларькина^{1,2}, М.А. Зоркольников², В.Д. Заводовская², Е.А. Нестеров¹, А.С. Рогов¹, Е.А. Шелихова¹, В.Л. Садкин¹, А.Я. Луцкий³, А.В. Янцевич³

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск; ²Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Томск; ³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Сцинтиграфия с радиоактивно мечеными антимикробными пептидами – один из многообещающих подходов к ранней и высокоточной диагностике костных инфекций. Благодаря способности пептида проникать через мембрану микробной клетки, их накопление происходит только в зоне гнойного воспаления. В настоящей работе был разработан оригинальный подход к радиоактивной метке антимикробного пептида UBI29-41 – фрагмента природного катионного пептида убицидина человека – для исследования костной инфекции и обнаружения воспаления. Материал и методы: UBI29-41 получали твердофазным пептидным синтезом с использованием Fmoc-защищенных аминокислот. Сукцинимид-1-ил 6- (бис (пиридин-2-илметил) амино) гексаноат (сложный эфир DPAH-NHS) использовали в качестве хелатирующего агента для ^{99m}Tc . Мечение радиоактивной меткой выполнялось в два этапа с использованием CRS KИT. Очистку меченого пептида UBI29-41 проводили на колонке C18 Sep-Pak. Радиохимический выход и радиохимическую чистоту определяли методом iTLC в PBS. Тест стабильности *in vitro* проводили с использованием избытка гистидина. Модели остеомиелита (n = 6) и стерильного воспаления костей (n=6) были разработаны на крысах. ^{99m}Tc -DPAH-UBI29-41 вводили внутривенно в хвостовую вену. Сканирование

проводили с помощью SPECT Philips BrightView. Сканы интерпретировались на основе бактериального посева, лабораторных тестов и трехфазного сканирования костей. Результаты. Радиохимический выход ^{99m}Tc -DPAH-UBI29-41 составил 80%, а радиохимическая чистота – 96%. Инкубирование с избытком гистидина, не выявило неблагоприятного воздействия на радиохимическую чистоту. Сканирование после введения ^{99m}Tc -DPAH-UBI29-41 показало накопление радионуклида в беренной кости крыс с микробным воспалением костей, тогда как у крыс со стерильным LPS-индуцированным воспалением не наблюдалось никаких изменений сигналов. Выводы: антимикробные пептиды, полученные из убихицидина (UBI29-41), были успешно помечены ^{99m}Tc с использованием хелатирующего эфира DPAH-NHS. Был получен ^{99m}Tc -DPAH-UBI29-41 с высокой радиохимической чистотой (96%) и стабильностью. Сцинтиграфия с радиоактивно меченными ^{99m}Tc пептидами UBI29-41 обеспечила высокоточное обнаружение и дифференциацию инфекции и стерильного воспаления на модели остеомиелита на крысах.

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕРАТОРА $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ РАЗРАБАТЫВАЕМОЙ СИСТЕМЫ ОФЭКТ

И.А. Чупраков^{1,2}, А.Ш. Мадумаров¹, Г.А. Божиков¹, В.А. Рожков³, А.С. Жемчугов³, Н.В. Аксенов¹

¹Лаборатория ядерных реакций им. Г.Н. Флерова, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна; ²Институт ядерной физики, Алматы, Казахстан; ³Лаборатория ядерных проблем им. В.П. Джелепова, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

В ЛЯП ОИЯИ разрабатывается система ОФЭКТ на базе полупроводникового детектора Timepix с кодирующим коллиматором для исследования с использованием мультинуклидных радиофармпрепаратов с высоким энергетическим и субмиллиметровым пространственным разрешением на лабораторных животных [1]. Для изучения основных характеристик данной системы использовались калибровочные фантомы и традиционный для таких исследований радионуклид ^{99m}Tc , который получали, используя генератор $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Для наработки ^{99m}Tc использовали фотоядерный метод [2]. Радионуклид ^{99m}Tc получали в реакции $^{100}\text{Mo}(\gamma, n)^{99m}\text{Tc}$ путём облучения мишени из обогащённого ^{100}Mo массой 654 мг, энергией 23 МэВ, при токе 10 мкА в течение 6 дней на ускорителе электронов – МТ-25 в ЛЯР ОИЯИ. Для получения изотопного генератора $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ мы использовали методику [3], которую оптимизировали для нашего эксперимента. Выход полученного радионуклида для данной конфигурации мишени составил 583 Бк/мкА·мг·ч. Для заполнения фантомов использовали полученный раствор ^{99m}Tc 100 МБк. В результате исследованы основные характеристики системы ОФЭКТ, а также продемонстрированы возможности 2D и 3D изображений полученные на калибровочных фантомах.

1. V. Rozhkov, A. Zhemchugov— Visualization of radiotracers for SPECT imaging using a Timepix detector with a coded aperture // *Journal of Instrumentation*. Volume 15. 2020.
2. А.В. Сабельников, О.Д. Маслов, Л.Г. Молоканова, М.В. Густова, С.Н. Дмитриев. // *Радиохимия*. 2006. 48(2), 172-175.
3. Михеев Н.Б. и др. Генератор технеция-99м // *Радиохимия*. 1971. Т. 13. – С. 631-633.

КОМПЛЕКСЫ БИСПИДИНОВЫХ ЛИГАНДОВ С КАТИОНАМИ МЕДИ, СКАНДИЯ И ИТТРИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ

М.Д. Крайнова¹, Б.В. Егорова¹, А.В. Медведько^{1,2}, С.З. Вацадзе^{1,2}, С.Н. Калмыков¹

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт общей химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

Радиофармпрепараты с изотопами меди, скандия и иттрия могут применяться как тераностические агенты. Известно, что биспидиновые лиганды образуют с катионами переходных металлов устойчивые комплексы, в особенности, с катионами меди. Поскольку катионы Y^{3+} и Sc^{3+} обладают наименьшими среди РЗЭ радиусом, наиболее близким к радиусу Cu^{2+} , то было предположено, что они способны образовывать устойчивые комплексы с ацетатными биспидиновыми лигандами. В данной работе было исследовано комплексообразование катионов Cu^{2+} , Sc^{3+} и Y^{3+} с биспидиновыми лигандами с двумя (L1) и четырьмя (L2) ацетатными группами. Константы устойчивости комплексов определяли методом потенциометрического титрования. Для наиболее устойчивых комплексов были подобраны условия синтеза меченных ^{64}Cu , ^{44}Sc и ^{90}Y соединений: концентрации лигандов, pH, температура и время реакции мечения. Была оценена стабильность исследуемых меченных комплексов в условиях *in vitro* и *in vivo* (в организме конвенциональных лабораторных мышей). Было обнаружено, что лиганд L2, являясь более жестким основанием по сравнению с L1 образует комплексы с более высокими значениями константы комплексообразования: $\lg\beta(\text{CuL1})=14,2$, $\lg\beta(\text{CuL2})=21,3$, $\lg\beta(\text{YL2})=22,5$, $\lg\beta(\text{ScL2})=25,4$. Для каждого комплекса были подобраны условия проведения ТСХ для контроля меченной фракции. РХЧ препаратов достигала 95-97% при концентрации лигандов 0,1 мМ (для комплексов Y^{3+} и Sc^{3+}) и 0,2-0,5 мМ (для CuL2 и CuL1 , соответственно). При этом для эффективного комплексообразования с катионами Sc^{3+} и Y^{3+} требовалось нагревание (65°C) в течение 5 и 15 минут, соответственно. В условиях *in vitro* оказалось, что комплексы устойчивы в присутствии катионов микроэлементов и сывороточных белков. Ввиду высокой стабильности комплексов в условиях *in vitro* были проведены исследования для оценки устойчивости комплексов в течение одного и нескольких часов в условиях *in vivo*. Оценка биораспределения показала, что при введении радионуклидов, связанных в комплекс, наблюдается меньшая аккумуляция радиоактивности в органах и более быстрый клиренс активности по сравнению с введением свободных катионов радионуклидов. Это доказывает высокую устойчивость соединений в условиях *in vivo* и говорит о перспективности данных соединений в составе таргетных РФП для тераностического применения.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИМИДЖИНГ

Устные доклады

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СОСТОЯНИЯ МИЕЛИНОВЫХ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН

К.А. Ачкасова¹, К.С. Яшин¹, А.А. Моисеев², Е.Б. Киселева¹, Е.Л. Бедерина¹, Н.Д. Гладкова¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет; ²Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

Миелиновые нервные волокна, формирующие белое вещество центральной нервной системы, вовлекаются в патологические процессы, возникающие при инфильтративном росте злокачественных опухолей, что приводит к их повреждению и нежизнеспособности данных участков ткани. Для осуществления качественной резекции опухоли необходимо удалять данные участки, не допуская при этом повреждения здоровых областей, что затруднено в настоящее время в связи с отсутствием методов для прижизненной диагностики белого вещества в конкретной области в условиях операционной. Соответственно, существует необходимость внедрения диагностических методов, способных решить данную задачу, одним из которых может стать кросс-поляризационная оптическая когерентная томография (КП ОКТ). В связи с этим, цель нашей работы состояла в изучении возможности использования КП ОКТ для диагностики состояния миелиновых нервных волокон. Исследование было проведено на 90 послеоперационных образцах белого вещества, полученных от пациентов с глиомами головного мозга. Все образцы были исследованы методом КП ОКТ и затем подвергались гистологическому исследованию, на основании которого они были разделены на морфологические группы в соответствии со степенью повреждения миелиновых волокон. В результате визуального анализа КП ОКТ изображений было обнаружено, что повреждение миелиновых волокон в исследуемой области приводит к изменению получаемого ОКТ сигнала. При этом наблюдается снижение его интенсивности в исходной и ортогональной поляризации, его гетерогенность и неравномерность затухания по глубине, что значительно отличается от равномерного высокоинтенсивного быстро затухающего сигнала, характеризующего неповрежденное белое вещество. Применение количественной обработки ОКТ изображений, основанной на вычислении оптических коэффициентов, позволило выявить статистически значимую разницу между интактным и поврежденным белым веществом в значениях коэффициента затухания ОКТ сигнала в ко- и кросс-поляризациях ($p > 0,0001$), при этом, наличие поврежденных миелиновых волокон проявляется в снижении значений данных коэффициентов. Таким образом, КП ОКТ продемонстрировала перспективность использования для диагностики состояния миелиновых нервных волокон.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант №18-29-01049_мк.

FLIM-ИМИДЖИНГ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕТАБОЛИЗМА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК НА ГЕТЕРОГЕННЫХ СКАФФОЛДАХ

В.В. Елагин¹, С.А. Родимова^{1,2}, М.М. Карабут¹, Н.В. Минаев³, А.И. Шпичка⁴, П.С. Тимашев⁴, Е.В. Загайнова^{1,2}, Д.С. Кузнецова^{1,2}

¹Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия; ³Институт фотонных технологий РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Троицк, Москва; ⁴Первый Московский государственный медицинский университет, Москва

Большое число параметров влияет на метаболизм, миграцию и пролиферацию клеток при заселении ими скаффолдов перед имплантацией. Однако, при разработке тканеинженерных конструкций часто упускают из вида важнейший аспект – структурную гетерогенность восстанавливаемой ткани. В связи с этим, целью данной работы стало исследование влияния структурной гетерогенности скаффолдов на метаболизм посаженных клеток. Были разработаны два варианта скаффолдов, имеющих стандартную и гетерогенную структуру. Стандартные скаффолды представляли собой три слоя цилиндров с одинаковым диаметром. Гетерогенные скаффолды состояли из цилиндров разного диаметра с градиентной плотностью по глубине. Скаффолды синтезировали методом двухфотонной полимеризации. Для заселения скаффолдов использовали культуру мезенхимных стволовых клеток (МСК) из костного мозга мышей. Клеточный метаболизм исследовали методом время-разрешенной микроскопии FLIM. Анализ метаболического статуса МСК проводили на основе данных о вкладах времен жизни флуоресценции свободной и связанной форм НАДН и НАДФН. Показано, что в МСК, культивируемых на скаффолдах со стандартной структурой, времена жизни как свободной, так и связанной форм НАД(Ф)Н значительно не отличаются на 1 и на 7 сутки. При этом наблюдается значимое увеличение вклада свободной формы НАД(Ф)Н на 7 сутки после посадки клеток на скаффолды, что может указывать на сдвиг метаболического статуса МСК в сторону усиления гликолиза. В МСК, культивируемых на скаффолдах с гетерогенной структурой, значительных изменений на 7 сутки всех исследуемых параметров как для НАД(Ф)Н, так и для ФАД не наблюдалось. Это может быть следствием того, что при культивировании МСК на скаффолдах с гетерогенной структурой не происходит изменения метаболического статуса клеток. В целом, сопоставив все данные метаболического имиджинга, можно заключить, что в МСК, культивируемых на скаффолдах со стандартной структурой, происходит сдвиг к более интенсивному процессу анаэробного гликолиза, что указывает на возможный недостаток аэрации клеток. В то время как у МСК, посаженных на скаффолды с гетерогенной структурой, значительных изменений метаболического статуса не происходит.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-75-10008.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОЖИ С БЕЛКАМИ ВИРУСА НА ПРИМЕРЕ МОДЕЛЬНОГО БЕЛКА АЛЬБУМИНА МЕТОДОМ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Е.Н. Лазарева^{1,2}, И.Ю. Янина^{1,2}, Ю.В. Кистенев^{2,3}, В.В. Тучин^{1,2,4}

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов;

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск; ³Сибирский государственный медицинский университет, Томск; ⁴Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов

Изучение физических механизмов взаимодействия специфических вирусных белков и их комплексов, определяющих высокую контагиозность текущей коронавирусной инфекции на поверхностях с различными физико-химическими свойствами и липидными мембранами, является важной и актуальной задачей молекулярного имиджинга. Особый интерес представляют свойства S-белка, который определяет высокую контагиозность SARS-CoV-2. S-белок поверхностного рецептора образует шипы в липидной оболочке вируса. Функция этого белка – специфически связываться с рецепторами на мембранах атакованных клеток. Хорошо известно, что структура молекул альбумина схожа со структурой S-белка, поэтому он может рассматриваться в качестве эталонного «модельного» белка. Оптические методы, такие как Рамановская спектроскопия, позволяют оценить степень проницаемости и связывания модельного белка (альбумина) с клетками рогового слоя. В данной работе экспериментальные исследования *ex vivo* проводились на коже уха свиньи. Спектры комбинационного рассеяния были получены с использованием спектрометра (QE65000, со спектральным разрешением 10 см^{-1}), диодного лазера (785 нм, энергия лазера 400 мВт) и ручного зонда комбинационного рассеяния ($f=7,5 \text{ мм}$). Эффективный спектральный диапазон системы от 400 до 1800 см^{-1} . Каждое измерение было получено за время интегрирования 400 мс. Отмечаемые изменения спектров КР свидетельствуют о накоплении альбумина в поверхностных слоях кожи. Полученные результаты важны для понимания физических механизмов, которые обеспечивают такой эффект в некоторых случаях и неэффективны в других случаях, взаимодействия S-белка и связанных молекулярных комплексов с поверхностью кожи. *Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60505 и гранта по Постановлению Правительства Российской Федерации № 220 от 09 апреля 2010 г. (Соглашение № 075-15-2021-615 от 04.06.2021 г.)*

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА АКТИВИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ

А.В. Рябова^{1,2}, И.Д. Романишкин¹, Д.В. Поминова^{1,2}, М.В. Клементьева^{1,2}, Э.З. Садыкова², А.С. Скобельцин^{1,2}, В.Б. Лощенов^{1,2}

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН; ²Национальный исследовательский ядерный университет Московский инженерно-физический институт, Москва

Противоопухолевый иммунитет, индуцированный фотодинамической терапией (ФДТ), играет важную роль в исходе лечения злокачественных новообразований. Большой интерес представляет взаимодействия иммунных клеток с различными фотосенсибилизаторами (ФС). В работе исследуется накопление протопорфирина IX (ПпIX), индуцированного 5-аминолевулиновой кислотой (5-АЛК), Фотосенса, хлорина еб и метиленового синего (МС) в активированных макрофагах. Кроме того, оценено влияние ФДТ на изменение фенотипа макрофагов различных поляризаций.

Макрофаги, активированные липополисахаридами (ЛПС), были получены из линии клеток моноцитов человека THP-1 по методике [1]. Макрофаги с поляризациями M0, M1 и M2 получены из THP-1 с использованием методики [2]. Накопление ФС оценивали с помощью конфокальной микроскопии с возможностью регистрации спектро- и время-разрешенной флуоресценции. ФДТ проводили лазером 675 нм в дозах 5 Дж/см² и 50 Дж/см². Изменения жизнеспособности анализировали окрашиванием аннексином V и пропидиум йодидом. Для оценки изменения M1/M2 фенотипа макрофагов применяли окрашивание антителами CD206/CD86.

Продемонстрированы различия в накоплении ПпIX для активированных и неактивированных макрофагов. Интенсивность ПпIX оказалась выше в ЛПС-активированных клетках, тогда как МС и хлорин еб лучше накопились в клетках без активации. FLIM-данные показали уменьшение времени жизни флуоресценции NADH и FAD после инкубации с 5-АЛК. Эти результаты указывают на возможное изменение метаболизма от окислительного фосфорилирования к анаэробному гликолизу. При низкой дозе ФДТ макрофаги M0 переходили в фенотип M1, в остальных случаях тип M2 преобладал незначительно, превалировал апоптотический тип гибели клеток. Высокая доза ФДТ привела к деполяризации всех макрофагов до типа M2 и индуцировала массивный некроз. *Работа поддержана грантом РФФИ №20-02-00928.*

1. Liu X. et al. LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF- κ B, STAT3 or AP-1 activation. // *Molecular Medicine Reports*. 2018. 17(4):5484-5491.
2. Zhu Z. et al. Photodynamic activity of Temoporfin nanoparticles induces a shift to the M1-like phenotype in M2-polarized macrophages. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2018. 185:215-222.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОТКАНЕЙ МЕТОДОМ МУЛЬТИМОДАЛЬНОЙ ОКТ

М.А. Сироткина¹, Е.В. Губарькова¹, Е.Б. Киселева¹, А.А. Плеханов¹, Д.А. Воронцов², В.Ю. Зайцев³, А.А. Моисеев³, С.С. Кузнецов⁴, Е.В. Загайнова^{1,5}, Н.Д. Гладкова¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ; ²Нижегородский областной клинический онкологический диспансер; ³Институт прикладной физики РАН; ⁴Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко; ⁵Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

Мультимодальная оптическая когерентная томография (ОКТ) – современный метод визуализации биологических тканей. ОКТ позволяет изучать структуру, функциональное состояние, механические и оптические свойства биотканей. Технология

ОКТ может применяться в повседневной клинической практике в нейрохирургии, онкологии, абдоминальной хирургии, гинекологии и других областях медицины. ОКТ – это неинвазивная визуализация, позволяющая получать трехмерные изображения подповерхностных тканей с пространственным разрешением 10–20 мкм на глубине 1–2 мм без использования контрастных веществ в реальном времени. На основе ОКТ получают поляризационно-чувствительные, эластографические (характеризующие эластические свойства тканей) и ангиографические (кровеносные и лимфатические сосуды) изображения. ОКТ-ангиография показала высокую эффективность в оценке раннего ответа опухоли на фотодинамическую терапию (ФДТ) как в эксперименте на мышинной опухолевой модели рака толстой кишки (СТ26), так и на базальноклеточной карциноме. ОКТ-ангиография чувствительна к изменениям перфузии и не визуализирует сосуды с нарушенным кровотоком. В результате ФДТ в сосудах опухоли возникают тромбозы, что приводит к остановке кровотока. На основе этого явления был сформулирован критерий эффективности ФДТ. Снижение плотности кровеносных сосудов опухоли до <1,4% через 24 часа после ФДТ является предиктором полного ответа с диагностической точностью 93%. Снижение плотности кровеносных сосудов вокруг опухоли до <1,4% указывает на формирование гипертрофического рубца с диагностической точностью 88%. Компрессионная оптическая когерентная эластография (ОКЭ) продемонстрировала высокую чувствительность к изменениям микроструктуры опухоли после химиотерапии и таргетной терапии рака толстой кишки мыши СТ26 и рака молочной железы мыши 4Т1. ОКТ позволяет обнаруживать периваскулярный отек, небольшие скопления дистрофических клеток, жизнеспособные клетки и участки некроза с разрешением 40-50 мкм. ОКЭ позволяет улучшить контраст между неопухолевыми и опухолевыми тканями на границе рака молочной железы. Показано, что ОКЭ визуализация является более перспективной для выявления рака молочной железы по сравнению с поляризационно-чувствительными ОКТ-изображениями.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-75-10084.

АНАЛИЗ ФОТОЦИТОТОКСИЧНОСТИ АПКОНВЕРСИОННЫХ НАНОЧАСТИЦ В ПРИСУТСТВИИ ХОЛОСЕНСА

И.Ю. Янина^{1,2}, Р.А. Верховский¹, М.В. Ломова¹, Н.А. Наволокин³, В. И. Кочубей^{1,2}

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов;

²Томский национальный исследовательский государственный университет, Томск; ³Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского МЗ РА, Саратов

Используемые в терапии опухолевых процессов химиопрепараты цитостатического действия на основе алкалоидов не обладают избирательной активностью и имеют множество побочных эффектов. В результате, гибели подвергаются любые пролиферирующие клетки организма. Одним из побочных эффектов такого воздействия является развитие интоксикации, под влиянием продуктов распада некротизированной клетки. АПКОНВЕРСИОННЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ (АКНЧ) являются перспективными для визуализации структуры биологических тканей и органов в люминесцентном свете, а также для использования при диагностике заболеваний и фотоиндуцированной терапии. Были проведены исследования совместного использования АКНЧ и стандартного фотосенсибилизатора Холосенса (поглощение на 680 нм, люминесценция в области 650–700 нм). Так как при поглощении лазерного излучения АКНЧ в ближнем ИК диапазоне происходит последующая эмиссия фотонов в видимой области спектра, которая соответствует максимуму поглощения красителя Холосенса. Поглощение молекулами фотосенсибилизатора квантов света в присутствии кислорода приводит к фотохимическим реакциям, в результате которых молекулярный триплетный кислород превращается в синглетный (реакция по типу II), либо образуется большое количество высокоактивных кислородсодержащих радикалов (по типу I). Синглетный кислород и радикалы вызывают гибель клеток по механизму некроза и апоптоза. Исследования проводились на двух типах АКНЧ: N1 – наностержни (диаметр 50 нм, длина 100 нм); N2 – шестигранные призмы со средним размером сечения 40 нм (использовались в предыдущих сериях экспериментов). Выживаемость клеток определялась путем визуализации с использованием молекул флуоресцентного реагента Alamar Blue. Получено, что только облучение или добавление Холосенса не приводит к достоверным изменениям в клеточной жизнедеятельности Нер-2. В случае совместного применения АКНЧ (N2) при концентрации 10 мг/мл при 5 минутном облучении лазером на 980 нм и Холосенса (0,01 мг/мл) почти в 2 раза снижается метаболическая активность клеток, наблюдается необходимый токсический эффект на опухолевые клетки.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 19-12-00118).

ИЗУЧЕНИЕ ФЛУКТУАЦИЙ ВЯЗКОСТНЫХ СВОЙСТВ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ

Л.Е. Шимолина^{1,2}, А.Э. Хлынова¹, М.М. Лукина¹, Н.И. Игнатова¹, М.К. Куимова³, Е.В. Загайнова², М.В. Ширманова¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород; ²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; ³Имперский колледж Лондона, Великобритания

Вязкость мембраны – одно из важнейших биофизических свойств, характеризующих живые клетки и имеющих первостепенное значение для их нормального функционирования. Химиотерапия широко используется для лечения различных форм рака, однако мало известно о действии препаратов на биофизические и биофизические параметры клетки, в том числе на вязкость мембран. Одним из перспективных методов оценки вязкости является метод молекулярных роторов на основе BODIPY в сочетании с флуоресцентной микроскопией времени жизни флуоресценции FLIM. Целью работы было изучение микровязкости плазматической мембраны раковых клеток с использованием флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 и визуализации времени жизни флуоресценции FLIM при химиотерапии. Исследование было выполнено на культурах опухолевых клеток СТ26, НСТ116, HeLa Kyoto. Измерения вязкости осуществлялись с использованием молекулярного флуоресцентного ротора BODIPY2 в дозе 4.5 мкМ для клеток. Работа осуществлялась с помощью двухфотонной флуоресцентной микроскопии с опцией временного разрешения FLIM (Becker&Hickl, Германия) на установке LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). Исследованные линии раковых клеток показали разное время жизни флуоресценции ротора в мембранах, что означает, что они имеют разную вязкость плазматической мембраны. Наибольшее время жизни флуоресценции ротора зарегистрировано в

мембранах клеток НСТ116 – 492 ± 33 сП. Мембраны клеток СТ26 были несколько менее вязкими – 432 ± 39 сП. Наиболее жидкими мембранами в этой серии обладают клетки HeLa Kyoto – 344 ± 36 сП. Было выявлено, что при разном времени инкубации с 5ФУ меняется вязкость мембран исследуемых клеток: в течение 10 мин наблюдается снижение вязкости с 526 ± 67 сП до 470 ± 117 сП, спустя 1 ч было зарегистрировано статистически значимое повышение до 693 ± 105 сП, затем тенденция к снижению вязкости наблюдалась в последующие часы мониторинга, ~ 479 ± 69 сП. При действии цисплатина мы зарегистрировали статистически значимое увеличение вязкости через 24 ч инкубации – с 319 ± 30 сП до 384 ± 29 сП. Таким образом, полученные данные о вязкости позволяют расширить понимание механизмов действия химиопрепарата на живую клетку и роли вязкости в ответе на терапию. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-14-00111).*

ИМИДЖИНГ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ АВТОНОМНОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

И.В. Ямпольский

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

Многие живые организмы способны излучать видимый свет. Явление биолюминесценции обусловлено химической реакцией восстановления молекулярного кислорода специфическими субстратами – люциферинами, при ферментативном катализе соответствующими ферментами – люциферазами. В ходе эволюции такая способность возникла множество (несколько десятков) раз, благодаря чему биолюминесцентные системы различных таксономических групп организмов биохимически не родственны между собой. В настоящее время только для двух систем биолюминесценции – бактерий и высших грибов – известны полные наборы генов, необходимых и достаточных для свечения. В докладе будет освещена недавно открытая биолюминесцентная система грибов, названная нами "цикл кофейной кислоты", а также ее применение для имиджинга живых организмов, и, в частности – растений.

1. Plants with genetically encoded autoluminescence. T. Mitiouchkina, A.S. Mishin, L.G. Somermeyer, N.M. Markina, T.V. Chepurnyh, E.B. Guglya, T.A. Karataeva, K.A. Palkina, E.S. Shakhova, L.I. Fakhranurova, S.V. Chekova, A.S. Tsarkova, Y.V. Golubev, V.V. Negrebetsky, S.A. Dolgushin, P.V. Shalaev, D. Shlykov, O.A. Melnik, V.O. Shipunova, S.M. Deyev, A.I. Bubyrev, A.S. Pushin, V.V. Choob, S.V. Dolgov, F.A. Kondrashov, I.V. Yampolsky, K.S. Sarkisyan. *Nature Biotechnology*, 2020, 944.
2. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. A.A. Kotlobay, K.S. Sarkisyan, Y.A. Mokrushina, M. Marcet-Houben, E.O. Serebrovskaya, N.M. Markina, L.G. Somermeyer, A.Y. Gorokhovatsky, A. Vvedensky, K.V. Purtov, V.N. Petushkov, N.S. Rodionova, T.V. Chepurnyh, L.I. Fakhranurova, E.B. Guglya, R. Ziganshin, A.S. Tsarkova, Z.M. Kaskova, V. Shender, M. Abakumov, T.O. Abakumova, I.S. Povolotskaya, F.M. Eroshkin, A.G. Zarisnyy, A.S. Mishin, S. V. Dolgov, T.Y. Mitiouchkina, E.P. Kopantzev, H.E. Waldenmaier, A.G. Oliveira, Y. Oba, E. Barsova, E.A. Bogdanova, T. Gabaldón, C.V. Stevani, S. Lukyanov, I.V. Smirnov, J.I. Gitelson, F.A. Kondrashov, I.V. Yampolsky. *PNAS USA*, 2018, 12728.
3. 1001 Lights: Luciferins, Luciferases, Their Mechanisms of Action and Applications in Chemical Analysis, Biology and Medicine. Z.M. Kaskova, A.S. Tsarkova, I.V. Yampolsky. *Chemical Society Reviews*, 2016, 6048.

НОВЫЕ МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ КЛЕТОК, КЛЕТОЧНЫХ И ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ

К.А. Лукьянов^{1,2}

¹Сколковский институт науки и технологий; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Флуоресцентное мечение живых клеток дает возможность наблюдать целевые структуры и процессы в динамике. В нашей лаборатории ведутся несколько тематик по разработке методов в этой области. Различение индивидуальных клеток и их потомков (клеточных клонов) может дать интересную информацию при изучении сложных биологических моделей (например, организации мозга, эмбрионального развития, опухолеобразования и др.). Популярные методы Brainbow, LeGO и подобные обеспечивают стохастические различия в уровнях экспрессии флуоресцентных белков трех цветов, что позволяет отличать друг от друга сотни клеточных клонов с помощью флуоресцентной микроскопии в трех каналах. Мы предлагаем использовать флуоресцентные белки с разным временем жизни флуоресценции для дальнейшего увеличения количества различаемых клеточных клонов и улучшения надежности их дифференциации. Эпигенетические модификации гистонов играют огромную роль в регуляции экспрессии генов. На сегодняшний день, практически отсутствуют методы анализа эпигенома на уровне единичных живых клеток. Мы разработали генетически кодируемые эпигенетические сенсоры на основе природных «ридерных» доменов, узнающих модификации гистонов, и флуоресцентных белков. Такие сенсоры позволяют детектировать изменения внутриядерного распределения (ландшафтов) областей, обогащенных целевой модификацией в живых клетках в режиме реального времени. Анализ синтеза и транспорта мембранных белков сталкивается с проблемой медленного созревания хромофора во флуоресцентных белках. Для визуализации ранних этапов внутриклеточного распределения мембранных белков коронавируса SARS-CoV-2 мы применили различные методы. Метод KECs (K/E. coils) основан на обратимой специфической гетеродимеризации альфа-спиралей (одна спираль слита с флуоресцентным белком, другая – с целевым белком). В результате, заранее экспрессированный и созревший флуоресцентный белок, находящийся в цитозоле, немедленно присоединяется к новосинтезированному целевому белку и выявляет его локализацию. Также, билирубин-связывающий флуоресцентный белок UnaG проявляет зеленую флуоресценцию сразу после синтеза, что является несомненным преимуществом UnaG по сравнению с GFP-подобными белками. *Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 20-04-60370).*

МУЛЬТИМОДАЛЬНЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

В.О. Шипунова^{1,2,3}, А.С. Согомонян¹, Е.Н. Комедчикова¹, С.М. Деев^{1,2,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва; ³Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный

Стремительно развивающаяся область современной биомедицины, тераностика, подразумевает разработку и внедрение мультимодальных агентов, способных одновременно осуществлять как диагностические, так и терапевтические функции. Наиболее перспективной платформой для создания таких агентов являются наночастицы различной природы. Наноматериалам присущи уникальные свойства, не проявляющиеся у массивных образцов или атомов, которые позволяют максимально эффективно применять их в биомедицине, например: включение в состав низкорастворимых химиотерапевтических соединений, продукция активных форм кислорода под воздействием внешних электромагнитных полей, а также реализация направленной доставки химио- или радиопрепаратов к раковым клеткам. В докладе представлены результаты серии работ коллектива, посвящённых дизайну, синтезу и модификации спектра органических и неорганических наноструктур – магнитных, золотых, серебряных, кремниевых, гибридных умных структур, а также особое внимание уделено полимерным наноструктурам для визуализации первичных опухолевых узлов и метастазов, и для терапии онкозаболеваний [1–7]. Разработанные наночастицы были успешно модифицированы нацеливающими молекулами различной природы: полноразмерными и мини-антителами, а также скаффолдовыми распознающими белками. Был разработан ряд методов по введению данных наночастиц в организм, в т.ч., влияющих на время полувыведения из кровотока и улучшающие накопление в ксенорафтных опухолях [5, 7]. Данные исследования являются шагом на пути к созданию средств биомедицины нового поколения, которые способны диагностировать очаг болезни и действовать как терапевтическое соединение при необходимости. *Исследование поддержано проектами РФФИ 20-34-70136 (работа с культурами клеток) и РФФИ 17-74-20146 (синтез наноконструкций).*

1. Shipunova V.O. et al., *ACS Nano* 14 (10), 12781–12795(2020).
2. Shipunova V.O. et al., *ACS Applied Materials & Interfaces* 10(20), 17437-17447(2018).
3. Nikitin M.P. et al., *Nature Nanotechnology* 9 (9), 716(2014).
4. Kabashin A.V. et al., *Advanced Functional Materials* 29 1902692(2019).
5. Nikitin M.P. et al., *Nature Biomedical Engineering* 4(7), 717-731(2020).
6. Shipunova V.O. et al., *Nanoscale* 8 (25), 12764-12772(2016).
7. Zelepukin I.V. et al., *Nanoscale* 11 (4), 1636-1646(2019).

МАГНИТНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ МРТ ДИАГНОСТИКИ

М.А. Абакумов¹, А.Н. Габашвили¹, М.В. Ефремова^{1,2}, А.С. Семкина¹

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва; ²Гельмгольц центр, Мюнхен, Германия

Магнитные наноматериалы на основе наночастиц оксидов железа находят все больше применений в различных областях биомедицины, в частности они могут выступать в качестве T2 контрастных агентов для МРТ. Магнитные наночастицы оксида железа обладают низкой токсичностью, а их модификация определенными покрытиями позволяет получать стабильные водные коллоидные растворы, пригодные для внутривенного введения с длительным временем циркуляции в кровотоке. В ходе наших работ было исследовано влияние формы, размера и структуры магнитных наночастиц оксида железа на их МРТ контрастные свойства, а также на эффективность их доставки в опухоль [1, 2]. Показана возможность избирательного выведения из организма с мочой магнитных наночастиц кластерной структуры после их внутривенного введения [3]. Доказана эффективность использования магнитных липосом для предсказания эффективности терапии опухолей липосомальной формой доксорубина [4]. Путем реализации стабильной экспрессии генов бактериального белка инкапсулина, фермента ферроксидазы и белка-переносчика железа продемонстрирована принципиальная возможность создания генетически кодируемой метки для обнаружения стволовых клеток методом МРТ после их введения в организм.

Работы поддержаны грантом РФФИ №19-45-06302.

1. Abakumov M. et al., “VEGF-targeted magnetic nanoparticles for MRI visualization of brain tumor,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 11, no. 4, 2015, doi: 10.1016/j.nano.2014.12.011.
2. Nikitin A. et al., “Synthesis, characterization and MRI application of magnetite water-soluble cubic nanoparticles,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 441, 2017, doi: 10.1016/j.jmmm.2017.05.039.
3. Naumenko V. et al., “Intravital microscopy reveals a novel mechanism of nanoparticles excretion in kidney,” *J. Control. Release*, vol. 307, pp. 368–378, 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2019.06.026.
4. Naumenko V. et al., “Intravital imaging of liposome behavior upon repeated administration: A step towards the development of liposomal companion diagnostic for cancer nanotherapy,” *J. Control. Release*, vol. 330, no. July 2020, pp. 244–256, 2021, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.12.014.

НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ МУЛЬТИМОДАЛЬНОЙ *IN VIVO* ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МРТ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ПРИ ОПТИЧЕСКОМ ПРОСВЕТЛЕНИИ

В.В. Тучин^{1,2,3}, И.Г. Меерович⁴, Д.К. Тучина^{1,2}, В.В. Жердева⁴, Н.И. Казачкина⁴, И.Д. Соловьев⁴, А.П. Савицкий⁴, А.А. Богданов мл.⁵

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов; ²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск; ³Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов; ⁴Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ⁵University of Massachusetts Medical School, Worcester, United States

Изучены перспективы мультимодальной оптической и МРТ визуализации при использовании оптических просветляющих агентов на примере исследования оптического просветления кожи лабораторных животных *ex vivo* и *in vivo* с использованием низкомолекулярных парамагнитных магнитно-резонансных контрастных агентов. В результате получено существенное повышение глубины зондирования и контраста изображения в методах флуоресцентной лазерной визуализации и оптической когерентной томографии (ОКТ). Измерение кинетики спектров коллимированного пропускания образцов кожи мыши *ex vivo* позволили определить коэффициенты диффузии широко используемых в медицине МРТ-агентов Gadovist®, Magnevist® и Dotarem®, а также КТ-агента Visipaque® и определить степень извилистости ткани, параметр, характеризующий затруднение диффузии агента в ткани по сравнению с диффузией в воде. Коэффициенты диффузии были определены как $(4,3 \pm 0,4) \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ (Gadovist®), $(5,0 \pm 0,7) \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ (Magnevist®), $(3,7 \pm 0,7) \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ (Dotarem®) и $(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ (Visipaque®), а параметр извилистости оказался в пределах 3–3,5. Применение МРТ-агентов Gadovist® и Magnevist® привело к более существенному оптическому пропусканию кожи (т.е. оптическому просветлению), что позволило получить: 1) почти 19-кратное увеличение пропускания на длине волны 540 нм и 7 – 8-кратное – в ближней ИК области 750 – 900 нм; 2) заметное улучшение ОКТ изображений морфологии кожи; 3) 2-5-кратное увеличение отношения интенсивности флуоресценции к фону при использовании TagRFP-красного флуоресцентного маркерного белка, экспрессируемого в опухоли, после нанесения в течение 15 мин на кожу животных *in vivo*. Полученные результаты важны для мультимодальной визуализации опухолей, а именно, при комбинации лазерных флуоресцентных и ОКТ-методов с МРТ и КТ, поскольку исследуемые контрастные агенты способны одновременно повышать контраст нескольких методов визуализации.

Работа В. В. Тучина поддержана грантом Правительства Российской Федерации 14. Z50.31.0044, а Д. К. Тучиной стипендией Президента Российской Федерации № СП-5422.2021.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОПТИЧЕСКИ ПРОСВЕТЛЯЮЩИХ КОМПОЗИЦИЙ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО И МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОГО ИМИДЖИНГА НА ТКАНИ ОПУХОЛИ *IN VIVO*

А.А. Богданов мл.^{1,2,3}, Н.И. Казачкина¹, В.В. Жердева¹, М.Г. Меерович¹, Д.К. Тучина^{4,5}, И.Д. Соловьев¹, А.П. Савицкий¹, В.В. Тучин^{4,5,6}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Медицинский факультет Университета штата Массачусетс, Кембридж, США; ³Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁴Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов; ⁵Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск; ⁶Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов

Оптическое просветление увеличивает глубину проникновения света в ткани и улучшает результаты оптического изображения *in situ* и *in vivo*. Применяемые для просветления тканей агенты должны быть биосовместимыми и не должны оказывать повреждающего действия на ткани. Мультимодальная регистрация оптической и магнитно-резонансной томографии (МРТ) сигналов в совпадающих вокселях ткани важна для повышения точности реконструкции оптического изображения. Опыты проводили в мышах *nu/nu* с опухолями А-549- или НЕР-2-TagRFP. Для изучения оптически просветляющих композиций (ОПК) были использованы растворы с добавлением 5% ДМСО, обладающих диамагнитными или парамагнитными свойствами. ОПК применяли наружно в зоне роста опухоли в течение 15-20 мин. С помощью флуоресцентного имиджинга было показано, что обе ОПК повышали интенсивность флуоресценции опухолей в зависимости от времени после аппликации. При изучении действия диамагнитной ОПК методом МРТ (T2w, TR/TE=4000/40) в коже и подкожном слое ткани опухоли было зарегистрировано кратковременное (15-20 минут после аппликации) снижение интенсивности нормированного магнитно-резонансного сигнала в зоне воздействия в среднем на 14%. В этом режиме *in vitro* интенсивность МР сигналов ОПК и воды не отличались между собой. Таким образом, наблюдали: 1) временное изменение свойств периферической ткани опухоли и сокращение среднего времени релаксации протонов в вокселях (уменьшение T2w интенсивности); 2) изменение микровязкости из-за проникновения компонентов ОПК, приводящим к сокращению времени релаксации протонов воды. Оба процесса могут быть вызваны вытеснением воды из ткани, вызванным глицирином, и проникновением в нее молекул ДМСО. Для ОПК с парамагнитными свойствами использовали режим T1w GRE. Установлено, что в коже снижалась интенсивность сигнала МРТ, а затем сигнал возрастал в течение 1 ч. Была выдвинута гипотеза от том, что интенсивность сигнала МРТ отражает комбинированный эффект гадобутрола, т. е. 1) магнитной восприимчивости; 2) проникновения гадобутрола через кожу. Полученные результаты свидетельствуют о том, что МРТ способствует механистическим представлениям об эффектах ОПК в коже и подкожном слое опухоли. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 14.W03.31.0023).

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ МОЛЕКУЛЯРНОГО ИМИДЖИНГА

Л.В. Козлова, А.А. Петрова, Т.А. Горшкова

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань

За сорок лет своей истории атомно-силовая микроскопия (АСМ) неоднократно применялась для исследования биологических объектов, однако, потенциал этой технологии для наук о жизни еще далеко не исчерпан. Разрешение, достижимое с помощью АСМ, сопоставимо с таковым для электронной микроскопии, но в отличие от нее не требует работы в вакууме, обезвоживания, напыления проводящего покрытия, ультратонких срезов и пр. Объекты исследования могут оставаться живыми или, по крайней мере, быть значительно ближе к состоянию *in vivo* за счет сокращенной пробоподготовки. Еще одним преимуществом АСМ является возможность манипулирования объектом. Использование зонда АСМ в качестве нано-датчика позволяет изучать с высоким разрешением механические свойства объектов, их гидратацию, проводимость, силы взаимодействия с контрагентами и др. В своей работе мы применяем АСМ для изучения сложных углеводов и надмолекулярных структур на их основе – растительных клеточных стенок. Так, используя этот подход, мы продемонстрировали, что молекулы рамногалактуронана I, синтезируемые в разных тканях и на разных этапах развития растений льна, несмотря на наличие сходных элементов первичной структуры, обладают существенными конформационными различиями (Petrova et al., 2019). Возможность получения изображений индивидуальных молекул полисахаридов позволяет надеяться на прогресс в соотношении первичной и вторичной структур этих полимеров, который в настоящий момент далеко отстает от аналогичных исследований белков и нуклеиновых кислот. Углеводный ансамбль растительных клеточных стенок специфичен для их отдельных слоев и для разных тканей растения. Кроме того, он непрерывно видоизменяется в ходе развития клеток. Уникальный набор полисахаридов обеспечивает клеточным стенкам определенные механические свойства, что в свою очередь обуславливает морфогенез отдельных клеток, органов и всего растения в целом. Подтверждение этой концепции было получено нами на корнях кукурузы и стеблях льна (Petrova et al., 2021a, b). *Часть работ выполнена при поддержке Российского научного фонда (18-14-00168; 19-14-00361).*

Petrova et al. 2019. *Carb. Pol.* 216:238–246

Petrova et al. 2021a. *J. Exp. Bot.* 72:1764–1781

Petrova et al. 2021b. *Front. Plant Sci.* 12:660375

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕН АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В 164 И 178 ПОЛОЖЕНИЯХ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА SAASoti НА ЕГО ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

А.В. Гавшина¹, И.Д. Соловьев¹, Т.В. Ивашина^{1,2}, А.П. Савицкий¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пущино

Огромное разнообразие фотопревращений флуоресцентных белков стало основой для прорывных методик флуоресцентной микроскопии, позволяющих получать изображение с разрешением выше дифракционного предела. Впервые сочетание свойств фотопереключения из флуоресцирующей в темную форму и возможности необратимой фотоконверсии со смещением спектра хромофора путем замены аминокислотных остатков M164A и F178S в области хромофора было обнаружено для белков EosFP и Dendra2, которые были названы бифотохромными. Эти свойства позволили комбинировать методы субдифракции и наблюдения за перемещением отдельных молекул. Флуоресцентный белок SAASoti в исходной последовательности обладал бифотохромными свойствами. В ходе работы был отобран наиболее перспективный с точки зрения его использования в методах супер-разрешающей микроскопии вариант SAASoti, содержащий замены C21N/K145P. Методом сайт-направленного мутагенеза с использованием выродженных праймеров были получены формы SAASoti со случайными аминокислотными остатками в положениях 164 и 178. Анализ фотопревращений произвели при облучении колоний клеток *E. coli*, экспрессирующих полученные белки, с помощью сконструированной для данной задачи оптической установки, позволяющей одновременно облучать колонии светом 400, 470, 560 нм и детектировать спектры эмиссии. Колонии клеток *E. coli*, экспрессирующих варианты SAASoti с отличными от белка дикого типа кинетическими параметрами в реакциях фотопревращений, были впоследствии просеквенированы. Так, оказалось, что в случае замены а.о. в положении 178 скорость фотопереключения при замене F178G увеличилась в 14 раз, в то время для других замен увеличение не превышало 5 кратного. В случае замен а.о. в 164 положении скорость фотопереключения в среднем увеличилась в 15 раз, за исключением замен на F и Q, где она осталась неизменной. Замены в 164 положении драматически сказались на свойствах фотоконверсии, причем замена в положении M164A, аналогичная первым бифотохромным белкам, приводит к нарушению фотоконверсии только в случае замены K145P SAASoti, что было подтверждено на формах, полученных сайт-направленным мутагенезом. Таким образом были получены и отобраны формы SAASoti с лучшими параметрами фотопереключения. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-14-00373.*

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ МЕТОДАМИ ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИМИДЖИНГА И РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

В.И. Щеславский^{1,2}, М. Ширманова¹, Д. Южакова¹, Д. Лагартто³, Р. Чиччи³, В. Беккер²

¹Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород; ²Беккер&Хикль ГмбХ, Берлин, Германия; ³Европейская лаборатория нелинейной спектроскопии (LENS), Сесто Фиорентино, Италия

Методы оптической спектроскопии, использующие измерения времен жизни флуоресценции и ее спектров, а также комбинационное рассеяние света (эффект Рамана) хорошо дополняют традиционные методы диагностики биологических тканей такие, как магнитно-резонансная томография (МРТ) или позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) поскольку, будучи оп-

тическими методами, являются неинвазивными, имеют высокую чувствительность к структурным и функциональным характеристикам тканей и при этом не требуют использования меток. Спектроскопия с временным разрешением позволяет получать информацию о конформационных состояниях флуорофоров, их связывании с другими молекулами и физико-химических свойствах их микроокружения, таких как pH, показатель преломления, вязкость и других. Поскольку параметры эндогенной флуоресценции (спектр, время жизни, интенсивность) меняются в зависимости от метаболического статуса биологических объектов, представляется важным их одновременное измерение. С другой стороны, рамановская спектроскопия исследует неупругое рассеяние фотонов при их взаимодействии с колебательными уровнями молекул в образце. Измерения спектров Рамана, таким образом, позволяют получить молекулярную «карту» биологических образцов без меток, становясь все более популярными для неинвазивной оценки пораженных тканей. В первой части доклада представлены результаты разработки новой волоконно-оптической системы для одновременной регистрации данных о времени жизни флуоресценции и спектров комбинационного рассеяния из одной и той же области. Измерения времени жизни флуоресценции с помощью коррелированного по времени счета одиночных фотонов осуществляются с периодическим противофазным внешним освещением поля зрения, что позволяет получать данные при ярком освещении образца. Вторая часть доклада посвящена результатам исследований биологических тканей с использованием макроскопической лазерной сканирующей конфокальной системы. Интегрированный в такую систему 16 канальный спектральный детектор, работающий в режиме счета одиночных фотонов, позволяет одновременно наблюдать несколько флуорофоров. Таким образом появляется возможность получать информацию не только о временах жизни флуоресценции, но и о ее спектральном составе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 20-65-46018.

ДИМЕРНЫЕ ЦИАНИНОВЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ СВЕРХВЫСОКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТочНОЙ МЕМБРАНЫ

И.О. Апарин¹, Р. Ян^{2,3}, Д.И. Данильчук¹, К. Ксю^{2,3}, А.С. Климченко¹

¹Лаборатория биоимиджинга и патологий, UMR 7021 CNRS, Университет Страсбурга, Илькириш, Франция; ²Химический факультет, Университет Калифорнии, Беркли, США; ³Чан Цукерберг Биохаб, Сан-Франциско, США

Визуализация микроскопических объектов с разрешением ниже дифракционного предела видимого света стала возможна за счет флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения. Сверхвысокое разрешение достигается за счет локализации эмиссии одиночных флуорофоров (SMLM Single Molecule Localization Microscopy) и реконструкция изображения путем наложения многочисленных пикселей в одну полную картину (STORM Stochastic Optical Reconstruction Microscopy). В частности, визуализация ландшафта клеточной мембраны возможна при использовании флуоресцентного зонда с низкой аффинностью к липидному бислою мембраны, который обратимо связывается с поверхностью клетки (не прокрашивая ее) активируясь при этом как флуорофор. Впервые мы показали, что для этих целей могут быть успешно использованы зонды на основе димерных цианиновых красителей. Два цианиновых красителя Су3, соединенные гибким линкером, склонны к образованию «затупенной» формы в растворе – Н-агрегата. Связывание с клеточной мембраной сопровождается раскрытием такой димерной структуры зонда и многократным усилением флуоресцентного сигнала. Для снижения фонового сигнала, неспецифических взаимодействий с поверхностью и настройки аффинитета к мембране, мы варьировали общую гидрофобность и заряд структуры зонда. Так, две боковые группы, несущие N-бутиламинопропилсульфонат нейтрализуют положительный заряд цианинового красителя, приводя к локализации зонда на клеточной мембране с его минимальной интернализацией внутрь клеток. Введение дополнительной карбоксильной группы в структуру линкера увеличивает общую гидрофильность молекулы, сокращая время нахождения зонда на клеточной мембране, увеличивая количество актов привязки-отвязки к ней. Клеточная линия HeLa была визуализирована при помощи полученных зондов в TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) режиме флуоресцентного микроскопа с локализацией одиночных молекул на мембране. При реконструкции изображений была воссоздана клеточная мембрана HeLa со сверхвысоким разрешением. Сравнение полученных зондов с красителем Нильским Красным показало существенно более высокую яркость одиночных флуоресцентных событий, а также, количество собранных фотонов за единицу времени для зондов оказалось на один порядок выше, чем для Нильского Красного.

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВЫСОКОРЕАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

**А.И. Костюк^{1,2,3}, А.С. Панова^{1,2,3}, Р.И. Раевский¹, Д.А. Котова^{1,2}, А.Д. Сергеева^{1,4}, И.В. Кельмансон^{1,2,3},
А.Д. Иванова^{1,4}, М.А. Тосунян^{5,6,7}, М. Таувин^{8,9}, Х. Вани^{5,6,7}, И. Ван Мелле^{5,7}, Д. Езериня^{5,6,7}, М.С. Баранов^{1,10},
М.С. Почечуев⁴, А.А. Ланин^{4,11,12}, А.С. Чеботарев⁴, И.В. Федотов^{4,11,12,13}, А.Б. Федотов^{4,11,12}, А.М. Желтиков^{4,11,12,13},
С. Фриз^{8,14}, Й. Мессенс^{5,6,7}, В.В. Белоусов^{1,2,3,15,16}, Д.С. Билан^{1,2,3}**

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ³Лаборатория экспериментальной онкологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁴МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁵VIB-VUB Center for Structural Biology, Брюссель, Бельгия; ⁶Brussels Center for Redox Biology, Брюссель, Бельгия; ⁷Structural Biology Brussels, Vrije Universiteit Brussel, Брюссель, Бельгия; ⁸Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS, INSERM, PSL Research University, Париж, Франция; ⁹Sorbonne Université, Collège Doctoral, Париж, Франция; ¹⁰НИЛ химии лекарственных субстанций, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ¹¹Российский квантовый центр, Сколково, Москва; ¹²Казанский квантовый центр, Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, Казань; ¹³Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station, Texas, США; ¹⁴Université de Paris, Париж, Франция; ¹⁵Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва; ¹⁶Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, Геттинген, Германия

Высокоактивные компоненты клеток представлены разновидностями активных форм кислорода (ROS), азота (RNS), серы (RSS), гипогалогенитами, реактивными карбонильными формами (RCS). Общим свойством для высокоактивных внутриклеточных компонентов является их способность взаимодействовать с широким спектром биологических молекул, влияя

на их функции. Из-за высокой реакционной способности и непродолжительного времени жизни подобные компоненты крайне сложно исследовать. Традиционные подходы не позволяют оценивать динамику их концентраций в режиме реального времени в живых целостных объектах. Разработка и применение генетически кодируемых биосенсоров на базе флуоресцентных белков является стремительно развивающимся направлением в современной науке. Подобные инструменты послужили импульсом для развития редокс-биологии. Например, применение созданных молекулярных инструментов наглядно подтверждает, что ROS ассоциированы не только с развитием окислительного стресса, но и выполняют важную роль в регуляции многих внутриклеточных процессов. Однако биологические функции многих соединений с высокой реакционной способностью по-прежнему малоизучены из-за отсутствия подходящих методов исследований. В то время, как для визуализации некоторых редокс-активных соединений созданы целые семейства биосенсоров, в исследовании других подобные решения до сих пор не найдены. Наша научная группа занимается разработкой генетически кодируемых редокс-биосенсоров. Мы создали первый в мире биосенсор для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных на базе гипохлорит-чувствительного бактериального белка NemR из *E. coli*, в последовательность которого был интегрирован флуоресцентный белок srYFP. Биосенсор позволяет визуализировать динамику гипогалогенного стресса в живых клетках, а также *in vivo*, что было показано на модели воспаления в тканях zebrafish *Danio rerio*. Мы также работаем над созданием биосенсоров для регистрации активных форм серы, в результате была получена рабочая версия биосенсора для регистрации полисульфидов на основе бактериального белка BigR из *Xylella fastidiosa*. Настоящий доклад посвящен биологической роли некоторых высокореактивных соединений, а также новейшим методам их визуализации в живых системах. *При поддержке гранта РФФИ 17-15-01175.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МЕЛАНОЦИТАРНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

В.В. Елагин¹, О.Е. Гаранина¹, В.В. Дуденкова¹, Н.Ю. Орлинская¹, И.Л. Шливко¹, И.А. Клеменова¹, Е.В. Загайнова^{1,2}

¹Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ; ²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

Известно, что для меланомы характерна высокая гетерогенность, которая может проявляться на различных уровнях от экспрессии генов до архитектуры ткани. В связи с этим целью данной работы являлось исследование метаболической гетерогенности меланоцитарных новообразований с использованием флуоресцентной микроскопии с временным разрешением. Проведено прижизненное исследование 90 меланоцитарных новообразований у пациентов. Обнаружено, что клетки, формирующие новообразования, могут быть разделены на две группы в соответствии со значениями среднего времени жизни флуоресценции. Клетки первой группы характеризуются низкими значениями среднего времени жизни флуоресценции. Для клеток зернистого, шиповатого и базального слоев доброкачественных новообразований были получены следующие значения: 553±158 пс, 586±268 пс и 156±17 пс. В случае меланомы, эти значения были еще ниже и составляли 285±120 пс, 422±143 пс и 432±86 пс, соответственно. Также было установлено, что флуоресценция клеток этой группы характеризовалась низкими значениями относительного вклада длинной компоненты 4-13%. Вторая группа клеток характеризовалась значениями среднего времени жизни флуоресценции и относительного вклада длинной компоненты сопоставимыми со значениями, характерными для НАДН клеток кожи. В доброкачественных невусах значения среднего времени жизни флуоресценции, а также вклада длинной компоненты имели тенденцию к снижению при переходе от клеток зернистого слоя к клеткам базального. В случае меланом, значения среднего времени жизни флуоресценции снижались при увеличении глубины расположения слоя клеток, однако, были ниже аналогичных значений для доброкачественных невусов. Кроме того, клетки всех слоев эпидермиса меланом характеризуются более низкими значениями вклада длинной компоненты. Таким образом, с использованием флуоресцентной микроскопии с временным разрешением было показано присутствие в меланоцитарных новообразованиях двух групп клеток, отличающихся по значению среднего времени жизни флуоресценции. Также установлено, что клетки меланомы характеризуются более низкими значениями среднего времени жизни флуоресценции и вклада длинной компоненты, по сравнению с доброкачественными новообразованиями.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТКАНИ КИШЕЧНОЙ СТЕНКИ ПРИ ОСТРОЙ МЕЗЕНТЕРИАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Е.Б. Киселева¹, М.Г. Рябков¹, М.М. Лукина^{1,2}, М.А. Сизов³, Д.А. Сачкова⁴, Е.Л. Бедерина¹, М.В. Багрянцев³, В.И. Щеславский^{1,5}, М.В. Ширманова¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва; ³Городская клиническая больница № 30, Нижний Новгород; ⁴Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; ⁵Becker&Nickl GmbH, Берлин, Германия

Изменения в метаболическом статусе тканей могут служить индикаторами ишемических процессов, сопровождая микроциркуляторные расстройства, и чаще всего предшествуют структурным повреждениями органа. Острая мезентериальная ишемия тонкой кишки сопровождается ишемическими повреждениями кишечной стенки различной степени выраженности, вплоть до трансмурального некроза. Проблема объективизации состояния тканей перед резекцией нежизнеспособных тканей стоит крайне остро и требует применения новых высокоточных технологий интраоперационной диагностики. Целью данного исследования была *in vivo* оценка времени жизни флуоресценции эндогенных флуорофоров тканей тонкой кишки крыс в норме и при острой артериальной ишемии для определения жизнеспособности тканей. В работе использован оригинальный двухканальный конфокальный однофотонный FLIM/PLIM макросканер (Becker&Nickl, Германия). Флуоресценцию преимущественно от метаболического кофактора НАД(Ф)Н возбуждали с помощью пикосекундного лазера на длине волны 375 нм, детектировали в диапазоне 435-485 нм. Исследованы 4 зоны тонкой кишки со стороны серозной оболочки: границы резекции (оставленные концы кишки – группа 1 и прилегающие к ним резецируемые участки – группа 2), центр ишемии с трансмуральным некрозом – группа 3 и норма (до ишемии) – группа 4. После сканирования образцы тканей забирали на патоморфологический анализ. Установлено, что средневзвешенное время жизни флуоресценции и вклад короткой компоненты статистически

значимо отличались между нормальной (группа 4) и ишемизированной тканью с наличием некрозов (группа 3). На границах резекции между группами 1 и 2 статистически значимой разницы не наблюдалось. Полученные результаты свидетельствуют об изменении энергетического метаболизма ишемизированных/некротизированных тканей кишки крысы по сравнению с нормой. Таким образом, было показано, что регистрация флуоресценции эндогенных флуорофоров в серозном слое тонкой кишки при моделировании острой артериальной ишемии позволяет *in vivo* детектировать зоны с наличием очагов некроза в нижерасположенных слоях кишки (подслизистом и слизистом), что носит новаторский характер. *Работа поддержана Грантом РФФ № 19-75-10096.*

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ И FRET-СЕНСОРОВ КАСПАЗЫ 3 НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

И.Г. Меерович¹, Н.К. Марынич¹, И.Э. Грановский², Д. Фикслер³, А.П. Савицкий¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино; ³Institute for Nanotechnology and Advanced Materials, Bar-Ilan University, Ramat Gan, Israel

В настоящее время много внимания уделяется исследованиям, приводящим к созданию многофункциональных сенсоров для изучения различных биологических характеристик живых организмов. Оптимальным было бы наличие у таких сенсоров дополнительной терапевтической модальности.

В данной работе в качестве платформы для таких многофункциональных терапевтических зондов предлагается использовать золотые наночастицы различной формы. В качестве одной из диагностических биомолекул, которой модифицируются наночастицы, используется созданный нами новый белок слияния – FRET-сенсор каспазы 3, состоящий из флуоресцентного белка TagRFP и нефлуоресцирующего хромобелка Ultramarine, разделенных спейсером из 23 аминокислот, включающим последовательность DEVD, сайт распознавания каспазы 3. Принципиальным отличием от ранее полученного сенсора TagRFP-23-KFP, который также демонстрирует изменение времени жизни при расщеплении каспазой 3, является мономерная форма хромобелка Ultramarine (в отличие от тетрамерного KFP), что должно послужить уменьшению стерических затруднений при связывании FRET-сенсора с наночастицами.

Чтобы предопределить направление связывания FRET-сенсора с золотыми наночастицами, был получен вышеуказанный сенсор в биотинилированном виде. Для этого генноинженерными методами при создании соответствующей плазмиды в неё был введен фрагмент, кодирующий биотин-связывающий пептид AviTag. В дальнейшем белок нарабатывался из клеток *E. coli*, штамм BL21(DE3), трансформированных двумя плазмидами: кодирующей биосинтез FRET-сенсора с AviTAG и кодирующей биосинтез биотин-лигазы BirA, в присутствии в среде соответствующих селективирующих антибиотиков и биотина. Была оптимизирована методика выделения биотинилированного сенсора, в частности, смесь осажденных белков подвергалась вначале гидрофобной хроматографии, а затем аффинной хроматографии на Streptavidin-mutated Matrix, с последующим диализом для удаления несвязанного биотина. Полученный сенсор был охарактеризован при помощи спектральных методов, электрофореза и динамического светорассеяния (ДСР). Были получены конъюгаты золотых наночастиц со стрептавидином, а затем конъюгаты этого «сэндвича» с биотинилированным сенсором. Полученные конъюгаты также были охарактеризованы при помощи спектральных методов и ДСР. *Исследование выполнено при поддержке РФФИ (гранта № 19-54-06008 МНТИ_a) и Ministry of Science and Technology of Israel (грант № 3-16536).*

Стендовые доклады

МУЛЬТИМОДАЛЬНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИМИДЖИНГ: ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ТРАНСКРИПТОМИКА И МЕТАБОЛОМИКА СЛОЕВ КОРЫ МОЗГА БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

О.И. Ефимова¹, Г.Н. Владимиров¹, П.В. Мазин¹, А.В. Токарчук¹, И.И. Курочкин¹, М.С. Качановский⁴, А.Ю. Морозова^{2,3}, Г.П. Костюк², Е.Н. Николаев¹, Ф.Е. Хайтович¹

¹Сколковский институт науки и технологий (Москва, Россия); ²Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева ДЗ Москвы; ³Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского МЗ РФ; ⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва

Кора мозга человека имеет сложную цитоархитектуру, которая варьирует между функционально разными регионами и меняется при нейропсихических заболеваниях. Омиксные технологии позволяют полномасштабно оценить молекулярные изменения, но до сих пор их результаты усреднялись для тысяч и сотен тысяч клеток мозга. Технология цифрового пространственного профилирования GeoMx DSP на срезах префронтальной и височной коры мозга человека позволила выявить сотни генов, экспрессия которых различалась в разных слоях и регионах неокортекса у здоровых людей и больных шизофренией. Транскриптомные различия валидированы мультиплексным профилированием с использованием 66 антител к маркерам разных типов клеток мозга, аутофагии, болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. Масс-спектрометрический имиджинг липидов с использованием MALDI на параллельных срезах мозга подтвердил и углубил результаты о нарушениях миеоархитектуры верхних слоев и белого вещества коры мозга при шизофрении. Мультиомодальный молекулярный имиджинг позволяет масштабно и быстро охарактеризовать образцы мозга с клеточным пространственным разрешением.

МУЛЬТИМОДАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА НОВООБРАЗОВАНИЙ КОЖИ

Э.А. Генина^{1,2}, Е.Н. Лазарева^{1,2}, Ю.И. Сурков^{1,2}, И.А. Серебрякова^{1,2}, А.Н. Башкатов^{1,2}, Я.К. Кузинова³,
О.М. Конопацкова³, В.В. Тучин^{1,2,4}

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов;

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск; ³Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского МЗ РФ, Саратов; ⁴Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов

Злокачественные новообразования кожи находятся в числе наиболее распространенных видов онкологических заболеваний. В настоящее время большое внимание уделяется развитию неинвазивных методов оптической диагностики новообразований кожи, включающих спектральный анализ рассеянного назад излучения, автофлуоресцентного сигнала и комбинационного рассеяния. Однако, для повышения точности дифференцирования различных новообразований на ранней стадии необходимо использование мультимодальных подходов. В данном исследовании для диагностики одного из распространённых видов новообразований кожи – базальноклеточной карциномы – использовалась комбинация высокоразрешающего ультразвукового исследования (УЗИ) и оптических методов: комбинационного рассеяния, оптической когерентной томографии (ОКТ) и спектрометрии обратнорассеянного диффузного излучения. В исследовании принимали участие добровольцы с базальноклеточным раком и доброкачественными новообразованиями. Дифференцирование новообразований проводилось с помощью морфологического исследования. УЗИ проводилось с помощью сканера DUB SkinScanner (tpm taberna pro medicum GmbH, Германия) с датчиками с частотами 33 и 75 МГц, глубиной сканирования 5 и 3.2 мм и продольным разрешением 48 и 21 мкм, соответственно. Для получения спектров комбинационного рассеяния использовался спектрометр QE65000, оснащённый диодным лазером 785 нм (Ocean Optics, США) и зондом ($f = 7.5$ мм). Для ОКТ использовался томограф GAN930V2-BU (Thorlabs, США) с продольным и поперечным разрешением 6 и 7.32 мкм, соответственно. Спектры обратного рассеяния в диапазоне 400-2100 нм измерялись с помощью спектрометров USB4000-UV-VIS и NIRQUEST и волоконно-оптических зондов QR400-7-VIS-NIR (Ocean Optics, США). Получено, что рассеяние кожи в области новообразований значительно снижено по сравнению со здоровой кожей, наблюдалось повышенное содержание гемоглобина в оксигенированной форме. Для рака характерной особенностью являлось пониженное содержание липидов и кератина. В области доброкачественных новообразований наблюдалось повышенное содержание белков, нуклеиновых кислот, липидов и кератина. С помощью ОКТ и УЗИ удалось оценить размеры и внутреннюю структуру новообразований. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и ННФИ в рамках научного проекта № 20-52-56005.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИМИДЖИНГ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ. ОЦЕНКА ВЯЗКОСТИ ИХ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ

И.А. Глигонов^{1,2}, И.Д. Соловьев², Д.М. Шашин^{1,2}, М.О. Шлеева², А.С. Капрельянц², А.П. Савицкий²

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; ²ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

По данным ВОЗ носители трудноизлечимых латентных форм туберкулеза составляют порядка четверти населения земли. Персистенция обуславливается способностью микобактерий образовывать покоящиеся формы, характеризующиеся низкой активностью метаболизма и особенностями морфологии. Было выдвинуто предположение о том, что существенную роль в поддержании данного состояния играет уровень структуризации клеточной стенки. Для оценки вязкости оболочек клеток был использован метод флуоресцентного имиджинга с использованием BODIPY. В данной работе вязкость клеточной стенки исследовали методом деполяризации из возбужденного состояния, рассчитываемой из пикосекундных кинетик затухания флуоресценции для параллельной и перпендикулярной ориентации поляризатора. Стационарная анизотропия зависит от вязкости среды из чего можно сделать выводы о структурированности клеточной стенки. В качестве модели для исследования покоящихся форм *M. tuberculosis* были выбраны аналогичные формы *M. smegmatis*. Клетки были выращены на среде Сотона: активные при начальном pH 7, покоящиеся при начальном pH 6. Метка вводилась в клетки при помещении их в буферный раствор MES 50 mM pH 6,0 содержащий BODIPY FL C16 (Thermo Fisher Scientific). После введения образцы помещались на покровные стекла для получения изображений на конфокальной установке Microtime 200 (PicoQuant, Berlin). Источник поляризованного света – пикосекундный лазер серии LDH-D-C-485 (PicoQuant) с длиной волны излучения 485 нм. Детекторы: Perkin Elmer SPCM CD 3307 H и MPD PDM series. Объектив – UplanSApo 60x/1.20 W. Pinhole – 50 мкм. Фильтры – 500LP и BP509/22. Для расчета G-фактора, на покровное стекло были помещены 80 мкл раствора 1 мкМ BODIPY 493/503 в ДМСО, в котором наблюдалась полная деполяризация флуоресценции BODIPY. Из полученных данных были построены изображения клеток, в каждом пикселе которых отображается значение анизотропии. Для сравнения таких изображений использовались гистограммы распределения пикселей по анизотропии. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что структурированность мембран покоящихся клеток значительно отличается от активных. Работа поддержана грантом РФФИ №19-15-00324.

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ СЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО pH МЕТОДОМ FLIM

А.С. Горященко¹, А.А. Пахомов^{1,2}, А.В. Рябова³, И.Д. Романишкин³, Е.Г. Максимов⁴, А.Н. Орса¹, О.В. Серова¹, А.А. Можяев^{1,5}, М.А. Максимова^{1,2}, В.И. Мартынов¹, И.Е. Деев¹, А.Г. Петренко¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Институт элементоорганической химии им. А.Н. Несмеянова РАН; ³Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН; ⁴Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁵Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва

Поддержание кислотно-щелочного равновесия в определенных узких пределах необходимо для нормального функционирования живых организмов. В нашей лаборатории было показано, что ряд рецепторов, а именно IRR, ErbB2 и некоторые другие, могут быть активированы внеклеточной слабощелочной средой. При этом указанные рецепторы экспрессируются во многих органах и тканях, которые характеризуются нейтральным или кислым значениями pH. Следовательно, можно предположить, что в организме могут происходить локальные изменения pH, которые приводят к активации этих рецепторов, однако в настоящее время экспериментальные данные о таких изменениях отсутствуют. Детекцию этих изменений необходимо выполнять *in vivo* с разрешением, достаточным для визуализации отдельных участков органов и тканей. В случае мелких лабораторных животных использование электрохимических pH-сенсоров затруднено из-за небольших размеров животного и недостаточного пространственного разрешения таких сенсоров. Современные методы измерения pH, такие как ПЭТ и ЯМР-спектроскопия, обладают рядом недостатков, в числе которых – необходимость введения специальных радиоактивных меток, недостаточное пространственное разрешение или длительное время измерения. Наиболее подходящим методом с точки зрения времени измерения pH, разрешения, необходимого оборудования и простоты использования является флуоресцентный имиджинг. В связи с этим в нашей лаборатории впервые был создан генетически кодируемый флуоресцентный сенсор внеклеточного слабощелочного pH SynHerExtra. Этот сенсор представляет собой pH-чувствительный флуоресцентный белок SynHer3s с лидерным пептидом IgK, обеспечивающим выведение белка во внеклеточную среду, и мембранным доменом белка нейрексина-1, который "заякоривает" сенсор на внешней стороне клеточной мембраны. Мы показали, что SynHerExtra позволяет измерять pH по изменению времени жизни флуоресценции методом FLIM, что позволит повысить точность данных, получаемых при измерениях *in vivo*, по сравнению с радиометрическим методом детекции. Возможность определения значения pH *in vivo* с помощью сенсора SynHerExtra позволит в дальнейшем пролить свет на фундаментальный вопрос о роли локальных изменений pH в различных органах и тканях.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 20-04-00880 А, 18-04-01369 и 19-04-01042 А.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ pH И ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ H₂O₂ В ОЧАГЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

И.В. Кельмансон^{1,2,3}, А.Д. Иванова^{3,4}, Д.А. Котова^{1,3}, М.С. Почечуев⁴, А.А. Ланин^{4,6,7}, И.В. Федотов^{4,5,6,7}, А.Б. Федотов^{4,6,7}, А.М. Желтиков^{4,5,6,7}, В.В. Белоусов^{1,2,3,8,9}, Д.С. Билан^{1,2,3}

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ²Лаборатория экспериментальной онкологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ⁴МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁵Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station, Texas, США; ⁶Российский квантовый центр, Сколково, Москва; ⁷Казанский квантовый центр, Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, Казань; ⁸Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва; ⁹Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, Геттинген, Германия

Ишемический инсульт занимает одно из ведущих мест среди причин смерти и инвалидизации населения земного шара. Несмотря на огромное количество исследований, посвященных данному заболеванию, до сих пор довольно мало известно о биохимических процессах, происходящих в клетках мозга в течение первых минут развития патологического процесса. Мы разработали метод регистрации биохимических изменений в мозге анестезированных крыс с использованием генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров и специально сконструированной оптической системы, подключаемой к животному через размыкаемые оптоволоконные зонды. Такая система позволяет наблюдать за изменениями биохимических параметров в интересующих нас клетках или клеточных компартаментах как непосредственно в момент начала ишемии, так и в последующий период. В настоящей работе мы использовали генетически-кодируемый pH-сенсор SynHer3s и новый сверхчувствительный сенсор пероксида водорода Nureg7, направленные в цитозоль и митохондрии нейронов крыс линии SHR. Частицы AAV вирусом, несущих гены сенсоров под контролем Syn1 промотора, инъецировались билатерально в хвостатые ядра головного мозга животных, одновременно туда же вживлялись размыкаемые оптоволоконные зонды. Через 4 недели после операции крысы анестезировались, оптоволоконные зонды подключались к оптической системе регистрации, после чего животные подвергались окклюзии средней мозговой артерии. Таким образом мы записывали изменения внутриклеточного pH и концентрации H₂O₂ во время ишемии и следующей за ней реперфузии как в очаге инсульта, так и в контрольном контралатеральном полушарии. Мы зафиксировали резкое падение внутриклеточного pH в ишемизированных нейронах, которое начинается в первые секунды гипоксии. Реперфузия приводила к частичному или полному восстановлению уровня кислотности. Изменения уровня пероксида водорода в нейронах непосредственно во время ишемии/реперфузии оказались очень слабыми, концентрация H₂O₂ в ядре инсульта существенно повысилась лишь на следующий день. Этот результат требует уточнения общепринятой точки зрения о решающей роли активных форм кислорода на ранних этапах развития ишемического инсульта.

Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 17-15-01175.

АПРОБАЦИЯ НОВЫХ ФОСФОРЕСЦЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ С ИРИДИЕМ (III) В КАЧЕСТВЕ СЕНСОРОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

А.Д. Комарова^{1,2}, М.М. Лукина, Ю.П. Паршина³, Л.Н. Бочкарев³, В.И. Щеславский², И.С. Критченков⁴, С.П. Туник⁴,
М.В. Ширманова²

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; ²Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород; ³Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН, Нижний Новгород; ⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Оценка кислородного статуса в клетках и тканях имеет принципиальное значение для прогноза онкологических заболеваний и мониторинга лечения. Неинвазивным методом оценки содержания кислорода в клетках и тканях является фосфоресцентный имиджинг с временным разрешением (phosphorescence lifetime imaging, PLIM). Актуальной задачей является поиск новых фосфоресцентных сенсоров для определения содержания кислорода в биологических тканях методом PLIM. Целью работы было биологическое тестирование новых водорастворимых комплексов на основе Ir(III), в качестве фосфоресцентных сенсоров молекулярного кислорода. Исследованы новые комплексы на основе Ir(III): Ir-1, Ir-2 (СПБГУ) и P1, P3 (ИМХ РАН). Цитотоксичность оценивали методом МТТ-теста. *In vitro* исследования проводили на клеточной линии СТ26 (колоректальный рак мыши), *in vivo* – на опухолях мышей СТ26. Динамику накопления комплексов в опухолевых клетках *in vitro* и субклеточное распределение оценивали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM880 (Carl Zeiss, Германия). Оценка чувствительности комплексов к кислороду в условиях гипоксии и нормоксии осуществлялась методом PLIM на LSM880 *in vitro* и конфокальном макросканере *in vivo*. Методом МТТ-теста выявлены нетоксичные диапазоны концентраций исследуемых комплексов. Установлено, что комплексы P1 и P3 не проникают в клетки, Ir-1 и Ir-2 – проникают и накапливаются в цитоплазме. Методом PLIM *in vitro* было зафиксировано уменьшение времен жизни фосфоресценции Ir-1 и Ir-2 в условиях нормоксии по сравнению с гипоксией, что свидетельствует о чувствительности комплексов к O₂. В исследованиях *in vivo* установлено, что в опухолевых тканях с пониженным содержанием O₂ время жизни фосфоресценции комплексов P1 и P3 увеличивается по сравнению с временами жизни в нормальной ткани (мышцах). Таким образом, исследуемые комплексы Ir(III) перспективны для дальнейших применений в качестве фосфоресцентных сенсоров кислорода *in vitro* и *in vivo*. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 18-73-10021 (Ir-1, Ir-2) и РФФИ, проект № 20-03-00102 А (P1 и P3).

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ (ПСЕВДО)ГИПОГАЛОГЕННЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ ПОМОЩИ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО СЕНСОРА HUPOCRATES

А.И. Костюк^{1,2,3}, М.-А. Тосунян^{4,5,6}, А.С. Панова^{1,2,3}, А.Д. Сергеева^{1,7}, Х. Вани^{4,5,6}, И. Ван Мелле^{4,6}, Р.И. Раевский¹,
Д. Эзериня^{4,5,6}, М.С. Баранов^{1,8}, Й. Мессенс^{4,5,6}, В.В. Белоусов^{1,2,3,9,10}, Д.С. Билан^{1,2,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва; ²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ³Лаборатория экспериментальной онкологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁴VIB-VUB Center for Structural Biology, Брюссель, Бельгия; ⁵Brussels Center for Redox Biology, Брюссель, Бельгия; ⁶Structural Biology Brussels, Vrije Universiteit Brussel, Брюссель, Бельгия; ⁷Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁸НИЛ химии лекарственных субстанций, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁹Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва; ¹⁰Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, Геттинген, Германия

(Псевдо)гипогалогенные кислоты представляют собой малые неорганические соединения, которые способны ковалентно модифицировать широкий спектр биологических молекул, тем самым влияя на их функционирование. В организмах позвоночных данные вещества преимущественно синтезируются системами врожденного иммунитета для подавления роста различных бактериальных и эукариотических патогенов. Однако в последние годы был накоплен внушительный массив данных, убедительно свидетельствующих о роли обсуждаемых соединений в развитии неинфекционных заболеваний воспалительной природы. К сожалению, традиционные методы исследования гипогалогенного стресса не позволяют регистрировать динамику соответствующих аналитов в живых организмах в режиме реального времени на субклеточном уровне. В рамках настоящей работы мы создали первый в мире генетически кодируемый сенсор для детекции (псевдо)гипогалогенных кислот (Hupocrates), способный преодолеть данное ограничение. Инструмент был получен путем интеграции сrYFP в область подвижной петли гипохлорит-чувствующего транскрипционного репрессора NemR из *E. coli*. Hupocrates ратиометрически и обратимо реагирует с (псевдо)гипогалогенными кислотами и их производными в наномольном диапазоне с максимальной амплитудой ответа около 1,8 раза. Сенсор селективно взаимодействует с HOCl, HOBr, HOClCN и их производными, будучи инертным по отношению к широкой панели активных соединений за исключением NaONO. Константы скоростей реакций между инструментом и его аналитами принимают значения в окне 10⁴–10⁵ М⁻¹с⁻¹, благодаря чему Hupocrates является пригодным для исследований *in vivo*. Поскольку большинство сенсоров данного типа рН-чувствительны (для Hupocrates pK_a составляет 8,5), мы также создали инактивированную версию белка, которая может выступать в качестве контроля неспецифических колебаний сигнала. При помощи Hupocrates мы смогли визуализировать гипохлоритный стресс в клетках линии HeLa при экзогенной добавке NaOCl, а также в клетках *E. coli* во время их поглощения человеческими нейтрофилами, полученными из донорской крови. Наконец, была расшифрована пространственная структура белка, на основе которой мы предположили механизм функционирования инструмента, что открывает возможность для его дальнейшей оптимизации.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПАРАМЕТРОВ НЕЙРОНОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ–РЕОКСИГЕНАЦИИ

Д.А. Котова^{1,2}, А.Д. Иванова^{1,3}, И.В. Кельмансон^{1,2,4}, В.В. Белоусов^{1,2,4,5,6}, Д.С. Билан^{1,2,4}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ³Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁴Лаборатория экспериментальной онкологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁵Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва; ⁶Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, Геттинген, Германия

Ишемический инсульт головного мозга имеет сложную патофизиологию, затрагивающую различные системы организма. Исследования молекулярных процессов ишемического инсульта крайне важны для понимания механизмов патологии и подбора терапии лечения заболевания. Сосудистая окклюзия, возникающая при ишемическом инсульте, ограничивает доставку кислорода и метаболических субстратов к нейронам, что приводит к изменению метаболизма клеток. Считается, что ключевую роль в патогенезе играет окислительный стресс. Для исследования внутриклеточных молекулярных процессов применяются генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры, которые позволяют визуализировать биохимические процессы в живых системах в режиме реального времени, что делает их незаменимыми инструментами для решения многих задач в биологии и медицине. С помощью биосенсоров *SupHer3s* и *HyPer 7* мы регистрировали динамику изменения величины pH и концентрации пероксида водорода в цитоплазме и матриксе митохондрий культивируемых нейронов, выделенных из гиппокампов эмбрионов мыши, в условиях гипоксии-реоксигенации. Условия гипоксии создавали при помощи сконструированной нами камеры, которая позволяет точно контролировать уровень кислорода в клеточной среде с возможностью одновременного проведения флуоресцентной микроскопии исследуемого объекта. Мы обнаружили, что в условиях гипоксии нейрональной культуры значение pH цитоплазмы и митохондрий нейронов значительно снижается, при этом реоксигенация приводит к обратному восстановлению. Используя чувствительный к пероксиду водорода биосенсор *HyPer7*, мы зарегистрировали незначительное снижение флуоресцентного сигнала биосенсора при гипоксии и его восстановление к исходному значению при реоксигенации, как в матриксе митохондрий, так в цитоплазме клеток. Таким образом, согласно полученным данным, ацидоз в различных компартментах нейронов начинается с первых секунд начала развития гипоксии, в то время как выраженного окислительного стресса в этих клетках мы не зарегистрировали. *Исследование поддержано грантом РФФИ 17-15-01175.*

МИКРОФЛЮИДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И FLIM-ИМИДЖИНГ В ИССЛЕДОВАНИИ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Д.С. Кузнецова^{1,2}, С.А. Родимова^{1,2}, В.В. Елагин¹, М.М. Карабут¹, Н.В. Бобров^{1,3}, М.В. Зюзин⁴, В.Е. Загайнов^{1,3}, Е.В. Загайнова^{1,2}

¹Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород; ²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; ³Приволжский окружной медицинский центр ФМБА России, Нижний Новгород; ⁴Университет ИТМО, Санкт-Петербург

В настоящее время идет разработка методов экспресс-оценки структурно-функционального состояния ткани печени для планирования объема резекции с целью снижения риска развития синдрома недостаточного объема печени. Важными параметрами, которые могут отражать метаболическую и биосинтетическую активность клеток печени, является относительное содержание различных форм кофактора НАД(Ф)Н (свободная, связанная с белком и связанная фосфорилированная форма). Указанные параметры имеют значительные изменения уже на ранних стадиях развития острого повреждения, которые не являются стандартными методами оценки – морфологическим и биохимическим анализом. Метаболический FLIM-имиджинг позволяет детектировать данные изменения на основе регистрации флуоресценции метаболических внутриклеточных кофакторов. В представленной работе мы исследовали метаболизм гепатоцитов при токсическом повреждении методом флуоресцентной время-разрешенной микроскопии FLIM в микрофлюидном чипе. Микрофлюидные чипы обладают рядом преимуществ, таких как малый расход реагентов, низкая стоимость, высокий уровень контроля параметров системы (питательная среда, температура, pH, скорость потоков), стандартизация *in vitro* тестирования препаратов и т.д. С помощью современных методов аддитивных технологий можно получить чипы с заданной топологией, геометрией, а также оптимальной поверхностью. Микрофлюидные системы широко используются в исследованиях клеточного взаимодействия, ангиогенеза и инвазии, пролиферации и дифференцировки различных клеточных культур, а также тестировании различных препаратов и создании моделей токсического повреждения. Данные системы могли бы стать подходящим инструментом для моделирования токсического повреждения гепатоцитов. Мы предполагаем, что данная модель подойдет в качестве экспресс-модели для метаболического имиджинга ткани печени при развитии острого токсического повреждения. *Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента Российской Федерации МК-1649.2021 (метаболический имиджинг) и Государственного задания Минздрава РФ «Создание тест-системы для определения индивидуальной лекарственной чувствительности опухоли пациентов» (разработка микрофлюидного чипа).*

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО ХРОМОБЕЛКА В КАЧЕСТВЕ АКЦЕПТОРА ВО FRET ПАРЕ

Н.К. Марынич, А.П. Савицкий, М.Г. Хренова

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Явление флуоресцентного резонансного переноса энергии широко применяется в исследованиях биологических процессов. FRET сенсоры на основе GFP-подобных флуоресцентных белков генетически кодируемы и позволяют анализировать многие процессы внутри клетки, не прибегая к инвазивным вмешательствам. В настоящее время большая часть FRET пар состоит из флуоресцирующих как донора, так и акцептора флуоресценции. Однако применение таких пар имеет некоторые ограничения, связанные с перекрыванием спектров испускания донора и акцептора, направленным возбуждением акцептора, необходимостью детекции по двум длинам волн. Эти ограничения нивелируются при использовании в качестве акцептора

нефлуоресцирующие хромобелки. Хромобелки являются GFP-подобными белками, имеющими высокие значения коэффициентов молярного поглощения, но близкие к нулю значения квантового выхода флуоресценции. Для получения сенсора с высокой эффективностью переноса энергии главными условиями являются: 1) перекрытие спектров флуоресценции донора со спектром поглощения акцептора; 2) расстояние между флуорофорами во FRET-паре (R) поскольку эффективность FRET зависит от R^6 ; 3) взаимная ориентация дипольных моментов переходов донора и акцептора. В качестве донора выбрана красная форма фотоконвертируемого белка SAASoti, на роль акцептора отобраны 4 варианта хромобелков: Ultramarine, anm2CP, spisCP, gfasCP. Рассчитаны ферстеровские радиусы и интегралы перекрытия хромобелков и SAASoti и сравнены со значениями для имеющейся пары SAASoti-KFP. Полученные значения для новых хромобелков того же порядка, что и для имеющейся пары. Хромобелки экспрессированы в клетках *E. coli*, выделены и очищены. Определены их спектры поглощения, а также олигомерное состояние. Показано, что только Ultramarine является мономером, anmCP находится в димерном и частично тетрамерном олигомерном состоянии, spisCP и gfasCP являются димерами. Также проанализирована способность к разжиганию флуоресценции хромобелков в сравнении с KFP. При облучении светом длиной волны 530 нм высокой мощности у хромобелков не возникала флуоресценция в отличие от KFP. Анализ аминокислотного окружения хромофора, позволил выдвинуть предположение, что ключевое влияние на возникновение флуоресценции оказывают аминокислотные остатки в положениях 148 и 165.

IN VIVO ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РЕДОКС-ПРОЦЕССОВ ПРИ ГИПОКСИИ И ВОСПАЛЕНИИ НА МОДЕЛЬНОМ ОБЪЕКТЕ *Danio rerio* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ БИОСЕНСОРОВ

А.С. Панова^{1,2,3}, А.Д. Сергеева^{1,4}, М. Таувин^{5,6}, И.В. Кельмансон^{1,2,3}, А.Д. Иванова^{1,4}, С. Фриз^{5,7}, В.В. Белоусов^{1,2,3,8,9}, Д.С. Билан^{1,2,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ³Лаборатория экспериментальной онкологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁴Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁵Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, Париж, Франция; ⁶Sorbonne Université, Collège Doctoral, Париж, Франция; ⁷Université de Paris, Париж, Франция; ⁸Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва; ⁹Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, Гемтинген, Германия

В настоящее время рыба *Danio rerio* набирает популярность в качестве модельного организма для медико-биологических исследований, в том числе для исследования патологий человека. Одним из важных преимуществ *D. rerio* по сравнению с другими организмами является возможность использования различных методов микроскопии благодаря прозрачности тканей на ранних стадиях развития. В своей работе мы исследуем патологические процессы, такие как воспаление и гипоксия тканей, с помощью флуоресцентных генетически кодируемых биосенсоров. Данные биосенсоры позволяют регистрировать различные внутриклеточные метаболиты и параметры неинвазивно, сохраняя целостность тканей организма, что делает их безальтернативным подходом для исследования различных биологических процессов в живых целостных системах в режиме реального времени. В рамках данной работы были использованы генетически кодируемые индикаторы для регистрации пероксида водорода (HyPerRed), гипогалогеновых кислот (Hypocrates), соотношение НАД⁺/НАДН (SoNar) и pH (SypHer3s). В модели воспаления, вызванного ампутацией хвостового плавника, мы впервые применили разработанный в нашей лаборатории сенсор Hypocrates в условиях *in vivo* и осуществили мультипараметрический имаджинг с одновременной регистрацией продукции пероксида водорода и гипогалогеновых кислот в месте повреждения. Для исследования гипоксии в нашей лаборатории была собрана установка, позволяющая создавать условия гипоксии одновременно со съемкой на флуоресцентном микроскопе. С помощью этой установки была оценена динамика таких внутриклеточных параметров, как соотношение НАД⁺/НАДН и pH, в сердце трансгенных рыб *D. rerio* при гипоксии-реоксигенации. Также было проведено сравнение динамики данных показателей у мальков на разных стадиях развития. Исследование поддержано грантом РФФИ 21-34-70031 мол а_мос.

ИЗМЕРЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ IN VITRO С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА TagRFP И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Е.А. Протасова, Е.Г. Максимов

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Температура — важный физиологический параметр как целого организма, так и отдельной клетки — отражает активность метаболических процессов. Известно, что в раковых клетках активность митохондриальных ферментов больше, чем в нормальных, поэтому температура таких клеток выше. Оптимальный температурный сенсор для измерения *in cellulo* должен быть неинвазивен для клеток, в связи с чем перспективным вариантом является генетически-кодируемый сенсор на основе флуоресцентного белка. В данной работе мы изучили изменение параметров флуоресценции *in vitro* у красного флуоресцентного белка TagRFP и его производных — mKate2 и FusionRed — в температурном диапазоне от 5 до 60°C. Мы измеряли время жизни и интенсивность флуоресценции при возбуждении разными длинами волн, в частности возбуждали обычную, стоксовую, и антистоксовую флуоресценцию, при этом эмиссию регистрировали на одной длине волны. При увеличении температуры длительность основной (несколько наносекунд) компоненты кинетики затухания флуоресценции сокращается в обоих случаях одинаково. Тем не менее, в кинетике антистоксовой флуоресценции TagRFP появляется вторая, более короткая, компонента (характерное время жизни около 200 пс), и при увеличении температуры ее вклад растет до 50%. Таким образом, по вкладу этой быстрой компоненты в кинетику затухания флуоресценции белка TagRFP можно определять температуру в среде в условиях *in vitro*. Для этого были получены соответствующие калибровочные зависимости. В работе также представлены данные для других флуоресцентных белков и показаны значительные отличия калибровочных зависимостей друг от друга. Мы полагаем, что наблюдаемые различия в поведении белков связаны с особенностью устойчивых конформаций хромофоров,

а появление быстрой компоненты в кинетике затухания флуоресценции TagRFP и изменение ее вклада происходит из-за изомеризации хромофоров. Полученные данные показывают возможность изменения содержания различных спектральных форм белка в растворе с помощью облучения светом на границе спектра поглощения раствора флуоресцентных белков.

РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ СЕРЫ

Р.И. Раевский¹, А.Д. Сергеева^{1,2}, В.В. Белоусов^{1,3,4,5,6}, Д.С. Билан^{1,3,4}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁴Лаборатория экспериментальной онкологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁵Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва; ⁶Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, Геттинген, Германия

Активные формы серы (АФС): H₂S, персульфиды, полисульфиды, сульфеновые кислоты, нитрозотиолы являются регуляторами апоптоза и окислительного стресса, также для них показаны кардиопротекторное и вазодилатирующее действия. Существующие на сегодняшний день подходы не позволяют проводить мониторинг динамики АФС в живых интактных системах в режиме реального времени. В данной работе мы разрабатывали генетически кодируемый биосенсор на основе флуоресцентного белка cpYFP. В качестве сенсорных доменов для регистрации АФС мы выбрали белки SqrR из *R. capsulatus*, BigR из *X. fastidiosa*, CstR из *G. Thermodenitrificans*, которые взаимодействуют с АФС и претерпевают конформационные изменения. Мы предположили, что в химерной конструкции конформационные перестройки сенсорного домена приведут к изменению конформации флуоресцентного белка, что отразится на его флуоресцентных свойствах. В этих белках при помощи алгоритмов TopMatch и PDBflex были выбраны участки, которые на основе моделей трехмерных структур (PDB ID: 6O8L, 6O8N, 3PQJ, 3PQK, 4M1P) обладают выраженными конформационными перестройками при взаимодействии с аналитами. На уровне гена мы интегрировали последовательность флуоресцентного белка в структуры указанных сенсорных доменов, всего было получено 42 молекулярно-генетические конструкции. Для оценки функционирования рабочих версий создаваемых индикаторов мы проверяли наличие флуоресценции бактериальных клеток *E. coli* XL1-Blue, по отдельности экспрессирующих гены созданных вариантов, добавляя к ним раствор полисульфидов K₂S_x до конечной концентрации 100 μM. В результате была отобрана конструкция BigR-cpYFP, которая демонстрирует наиболее выраженное изменение флуоресцентного сигнала при добавке аналита K₂S_x. Сигнал изменяется радиометрически: в спектре возбуждения флуоресценции (λ_{em}=530 нм) флуоресценция в пике 400 нм снижается, в пике 494 нм повышается, что приводит к изменению сигнала в 2 раза (100%). Был получен очищенный препарат белка BigR-cpYFP, он демонстрировал радиометрический ответ в 360% на насыщающую добавку K₂S_x и не демонстрировал изменения флуоресцентного сигнала при добавлении распространенных в клетке окислителей: H₂O₂, HOCl, GSSG, NO.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВЫХ ЛИГАНДОВ К АПТАМЕРАМ MANGO ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РНК

Ю.И. Светлова, А.А. Хрулев, А.В. Аралов, А.М. Варижук
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Для визуализации РНК в клетке широко применяется присоединение к ней G-квадруплексной последовательности Mango I и обработка лигандом на основе тиазолового оранжевого (TO1). Краситель TO1 крайне слабо флуоресцирует в свободном состоянии, но в комплексе с Mango I интенсивность его флуоресценции возрастает на порядки. Пара TO1-Mango I не лишена недостатков, например, таких как малое значение стоксового сдвига или сравнительно небольшой квантовый выход (0,19), что делает её неудобным в использовании. Эти проблемы не удалось решить с помощью подбора новых РНК Mango II, III, IV. Поэтому было принято решение модифицировать лиганд для улучшения флуоресцентных характеристик комплекса. Целью нашей работы была характеристика новых лигандов в комплексе с аптамерами Mango I, II, III, IV. Для её осуществления были поставлены следующие задачи: характеристика флуоресценции и абсорбции комплексов лиганд-аптамер, а также оценка константы связывания для лиганда-лидера. Для оценки спектральных характеристик пары лиганд-Mango измеряли их флуоресценцию и адсорбцию в буфере (pH=7,4), а для оценки их квантового выхода использовали стандарт родамин 6G. Для измерения констант связывания использовали метод флуориметрии. В ходе исследования было показано, что новые лиганды демонстрируют увеличение квантового выхода в комплексе с Mango I (среднее значение 0,4). Также у части лигандов с Mango II и IV сохраняются высокие значения квантовых выходов, а в комплексе с Mango III все образцы демонстрируют низкие показатели этого параметра. Для большинства лигандов характерно небольшое значение стоксового сдвига. Единственным исключением стал образец AR498-B. Для этого лиганда были измерены величины констант связывания с различными аптамерами Mango. AR498-B имеет низкие значения первой константы связывания с Mango I и IV (порядка 50 нМ и 25 нМ соответственно), и чуть большее значение для комплекса с Mango II (порядка 150 нМ). К Mango III лиганд практически не демонстрирует сродства. Из приведенных выше данных можно сделать вывод, что новые лиганды в комплексе с Mango имеют улучшенные характеристики по сравнению с TO1. Особо стоит выделить лиганд AR498-B, который в дальнейшем может использоваться как более эффективный инструмент для визуализации РНК. Работа поддержана грантом РФФИ 20-34-70143.

РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БИОСЕНСОРА ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОСНОВЕ ФОТОАКТИВНОГО ОРАНЖЕВОГО КАРОТИНОИДНОГО БЕЛКА

Е.А. Слущкая

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Неоднородность метаболических реакций приводит к неравномерному распределению температуры в разных частях живой клетки. Создание внутриклеточного сенсора температуры является актуальной задачей из-за возможных перспектив использования такой системы для исследования метаболических процессов и нарушений, ведущих к развитию патологических состояний. Ранее нами было показано, что, детектируя фотоциклические изменения спектра поглощения каротиноида, который в составе оранжевого каротиноидного белка (ОСР) меняется в ответ на поглощение кванта света, ОСР можно использовать в качестве сенсора температуры. Нами были сконструированы химерные конструкции из ОСР и двух типов флуоресцентных белков – TagRFP и TagGFP, в которых за счет безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения квантовый выход флуоресцентных белков зависит от состояния ОСР и, соответственно, регистрация изменения интенсивности флуоресценции позволяет детектировать локальную температуру (Maksimov et al. 2019 Scientific Reports). Для оптимизации и апробации данного метода на клеточных моделях необходимо решить ряд задач: 1. наладить экспрессию генетически кодируемого сенсора в клетках, 2. отработать доставку кето-каротиноида в клетки. В ходе выполнения поставленных задач первым этапом работы стала оптимизация экспрессии белков RFP-ОСР и ОСР-GFP в эукариотической линии клеток НЕК293Т. Методами молекулярного клонирования была проведена интеграция генов RFP-ОСР и ОСР-GFP в лентивирусный вектор pLV2. На основе рекомбинантных векторов были получены лентивирусы для последующей трансдукции эукариотической линии клеток НЕК293Т и получения стабильных линий, кодирующих RFP ОСР и ОСР GFP. Для отсортированных клеточных линий НЕК293Т RFP ОСР и НЕК293Т ОСР GFP методом проточной цитофлуориметрии был оценен уровень экспрессии химерных белков в клетках по RFP и GFP и составлял 96% и 94% соответственно. За счет разработанного нами метода доставки каротиноидов в клетки (Maksimov et al. 2020 Antioxidants) далее планируется получить холоформы ОСР в клетках. В случае получения фотоактивных химер на базе ОСР в клетках, варьируя их клеточную локализацию, мы сможем оценить локальную температуру и её изменения по флуоресценции RFP ОСР и ОСР GFP.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №. 17-74-30019.

НОВАЯ ОРТОТОПИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА У МЫШЕЙ NUDE И ЕЁ КОМПЛЕКСНОЕ НАБЛЮДЕНИЕ МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Д.В. Южакова¹, Е.Б. Киселева¹, М.М. Лукина¹, В.В. Дуденкова¹, Г.М. Юсубалиева², А.А. Горчаков³, С.В. Кулемзин³, А.И. Гаврина¹, В.П. Баклаушев², М.В. Ширманова¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород; ²Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва; ³Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

Глиобластома является наиболее распространенной опухолью головного мозга у взрослых людей с крайне неблагоприятным прогнозом – менее 5% выживаемости за 5 лет. Разработка новых эффективных методов лечения требует создания модельных опухолей, наиболее приближенных по своим свойствам к глиобластомам пациентов. Целью работы является разработка новой ортотопической модели глиобластомы на основе опухолевого материала пациента, у мышей nude и исследование её методами оптической визуализации. Первичную клеточную культуру глиобластомы получали путем ферментативной дезагрегации постоперационных образцов ткани мультиформной глиобластомы Grade IV, мечение m-Kate2 и люциферазой проводили путем лентивирусной трансдукции. Инъекцию клеток глиобластомы в мозг мышей nude проводили на стереотаксической установке. Детекцию опухоли и неинвазивный мониторинг её роста проводили с помощью биоломинесцентной и флуоресцентной визуализации *in vivo* на установке IVIS-Spectrum (Caliper Life Sciences, США). Исследование метаболического статуса иссеченного мозга с опухолью проводили *ex vivo* с помощью время-разрешенного имиджинга на конфокальном FLIM-макросканере (Becker&Hickl, Германия). Структуру опухоли и перитуморальных тканей изучали *ex vivo* с помощью системы мультимодальной оптической когерентной томографии (ОКТ). Также был проведен гистологический анализ тканей мозга с опухолью. Мы продемонстрировали 100% прививаемость новой модельной глиобластомы через 10 дней после инокуляции опухолевых клеток в мозг мышам. Показана возможность обнаружения опухоли *in vivo* и неинвазивной оценки скорости роста путем измерения флуоресцентного сигнала m-Kate2, а также детектируя биоломинесцентный сигнал. Показана возможность одновременной визуализации флуоресценции m-Kate2 в красном канале и эндогенной флуоресценции в спектральном канале НАДН в извлеченной опухоли, что позволило точно детектировать опухоль в мозге и оценить ее метаболизм. На ОКТ изображениях глиобластома хорошо дифференцировалась от окружающего белого вещества. Таким образом, мы разработали новую ортотопическую модель глиобластомы человека на основе первичной культуры у мышей nude и продемонстрировали простые и эффективные способы ее изучения.

Работа поддержана грантами РФФИ №18-29-01022 (создание модели и FLIM) и №18-29-01049 (ОКТ).

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абакумов М.А. 287
Абакумова Т. 26
Абакумова Т.О. 229
Абаленихина Ю.В. 72
Абдрахманов А.А. 58
Абдулхаков С.Р. 175
Абзианидзе В.В. 61
Абрамов А.Ю. 232
Абрамова З.И. 250, 251
Абрамова Т.Н. 29
Абрамчик Ю.А. 92, 130
Абрикосова В.А. 61
Абросимова Л.А. 259
Авданина Д.А. 256
Авдеев Д.В. 134, 137
Авдошина Д. 208
Аверина О.А. 15, 154
Аверьянова А.Д. 207
Агапкина Ю.Ю. 204
Агапов А.А. 9, 18, 38, 121
Агапова Ю.К. 62
Агафонова М.Н. 253
Агельдинов Р.А. 48
Агустинос Б. 247
Ажаев А.В. 257
Ажикина Т.Л. 13, 23, 33, 38
Азимов Э.А. 241
Азьмуко А.А. 134
Айдагулова С.В. 274
Акатов В.С. 194
Акберова Н.И. 116
Акита Ф. 196
Аксенов Н.В. 277, 279, 282
Аксёнов Н.Д. 265
Аксинина Т.Е. 226
Алвазел С. 202
Александрова Л.А. 256
Александровская Н.А. 237
Алексеев А.А. 75
Алексеева И.В. 126
Алексеева Л.А. 29
Аленина Н. 247
Алехин А.И. 93
Алехина О.М. 184
Алешенко Н.Л. 93
Алешин Г.Ю. 277, 279
Аливердиева Д.А. 142
Алиев Т.К. 81, 95, 139, 179
Алиева А.Х. 222, 249
Алкалаева Е.З. 15, 16, 31, 93, 96
Аллахвердиев С.И. 181, 192, 196, 200, 202
Аллахвердиев Э.С. 202
Алрхмун С. 254
Алтухов Д.А. 62
Алферова В.А. 45, 48, 51, 136
Алхусейн-Кулягинова М.С. 254
Амирлоо Б. 27, 32, 42

Анапина А.Б. 142
Ангелова П. 232
Андреев Я.А. 43, 46, 107
Андреева Л.А. 136
Андреева Т.В. 45, 46
Андреева Ю. 49
Андрианова А.Г. 118, 124
Андрианова И.А. 261
Анисенко А.Н. 204, 211
Анисимова К.А. 238
Анохин К.В. 3
Антипова М.В. 267
Антипова Т.А. 70
Антоненко Ю.Н. 64
Антонова К.А. 247
Антропов Д.Н. 210
Антсон А.А. 207
Ануфриев К.Э. 191
Ануфриева К.С. 27, 87, 141, 144, 167, 168, 172, 225, 226
Апарин И.О. 290
Апель П.А. 72
Аравин А.А. 9, 18, 36
Аракелян Л.А. 129
Аралов А.В. 20, 216, 298
Арапиди Г.П. 15, 87, 141, 144, 162, 167, 168, 170, 172, 175, 177
Арбатский М.С. 237
Аргентова В.В. 95, 139, 179
Аргентова-Стивенс А.М. 179
Арзуманян В.А. 164, 169
Арифалин Е.А. 12
Арсеньев А. 78
Арсеньев А.С. 102, 105, 109, 114
Артыков А.А. 91, 123
Арутюнян А.М. 71, 99
Архипенко М.В. 89, 98
Арчаков А.И. 150, 163, 171, 184
Асеев Л.В. 23
Астахова Т.М. 59
Асякина А.С. 275
Атауллаханов Р.И. 274
Атауллаханов Ф. 5
Аттеева Д.И. 157
Афанасьева З.А. 250, 251
Афонин Д.А. 23
Афошин А.С. 152, 166
Ахметов И.И. 147
Ахметова Е.А. 29
Ачкасова К.А. 283
Ашапкин В.В. 56

Б

Бабаев П.А. 58
Бабаева Г. 141
Бабаева М.Н. 128

Бабайлова Е.С. 57, 61
Бабаян К.А. 170
Бабенко В.А. 60, 218
Бабич В.О. 218
Бабурина Ю.Л. 272
Багрянцев М.В. 291
Бадун Г.А. 71
Байкова И.П. 251
Баймуханова Ж.Ж. 87, 172
Байрамуков В. 228
Байчурин И.А. 30
Бакланова А.С. 47
Баклаушев В.П. 299
Бакунова А.К. 121
Балабашинов Д.С. 61, 95, 139
Балаев А.Н. 138
Балакирева Е.И. 156
Балалаева И.В. 104
Баландин С.В. 133
Баландов С.Г. 238
Балашова Е.Е. 153, 159
Балкин А.С. 231
Барадиева Э.Ц. 219
Барай В. 257
Баранов М.С. 290, 295
Баранова А.А. 48, 51
Баранова Е.И. 264
Баранова М.Н. 47, 61
Баранова С.В. 242
Барбитов Ю.А. 148, 185
Бардина М.В. 215, 260
Баринов Н.А. 25
Бармин В.В. 117
Баргын Е.А. 244
Бархатов В.И. 125
Баршевская Л.В. 186
Барышникова М.А. 68
Басалова Н.А. 237
Басманов Д.В. 146, 179, 235, 260
Батайли К.П. 113
Батоцыренова Е.Г. 135
Байд М. 85
Баулина Н.М. 30, 173, 174
Бахолдина С.И. 185
Бахтиярова К.З. 221
Бахтыков А.А. 217
Бачева А.В. 124
Башкатов А.Н. 293
Башкиров П.В. 53, 179, 184
Баюрова Е. 208
Баюрова Е.О. 234
Бедерина Е.Л. 283, 291
Безпрозванный И.Б. 266
Безсуднова Е.Ю. 115, 119, 121
Беккер В. 289
Белеля А.С. 94
Белецкий А.В. 183
Белова О.А. 207, 211, 213
Белова У.Д. 204
Беловежец Т.Н. 256

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

Белоглазова И.Б. 239
Белогуров А.А. 55, 68, 69, 110
Белозерский М.А. 124
Белоусов В.В. 266, 290, 294–298
Белоусов М.В. 185
Белоусова Е.А. 132
Беляева О.Д. 264
Бердышев И.М. 52, 73, 85
Березина О.В. 48
Берекетеаб Г. 247
Берестовская Ю.Ю. 183
Беркович О.А. 264
Берман Д.И. 149
Бершацкий Я.В. 102, 114
Беспятова Л.А. 211
Беспярых Ю.А. 146, 179, 260
Бибилашвили Р.Ш. 137
Биджиева Ф.А. 129
Бизяев Н.С. 15, 16, 31
Бизяев С.Н. 21, 28
Бикеева В.Н. 260
Бикмуллин А.Г. 108
Билан Д.С. 290, 294–298
Билова Т.Е. 146, 159, 167
Бирюков М. 278
Бирюков М.В. 48
Биченкова Е.В. 27, 32, 42
Бишани А. 230
Блохин Д.С. 108
Бобик Т.В. 61, 70, 93, 94
Бобров М.Ю. 252
Бобров Н.В. 296
Богданов А.А. 16, 276
Богданов А.А. (мл.) 288
Богданов М. 51
Богданов М.В. 82, 116, 142
Богданова Л.Р. 188
Богинская И.А. 114
Богомазова А.Н. 7, 177
Богомольная Л.М. 85
Богомякова М.Е. 170
Богомякова М.Е. 175
Божиков Г.А. 279, 282
Божок Г.А. 59
Бозиева А.М. 200
Бозин Т.Н. 92
Бозоров С.С. 95
Бойко А.Н. 174
Бойко К.М. 7, 98, 102, 114, 117, 119, 121, 122
Бойченко В.С. 141
Боков Р.О. 14
Болдырева Д.И. 218
Болдырева М.А. 239
Болдырева Ю.В. 62
Болихова А.К. 15, 31
Болосов И.А. 133
Болотова С.Б. 69
Бондарев С.А. 68, 185, 237
Бондаренко Ф.В. 186
Бондарь О.В. 254
Бончук А.Н. 7, 102
Борисов Н.М. 18
Борисова Г.Г. 198, 198, 200, 201

Борисова М.А. 221, 248
Бородко Д.Д. 41
Борщевский В. 78
Борщевский В.И. 112
Бочаров Е.Д. 62
Бочаров Э.В. 92, 102, 103, 114
Бочарова О.В. 102, 114
Бочкарев Л.Н. 295
Бочкова Ж.В. 99
Браже Н.А. 99
Бражников Е.В. 108, 113
Брезгин С.А. 14
Брезгин С.А. 205
Брезгин С.А. 217, 232, 234, 255
Бржозовский А.Г. 117, 151, 152
Брикунова О.Я. 227
Британова О.В. 250
Бритиков В.В. 102, 180
Бритикова Е.В. 102
Бровин Д.Л. 264
Броджини М. 263
Бродолин К.Л. 127
Бродская А.В. 210
Бруман С.М. 73
Брылёв В.А. 134, 139, 142
Брюшкова Е.А. 222, 227
Бубис Ю.А. 150, 153, 158
Бубнов Д.М. 186
Бугмырин С.В. 211
Бугрова А.Е. 113, 117, 152, 157, 177
Будкина К.С. 12, 32
Буздин А.А. 18
Бузинов Р.М. 208, 233, 235
Букато О.Н. 162
Букач О.В. 243
Булатов Э.Р. 51, 85
Булатова Е.С. 253
Булатова Л.Ф. 80, 82, 142
Булко Т.В. 184
Бульгин К.Н. 57, 61
Бульгина Е.А. 30, 176
Бунева В.Н. 75, 123
Бунеева О.А. 72, 246
Бунеева О.А.
Бураков А.В. 16
Буракова Е.А. 21, 28
Бурейко К.М. 146
Буренина О.Ю. 22, 42
Буренков Г.П. 12
Буркатовский Д.С. 232
Бурундукова О.Л. 202
Буруско К.К. 27
Бурханова Г.Ф. 199
Бурцева А.В. 250
Бурцева А.Д. 114
Буслаева Н.Н. 44, 49, 244
Бут С.Ю. 183
Бутенко И. 15
Бутенко И.О. 162, 184
Бызова Н.А. 186
Быков Д.А. 16
Быков И.М. 182, 241, 245, 249, 275
Быков И.М. (мл.) 239
Быкова Н.А. 69, 244

Быченко О.С. 13, 23
Бычков М.Л. 60, 86, 90
Бэйфилд О.В. 207

В

Вавилов Н.Э. 150
Вакуленко Ю.А. 206
Валентович Л.Н. 208
Валидов Ш.З. 17
Валиева Л.В. 41
Валиева М.Е. 8, 33
Валиуллина А.Х. 51
Валуева А.А. 163, 171
Ван Мелле И. 290, 295
Ванг И. 109
Ванг С. 109
Ванг Х. 78, 290, 295
Вантеева А.В. 183
Ванюшин Б.Ф. 56
Вараева Ю.Р. 154
Варижук А.М. 7, 20, 53, 216, 235, 298
Варламов М.Е. 145
Варфоломеева Е.Ю. 275
Варфоломеева Л.А. 122
Варьян И.А. 180
Васецкий Е. 9, 12, 215, 271
Василевский А.А. 43, 46, 50
Василевский Д.И. 238
Василенко Л.М. 112
Васильев В.А. 21
Васильева А.Д. 113, 114
Васильева А.Р. 246, 266
Васильева Е. 5
Васильева Л.Г. 111, 196
Васильева М.И. 32
Васильева Н.В. 152, 166
Васильева С.Г. 215
Васильева Ю.А. 101
Василькова Д. 15
Васин А.В. 210, 229
Васина И.В. 92
Вахитова Ю.В. 221
Вахрамеев Д. 78
Вахрушев И.В. 164
Вацадзе С.З. 282
Вашкевич И.И. 55
Вашурина Н. 230
Ведехина Т.С. 7, 20, 235
Величко А.К. 7, 11, 74, 82
Веляев О.А. 215
Веньяминова А.Г. 22, 34, 59, 81
Вепхвдзе Т.Ф. 14
Верховский Р.А. 285
Верютин Д.А. 136
Веселова В.Р. 104
Веселова И.А. 39
Веселовский А.В. 72
Веселовский В.А. 218
Вессейоханн Л.А. 146, 159, 247
Ветошев К.Р. 229

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

- Ветошева П.И. 229
Виговский М.А. 237
Вилсон Д. 16
Виноградов Д.И. 27
Виноградова О.Л. 14
Вихнина М.В. 167
Вишневская М.В. 190
Вишняков И.Е. 74, 82
Владимиров Г.Н. 292
Владимирова Е.В. 133
Владимирова С.А. 269, 272
Власенкова Р.А. 169
Власов В.В. 20, 22, 27, 32, 34, 37, 42, 59, 230
Власов И.Н. 219
Власов П.К. 93
Войнова Е.С. 237
Войтова А.А. 225
Волков Д.В. 269, 271
Волкова Т.Д. 232
Волницкий А. 228
Волок В.П. 235
Волох О.И. 8
Волошан О.А. 261
Волошин Р.А. 181
Вольнский П.Е. 102, 103, 107, 111
Вольпина О.М. 232
Воля В.Г. 14, 205, 217, 232, 234, 255
Вонский М. 208
Воробьева Н.Е. 13
Воронежская Е.Е. 273
Воронина А.К. 170
Воронина О.Л. 43
Воронцов Д.А. 284
Воропаева О.В. 198, 201
Восколович М. 15
Вржещ П.В. 125
Вронская А.А. 143
Выборная Т.В. 186
Высочинская В.В. 210
Вьюнова Т.В. 136
Вьюшков В.С. 32, 36
- Г
- Габалов К.П. 205
Габашвили А.Н. 287
Габдулхаков А.Г. 111, 117, 196
Габиров А.Г. 61, 66, 69, 70, 93, 94, 106, 110, 269, 271
Гавриков А.С. 7
Гаврилов А.А. 7, 9
Гаврилов И.В. 63, 236
Гаврина А.И. 299
Гавшина А.В. 289
Газизова Г.Р. 14, 156, 268, 268
Гайворонский Ф.А. 117
Гайнетдинов Р.Р. 247
Галеева Ю.С. 218
Галзитская О.В. 88, 175
Галиуллин Р.А. 163
Галицкая А.А. 168
Галицына А.А. 9
Галкин И.И. 241
Галкин С.О. 211
Галкина К.В. 78, 96, 244, 268
Галямина М.А. 63, 164
Галютдинов И.В. 251
Гамбарян С.П. 220
Ганжула Е.П. 134, 142
Гапонова С.К. 32, 42
Гаптулбарова К.А. 275
Гараев А.К. 7
Гараева Л. 228
Гараева Л.А. 275
Гаража А.В. 18
Гаранина И.А. 178
Гаранина О.Е. 291
Гарафутдинов Р.Р. 64
Гарбуков Е.Ю. 275
Гарипов К.А. 250
Гаспарян А.А. 23
Гаспарян М.Э. 91, 140
Гафиуллина А.Д. 251
Гегечкори В.И. 234, 255
Генерозов Э.В. 147, 177
Генина Э.А. 293
Георгиев П.Г. 7, 102
Георгиева С.Г. 12, 41
Герасименко Ю.П. 4
Герасимов Е.С. 23
Герасимова Н.С. 8, 33
Герасимова Т.В. 191
Гераськина О.В. 106
Гиголаев А.М. 43
Гилева А.М. 140
Гилеп А.А. 123, 147, 161, 184
Гильмиярова Ф.Н. 121
Гильмутдинов Р.А. 17
Глаголева Е.С. 256
Гладких Д.В. 22, 34, 230
Гладких И.Н. 56
Гладкова Н.Д. 283, 284
Гладышева М.Ю. 248
Глазырина М.А. 200
Глигонов И.А. 293
Глухова А.А. 14
Глухова К.А. 104
Глушкевич А.И. 151, 159
Глякина А.В. 88, 175
Гмьль А.П. 211
Гнеденко О.В. 123, 147
Гнучих Е.Ю. 129
Говорун В.М. 15, 87, 162, 167, 170, 172, 175, 178, 184, 235
Гоголев Ю.В. 231
Гоголева Н.Е. 231
Голиков М.В. 208
Голов А.К. 7
Головин А.В. 12, 110, 131, 132
Голофеева Д.М. 74, 82
Голуб Н.О. 57, 74
Гончаров А.О. 152, 154, 170, 174
Гончарук А.С. 109
Гончарук М. 78
Гончарук М.В. 105
Гончарук С. 78
Гончарук С.А. 105
Гопаненко А.В. 57, 61
Гоптарь И.А. 205
Горбатенко В.О. 243
Горбач Д.П. 64, 159, 167
Горбачева И.В. 217
Гордеева В.Д. 170
Гордейчук И. 208
Гордейчук И.В. 234
Гордон Р.Д. 113
Городничев Р.Б. 206
Городничева Т. 208
Гороховец Н.В. 131, 132
Горчаков А.А. 256, 299
Горшков В. 150
Горшков В.А. 158
Горшков Д.А. 261
Горшков М.В. 147, 150, 153, 154, 158, 173
Горшков О.В. 154
Горшкова Т.А. 154, 196, 289
Горященко А.С. 294
Готманова Н.Н. 124
Готовцев П.М. 190
Готтих М.Б. 204, 211, 214
Гошина А.Д. 206
Грабовенко Ф.И. 259
Грабовец И.П. 123
Грайфер Д.М. 81
Грановский Д.Л. 100
Грановский И.Э. 88, 292
Грачев В.А. 183
Грашина М.М. 264
Грехнёва Е.В. 137, 138
Гречишников Е.Г. 189
Гривенникова В.Г. 64
Григоренко Д.Л. 59
Григоров А.С. 13, 23, 33, 38
Григорьева А. 49
Григорьева И.В. 176
Григорьева О.Н. 237
Григорьева О.О. 15
Григорьева Т.В. 27, 30, 162, 175, 176
Григорьева Э.В. 273, 274
Гришин А.В. 92
Гришин С.Ю. 88, 175
Гришина Т.В. 47
Грищук Е. 5
Гроздова И.Д. 255
Громова Е.С. 19, 36
Громова Н.В. 260
Громько А.В. 138
Груздев Д.С. 181
Груздев Е.В. 183
Грушевская Ю.В. 245
Губаз С.Г. 244
Губайдуллин А.Т. 188
Губарькова Е.В. 284
Губкин А. 5
Губский Л.В. 41
Гугин П.П. 278
Гудашева Т.А. 70, 79, 80

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

Гужова И.В. 55, 82, 251, 265, 269, 272
Гуревич К.Г. 182, 275
Гурьева М.В. 269
Гусач А.Ю. 112
Гусев Д.В. 68
Гусев О.А. 14, 156, 268
Гусякова О.А. 121

Д

Давлетгильдеева А.Т. 130
Давлетгильдеева Д.А. 10
Далимова Д.А. 91, 95
Даль А.И. 192
Данилов Д.В. 195
Данилова О.В. 183
Данильчук Д.И. 290
Данько К.В. 159
Девяткин А.А. 206
Девяткин В.А. 247
Дедыш С.Н. 183
Деев И.Е. 294
Деев С.М. 271, 287
Демидчик В.В. 64
Демидюк И.В. 52, 66, 73, 83, 85, 92
Демин А.М. 227
Демьяненко С.В. 246
Денисова А.Е. 41
Денисова Я.Е. 241, 249
Дербенева А.С. 247
Дербииков Д.Д. 187
Дергилев К.В. 239
Дергоусова Н.И. 119
Дергунова Л.В. 41
Деревенцова А.В. 211
Держалова А.Ш. 21, 28
Деркач К.В. 217
Деркач С.Р. 188
Дерюшева Е.И. 88, 110
Дерябин Д.Г. 61
Десфоржес Б. 83
Джаппи Д. 266
Джермини Д. 215
Джоши В. 83
Дзантиев Б.Б. 181, 186, 190, 191
Дзряян В.А. 220
Дмитриев С.Е. 16, 208
Дмитриева А.А. 239
Дмитриева Е.М. 156, 157, 166
Доброхотов Н.А. 50
Довгань В.В. 11
Довыденко И.С. 40
Додохова М.А. 254
Долгих А.В. 231
Долгих Д.А. 91, 95, 98, 99, 179
Долгова А.С. 208
Доме А.С. 34, 40
Донцова О.А. 15, 16, 22, 31, 37, 42, 76, 86
Дорн М. 146
Доронина К.С. 249

Доронина О.Б. 249
Дорофеев А.Г. 183
Драчева К.В. 238, 264
Дризе Н.И. 172
Дроздова П.Б. 185
Дубилей С. 49
Дубровский Ю. 230
Дуденкова В.В. 291, 299
Дудкина У.С. 134, 137
Дунаевский Я.Е. 124
Дуржинская М.Х. 142
Дутышева Е.А. 55, 251, 265
Дыкман Л.А. 168
Дыкман Л.А. 205
Дьяков О.В. 244
Дюгай И.А. 223
Дюйзен И.В. 58

Е

Евдокимов А.Н. 40
Евменов К.С. 15, 16, 96
Евсеев П.В. 194
Евстратова Я.В. 270, 272
Евсютина Д.В. 164, 167, 178
Евтушенко Е.А. 89, 96, 98, 99, 100
Евтюгина Н.Г. 261, 264
Егоров А.М. 59, 66, 105, 137
Егоров А.Ю. 229
Егоров Е.С. 238
Егорова Б.В. 279, 281, 282
Егорова Т.В. 15, 16, 31, 93, 215, 260
Ежов А.А. 255
Езериня Д. 290
Елагин В.В. 283, 291, 296
Елецкая Б.З. 195, 257
Елисеев И.Е. 133, 143
Елисеева И.А. 12, 32
Елпаева Е.А. 210
Емельянов А.К. 237
Епимахова Е.В. 246
Еремеев А.В. 172
Ермаков Е.А. 75, 123
Ермаков М.С. 24
Ермакова С.П. 125, 128
Ерохина П.Д. 72
Ерохина Т.Н. 65
Ершов Н.И. 11
Ершов П.В. 123, 147, 161
Ершова М.О. 163, 171
Ершова Н.М. 17, 52, 54, 72
Ерюкова Ю.Э. 268
Есауленко Е.Е. 239
Есимбекова Е.Н. 187
Есипов Р.С. 92, 130, 189
Есюнина Д.М. 9, 18, 36, 38, 67, 78, 120, 121
Ефетов К.А. 23, 224, 238, 258
Ефименко А.Ю. 237
Ефимов А.В. 88, 102, 108, 110
Ефимов Б.А. 170

Ефимов С.В. 105
Ефимова А.А. 255
Ефимова Л.В. 227
Ефимова О.И. 292
Ефимова С.С. 53, 58, 135, 145, 214, 231
Ефременкова О.В. 256
Ефремов А.А. 125
Ефремов Р.Г. 43, 67, 102, 103, 107, 111, 144
Ефремова М.В. 287
Ещенко Н.В. 75

Ж

Жанг Б. 109
Жарков Д.О. 89
Жаркова М.С. 133
Жармухамедов С.К. 200, 202
Жарова Т.В. 64, 65
Жгун А.А. 256
Жданова П.В. 89, 97, 106, 120
Желанкин А.В. 147
Желтиков А.М. 290, 294
Жемчугов А.С. 282
Жеравин А.А. 273
Жердев А.В. 181, 186, 190, 191
Жердева В.В. 288
Жермини Д. 9, 271
Жигис Л.С. 119
Жилин Д.А. 32
Жуйков Б.Л. 277
Жуков В.А. 146, 167
Жукова М.В. 17
Журавлев Е.С. 27, 34, 37, 40, 75, 210
Журавлева Г.А. 68, 100, 148, 185, 187, 187, 237
Журавлева Е.А. 181
Журавлева М.Н. 51

З

Завгородняя А.Г. 244
Завильгельский Г.Б. 129
Заводовская В.Д. 281
Завриев С.К. 65
Завьялова С.А. 115
Загайнов В.Е. 227, 296
Загайнова Е.В. 225, 283, 284, 285, 291, 296
Задесенец К.С. 11
Заднепровская Е.В. 192
Заиграев М.М. 103, 115
Заикина Е.А. 199
Зайцев В.В. 189
Зайцев В.Ю. 284
Зайцев П.А. 105
Зайцева Н.А. 187, 189
Закалокина В.Ю. 48

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

Закатаева Н.П. 128
Закирова Л.М. 251
Закирова Н.Ф. 208
Закиян С.М. 162
Закревский Д.Э. 278
Залевский А.О. 12, 119, 131
Замарасев А.В. 58
Замятнин А.А. 234
Замятнин А.А. (мл.) 84, 131, 132, 224
Занина А.А. 15
Затейщиков Д. 5
Затейщиков Д.А. 173
Захарова М.Ю. 66
Захарова А.А. 53, 135
Захарова М.В. 39
Захарова М.Н. 69
Захарова М.Ю. 116
Захарова Н.В. 117, 152, 177
Захарчев А.А. 232
Зацепин С.С. 131
Зацепин Т. 26
Зацепин Т.С. 22, 24, 28, 29, 39, 42, 216, 229, 259
Заяц Е.А. 92, 130
Зверева Е.А. 191
Зверева М.Э. 19, 39, 259
Звягина А.И. 192, 194
Згода В.Г. 76, 150, 154–157
Зеленихин П.В. 188
Зеленцова Е.А. 149, 160–162
Зелепуга Е.А. 43
Земляно О.М. 100
Земскова М.Ю. 88
Зенин В.А. 91, 97
Зенкова М.А. 20, 22, 27–29, 32, 34, 42, 59, 218, 219, 230, 233, 271, 273
Зерний Е.Ю. 131, 132
Зивана А. 82
Зиганшин Р.Х. 45, 46, 79, 118
Зиганшина С.А. 188
Зилсева З.Р. 251
Зильберман А.И. 55
Зименков Д.В. 259
Зиновкин Р.А. 238
Зиновкина Л.А. 238
Зинц А. 159
Зинченко А.А. 119, 128
Зинченко Н.Д. 24
Змиевская Е.А. 51
Знобищева Е.А. 75
Золотавина М.Л. 275
Золотовская М.А. 18
Зорин М.В. 265
Зорина Е. 228
Зорина А.А. 197
Зорина Е.С. 149
Зорколыцев М.А. 281
Зражаева Д.С. 88
Зубарев Р.А. 147
Зубарева В.М. 76, 78, 96
Зубенко А.Д. 277, 279
Зубко А.В. 180
Зубкова Е.С. 165, 239
Зубкова О.А. 177

Зубов А.И. 63
Зуев Ю.Ф. 77, 188
Зуева А.О. 125, 128
Зуева О.С. 188
Зуридакис М. 44
Зюзин М.В. 296

И

Ибитое О.И. 37
Ибрагимова А.Р. 236
Ибрагимова М.К. 270, 275
Ибрагимова Ш.Н. 95
Иванникова А.Я. 211
Иванов А.В. 190, 191, 208
Иванов А.Д. 202
Иванов А.С. 123, 147, 149, 161
Иванов В.Т. 57, 79, 159, 162
Иванов И.А. 44
Иванов М.В. 150, 154
Иванов П.А. 16, 98, 100
Иванов П.В. 16
Иванов С.М. 234
Иванов Ю.Д. 150, 163, 171
Иванова А.А. 239
Иванова А.Д. 290, 294, 296, 297
Иванова В.А. 21
Иванова Е.А. 246
Иванова М.В. 69
Иванова О.М. 87, 144, 162, 167, 170, 172
Иванова О.Н. 208
Иванова С.А. 156, 157, 248, 266
Иванова Т.С. 200
Ивашина Т.В. 289
Ивашкевич Д.Н. 58
Ивлев В.А. 154
Ивченков Д.В. 53
Игнатова А.А. 106
Игнатова Н.И. 285
Иешко Е.П. 211
Иззи А.Р. 15, 76
Изосимова А.В. 225, 229
Илинг К. 159
Иллариошкин С.Н. 249
Ильгисонис Е.В. 150, 155, 156, 164
Ильина А.А. 233
Ильина А.Р. 76
Ильина Е.Н. 162, 206, 218
Ильина И.Ю. 152, 154
Ильинская О.Н. 188
Ильичева Е.Ю. 263
Индейкина М.И. 113, 117, 152, 177
Исаакова Е.А. 7
Исагулянц М. 208
Исайкина Т.Ю. 262
Исакова-Сивак И.Н. 206
Ишина И.А. 116
Ишмухаметов А.А. 137, 235
Ищенко А.А. 130

К

Кабасва А.Р. 30, 174
Кабиров М.Р. 57, 61, 69
Казаков А.С. 110
Казакова А.Н. 172
Казакова Е.М. 173
Казакова Р.Р. 253
Казанская Г.М. 274
Казанцев А.Н. 166
Казанцева Д.В. 246
Казанцева О.А. 166, 208, 211, 214, 233, 235
Казачкина Н.И. 288
Кайшева А.Л. 158
Калабин Г.А. 154
Калеева Т.С. 53, 118
Калиберда Е.Н. 61, 66
Калинин Д.С. 88
Калинин Е.П. 44, 244
Калинин Р.С. 271
Калинина Н.О. 198
Калинина Т.И. 189
Каллистова А.Ю. 183
Калмыков С.Н. 281, 282
Калужский Л.А. 123, 147, 161
Камарова К.А. 17, 52, 54, 72
Каменихина И.А. 165
Камынина А.В. 232
Камышинский Р. 228
Камышинский Р.А. 103, 275
Кантидзе О.Л. 7, 11, 35
Кануа Р. 9
Капица И.Г. 246
Капрельянц А.С. 13, 38, 293
Карабанов А.В. 249
Карабут М.М. 283, 296
Карамзин С. 5
Карамова А.Э. 61
Карасев Д.А. 173
Карасева М.А. 52, 66, 73, 83, 85
Карганова Г.Г. 207, 211, 213
Каргатов А.М. 108
Карелина У.А. 22, 34, 59
Кариш Р. 113
Каркищенко В.Н. 48
Карлинский Д.М. 118, 119, 128
Карлова М.Г. 8
Карлсен А. 208
Карпенко И.Л. 208, 256
Карпова Г.Г. 57, 61, 81
Карпова О.В. 89, 96, 98–100
Карпова С.Г. 255
Карпухина А. 9, 215, 271
Карут Р. 254
Карцев В.Г. 251
Карцева О.В. 124
Каршиева С.Ш. 141
Карягина А.С. 92
Карякин А.А. 229
Касперович А.В. 71
Като К. 196
Качановский М.С. 292
Кашеверов И.Е. 4, 44–46

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

- Каширина Д.Н. 151, 152
Кашко Н.Д. 35, 78, 96
Кашпаров И.А. 90
Кашуро В.А. 135
Каюмов А.Р. 253
Каява А.В. 185
Кветкина А.Н. 56
Кельмансон И.В. 290, 294, 296, 297
Кер Д.С. 207
Киль Ю.В. 275
Ким А. 146, 159
Киндышева С.В. 157
Киреев И.И. 7, 271
Киреева Е.А. 67
Киреева Н.А. 268
Кириченко А.В. 86
Кирпичников М.П. 8, 60, 61, 90, 91, 95, 103, 105, 106, 139, 179
Киселев И.С. 173
Киселева Д.А. 111
Киселева Е.Б. 283, 284, 291, 299
Киселева И.С. 202
Киселева О.И. 155, 156, 164
Кисель Э. 230
Кисель Э.В. 146, 167, 247
Кислицин В.Ю. 193
Кистенев Ю.В. 284
Кихай Т.Ф. 204
Киямова Р.Г. 54, 80, 82, 142, 169
Клабенкова К.В. 21
Кладова О.А. 126
Кларк Д. 27
Класс А.Л. 219
Клеменова И.А. 291
Клементьева М.В. 284
Клемент И. 26
Кливер Е.Э. 274
Климанова Е.А. 243
Клименко Н.С. 12
Климентов А.С. 211
Климина К.М. 7, 164, 206, 218
Климина К.С. 177
Климченко А.С. 290
Клочков В.В. 108
Клычников О.И. 197, 207
Ключникова А.А. 152, 154, 170, 174
Кнорре В.Д. 61, 93, 94
Кнорре Д.А. 78, 96, 244, 256, 268
Князев А.Н. 57, 74, 81, 151, 159
Князева К.Э. 91, 131
Князева О.А. 67
Кобякова М.И. 194
Кобякова М.И. 270, 272
Ковалев А.А. 181
Ковалев Д.А. 181
Ковалев Л.И. 165, 262, 262
Ковалева А.Л. 262
Ковалева М.А. 165, 262
Ковалевский А.А. 147, 161
Коваленко А.О. 98
Коваленко Е.В. 13
Коваленко Е.И. 250
Коваленко И.Б. 112
Коваленко Т.Ф. 225
Коваль В.В. 89, 97, 106, 120
Коваль О.А. 145, 225, 278
Ковальчук С. 15
Ковальчук С.И. 63, 79
Ковель Е.С. 193
Ковина А.П. 35
Кожевникова Е.Н. 221, 248
Кожевникова О.С. 247
Козин М.С. 174
Козлов Е.Н. 17
Козлова А.С. 116
Козлова Л.В. 154, 289
Козлова Т.А. 181, 192
Козловская Л.И. 137, 235
Козловский В.С. 65
Козмай Я.А. 182, 275
Козырь А.С. 117
Кокорева Н.Е. 272
Колдышева Е.В. 274
Колесников А.А. 23
Колесникова Н.Н. 180
Колесникова Т.Д. 11
Колобова А.В. 57, 61
Коломиец Э.И. 208
Колосов П.М. 93, 96
Колосова Н.Г. 247
Колотаев А.В. 281
Колотьева Н.А. 121
Колпаков Ф.А. 14
Колударова Л.В. 82
Кольцова Е. 5
Коляденко И.А. 117
Комар А.А. 120
Комарова А.Д. 295
Комарова Е.Ю. 275
Комарова Т.В. 17, 52, 54, 72
Комедчикова Е.Н. 287
Кометова В.В. 252
Комиссаров А.Б. 34, 75, 210
Комков Д.С. 204
Комкова М.А. 229
Комлев А.С. 133
Комолов А.С. 62
Конарев П.В. 107
Кондакова О.А. 89, 98, 100
Кондратенко Н.Д. 238
Кондратьева Д.А. 90
Кондратьева Л.Г. 87
Кондрашова А. 208
Конева А.Л. 275
Кононихин А.С. 113, 114, 117, 151, 152, 157, 177
Конопацкова О.М. 293
Конопкина Е.А. 279
Конопский В.Н. 179
Константинов М.А. 152, 166
Константинова И.Д. 257
Коньшева Д.Н. 169
Копанцев Е.П. 87
Копонова А.Н. 82
Копосова О.Н. 166, 233, 235, 276
Копылов А. 228
Копылов А.Т. 158, 246, 72
Копытова Д.В. 14, 28
Копытова Т.В. 226
Корженевский Д.А. 98
Корниенко М.А. 206
Корнилов Ф.Д. 105
Коровина А.Н. 8
Короев Д.О. 232
Королева П.И. 184
Коршун В.А. 45, 48, 51, 134, 136, 139, 142
Корябина К.С. 75
Корягина А.О. 98, 101
Корягина М. 15
Корягина М.А. 86
Кособокова Е.Н. 68
Косоруков В.С. 68
Костин Н.Н. 70, 93, 94
Костров С.В. 52, 273
Костромина М.А. 92, 130, 189
Костюк А.И. 290, 295
Костюк Г.П. 292
Костюшев Д.С. 14, 205, 217, 232, 255, 234
Костюшева А.П. 14, 205, 217, 232, 234, 255
Костяева А.В. 260
Кот Э.Ф. 109
Котельникова О.В. 119
Котиева И.М. 254
Кото А.А. 18
Котова Д.А. 290, 294, 296
Котова Е. 8
Кочаровская М.В. 90, 103
Кочетков С.Н. 208, 235, 256, 257
Кочетов А.П. 88, 175
Кочнева Г.В. 225
Кочубей В.И. 285
Кошелев С.Г. 60
Кошкина Д.О. 109
Кравченко Т.В. 45, 51
Краева Н. 23
Крайникова Л.В. 27
Крайнова М.Д. 282
Краморенко Н.В. 161
Красик С.В. 227
Красикова Р.Н. 278–280
Красковская Н.А. 76, 266
Краснов В.П. 227
Красовская И.Е. 47
Кратасюк В.А. 187
Крестинина О.В. 272
Кривицкая А.В. 59, 143
Криворотов Д.В. 61
Кривошей А.В. 125
Кривцов Г.Г. 255
Критченков И.С. 295
Кропотов А.В. 220
Кропочева Е.В. 9, 18, 36, 38, 78
Кротенко Н.В. 248
Кротенко Н.М. 248, 266
Круглов А.А. 30
Круглова Н.А. 204, 212
Крупянский Ю.Ф. 71
Крутова В.А. 245
Крылов В.Н. 105

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

- Крылов Н.А. 103, 107, 144
Крюков М. 250
Крюкова А.В. 195
Крюкова Е.А. 98
Крюкова Е.В. 4, 44–46
Крюкова М.В. 98
Ксенофонтов А.Л. 99
Ксю К. 290
Кубанов А.А. 61
Кубарева Е.А. 19
Кубланов И.В. 160
Куджаев А.М. 124
Кудинова А.Г. 9
Кудрявцев Д.С. 4, 44–46
Кудрявцев И.В. 206
Кудрявцева С.С. 77
Кудряева А.А. 55
Кудрякова И.В. 152, 166
Кудряшева Н.С. 193
Кудряшова К.С. 106
Кузиков А.В. 126, 184
Кузинова Я.К. 293
Кузнецов А.А. 67, 102, 103, 162, 175
Кузнецов Н.А. 10, 66, 126, 130
Кузнецов С.С. 284
Кузнецова А.А. 10, 66, 126
Кузнецова Д.С. 283, 296
Кузнецова Е.А. 239
Кузнецова К.Г. 152, 154
Кузницына А.А. 123
Кузьменко А.В. 9, 18, 36, 67
Кузьменко Т.П. 248
Кузьменков А.И. 43
Кузьмина Н.В. 102
Кузьмина У.Ш. 221
Кумова М.К. 285
Кукина А.Н. 260
Кулакова О.Г. 174
Кулаковский И.В. 12, 32
Кулебякин К.Ю. 237
Кулей Р. 84
Кулемзин С.В. 256, 299
Кулигина Е.В. 24, 34, 41, 225
Куликова А.А. 18, 67
Куликова В.А. 220, 267
Кульбацкий Д.С. 60, 90, 103
Кульбачинский А.В. 9, 18, 36, 38, 67, 78, 120, 121, 127
Кулябин В.А. 212, 233, 235
Куприенко О.С. 55
Куприянова Е.А. 175, 200
Куприянова М.О. 242
Купрюшкин М.С. 20, 40
Купцов Н.С. 206
Курбанова Л.А. 140
Курбатов И.Ю. 164
Курбатов Л.К. 210
Курбацкая И.Н. 66, 68
Кургина Т.А. 122
Курлянда А. 208
Курнаева М.А. 12
Курочкин И.И. 292
Курочкин И.Н. 114
Курочкина Л.П. 77
Курпе С.Р. 88, 175
Куртова А.И. 273
Куршакова М.М. 28
Кусова А.М. 77
Кустова И.Ф. 42
Кутузов М.М. 122, 132
Кухарский М.С. 174
Кучеренко Е.Е. 258
Кущенко А.С. 16
Кьельдсен Ф. 150, 158
- ## Л
- Лаврик О.И. 3, 38, 40, 83, 120, 122, 132
Лавров К.В. 189
Лаврова М.Д. 121
Лаврушкина С.В. 271
Лагарто Д. 289
Лагарькова М.А. 7, 20, 87, 167, 170, 172, 175, 177, 216
Лагунин А.А. 173
Лагунин А.А. 234
Ладыгина В.Г. 63, 164
Лазарев В.Н. 53, 57, 74, 79, 235
Лазарев В.Ф. 55, 82, 251, 265
Лазарева Е.Н. 284, 293
Лазарева З.С. 23
Лазаревич Н.Л. 42
Лазерко Н.В. 64
Лайков А.В. 30, 85, 162, 176
Ланда С.Б. 275
Ланин А.А. 290, 294
Лапаев С. 70
Лапашина А.С. 73, 76, 78, 84, 96
Лапчинская О.А. 45, 51
Ларин А.К. 177
Ларина Е.Н. 61
Ларина И.М. 151, 152
Ларионов Д.И. 150
Ларионова Т.Д. 226
Ларичева Д.И. 154
Ларькина М.С. 281
Латыпов О.Р. 88
Латыпова Т.У. 271
Латышев Я.А. 226
Лацис И.А. 53
Лацис И.А. 79
Лебедев В.В. 216
Лебедев Ю.Б. 223
Лебедева Е.С. 274
Лебедева Н. 208
Лебедева Н.А. 120
Лебединский А.В. 160
Левицкая Ю.В. 95
Левицкий Л.И. 147, 152–154
Легач Е.И. 59
Леднев Е.М. 147
Лейченко Е.В. 56
Леклерк Ж. 185
Леконцева Н.В. 90
Лемешева В.С. 264
Леонова Е.И. 100
Леонова Л.Е. 47
Леонова Т.Е. 191
Леонова Т.С. 159, 167
Лесовой Д.М. 102
Летаров А.В. 206
Леусенко А.В. 197
Лизунова С.А. 20
Лимборская С.А. 41
Лин А. 113
Лин Ц. 78
Линькова Н.С. 56, 76
Липатова А. 208
Липатова А.В. 158
Липец Е. 5
Липкин А.В. 131
Липпенс Г. 49
Лисевич И.М. 16, 37
Лисица А.В. 150
Лисицкая Л.А. 9, 18, 36, 38, 78
Лисицына О.М. 12
Литвин А.В. 129
Литвинов Р.И. 261, 264
Литвинова Е.А. 244
Литвяков Н.В. 270, 275
Литманович Е.А. 255
Литов А.Г. 207, 213
Литти Ю.В. 181
Литус Е.Л. 110
Лихтенберг С. 153
Лобанов А.В. 255
Лобас А.А. 147
Логашенко Е.Б. 218, 242
Логвина Н.А. 24, 29
Логвинов И.О. 70
Логинов В.А. 215
Логинова А.А. 69
Лойко А.Г. 19, 36
Ломакин Я.А. 61, 69, 134
Ломзов А. 27
Ломзов А.А. 38, 106
Ломов Н.А. 32, 36
Ломова М.В. 285
Ломова Н.А. 236
Ломовский А.И. 270, 272
Лоншакова-Мукина В.И. 187
Лопина О.Д. 243
Лопухов Л.В. 162
Лось Д.А. 197
Лохов П.Г. 153, 159
Лощенко В.Б. 284
Лубова К.И. 46, 107
Лугинина А. 78
Лугинина А.П. 112
Лужин А.В. 7, 11, 35
Лукашев А.Н. 141, 206, 211
Лукашева Е.В. 141
Лукашева Е.М. 64, 159
Лукеш Ю. 23
Лукин А.М. 70
Лукина М.М. 285, 291, 295, 299
Лукина Н.В. 200
Лукина Ю.С. 189
Лукьянов Д.А. 16, 37

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

Лукьянов К.А. 286
Лукьянова А.А. 194
Лунев Е.А. 215
Лунин В.Г. 92
Луо С. 44
Луцкая Е.А. 275
Лушпа В. 78
Лушпа В.А. 105
Лущик А.Я. 281
Лыкошин Д.Д. 92, 189
Лысенко Е.А. 14, 147, 156
Лэм Р. 113
Любимова А.Н. 259
Люблинский С.Л. 48
Любченко Д.А. 249
Люкманова Е.Н. 60, 86, 90, 103, 115
Люпина Ю.В. 268
Лябин Д.Н. 12, 26
Ляпина И.С. 79, 151, 159

М

Магнитов М.Д. 7, 9
Мадумаров А.Ш. 279, 282
Маев И.В. 6
Мазин П.В. 292
Мазина М.Ю. 13
Мазур А.М. 15
Мазуров Д.В. 204, 212
Майоров С.Г. 88
Макаренко И.А. 82
Макаров В.А. 132
Макаров Г.И. 24
Макаров Д.А. 195
Макарова А.О. 188
Макарова А.В. 120
Макарова В.Д. 39
Макарова Т.М. 25
Макеева Д.С. 16
Макичян А.Т. 129
Маковитская М.А. 64
Максимов Г.В. 202
Максимов Е.Г. 58, 294, 297
Максимова М.А. 294
Максютенко Е.М. 100, 148
Маланин С.Ю. 27, 175
Малахова М.В. 170
Малева М.Г. 198, 200, 201
Малыгин А.А. 57, 61
Мальшев В.Н. 137
Мальсагова К.А. 150, 158
Мальцева Е.А. 120
Мальцева О.Н. 262
Мальянц И.К. 87, 144, 167, 172
Малюченко Н.В. 8, 109
Мамаев Д.В. 142
Мамаева А.С. 57, 74, 79, 151, 159
Мамедов А.Э. 68, 116
Мамонтова Е.Д. 263
Мамонтова Т.В. 159
Мангушева Я.Р. 176

Манолов А.И. 218
Манских В.Н. 15
Мансурова М.Н. 253
Манувера В.А. 178, 235
Манухова Т.И. 98, 99
Манцызов А.Б. 105
Маргисва О.И. 240
Маргулис Б.А. 55, 82, 251, 265, 269, 272
Марданов А.В. 51, 183
Марданова Е.С. 182
Марина В.И. 37
Маринов Д.Т. 227
Марквичева Е.А. 140
Маркелова М.И. 30, 175, 176
Марков А.В. 218, 219, 233, 242, 273
Марков О.А. 28
Маркова О.В. 78, 96
Мартынов А.И. 162
Мартынов В.И. 294
Мартынов А. 5
Марченко Н.Ю. 90
Марченков В.В. 90
Марынич Н.К. 292, 296
Марьясина С.С. 15, 31, 76, 101, 105, 154
Масамрех Р.А. 126, 184
Масленникова А.Ю. 204
Маслов Д.Л. 153, 159
Маслов М.А. 230
Маслова В.Д. 132
Маслова О.А. 9
Матаева К. 215
Матазова Е.В. 279
Матаморос М. 146
Матвеева А.М. 27, 37
Матвеев А.Г. 148, 185, 187, 189
Матиив А.Б. 68, 237
Маторин Д.Н. 202
Матюгина Е.С. 235, 257
Матюта И.О. 117
Матюшенко В.А. 206
Матюшкина Д.С. 165
Матюшкина Д.С. 30, 184, 235
Махновский П.А. 14, 156
Махонин А.М. 90
Мачулин А.В. 88
Медведев А.Е. 72, 246
Медведев С.П. 162
Медведев С.С. 167
Медведева М.В. 89
Медведько А.В. 282
Меднова И.А. 266
Медеяник И.А. 60, 226
Меерович И.Г. 288, 292
Меерович М.Г. 288
Межлумян А.Г. 79, 80
Мезенцев Ю.В. 123, 161
Мелешкина Е.Г. 134, 139
Мелик-Нубаров Н.С. 255
Мелихова Т.Д. 195
Мелконьянц Т.Г. 245
Мелконян К.И. 182, 275
Мелькина О.Е. 129
Мельник Б.С. 104

Мельник Т.Н. 104
Мельников А.Д. 161, 162
Меньшиков М.Ю. 239, 263
Мерзляк Е.М. 250
Меркель А.Ю. 21, 183
Меркулова Н.Л. 137, 138
Мессенс Й. 290, 295
Мешалкина Д.А. 264
Мещанинов В.Н. 63, 236
Мещанинова М.И. 34, 59, 81
Мещерякова О.В. 110
Мизгина Т.О. 111
Микеладзе М.А. 251
Микушина А.Д. 143
Милахина Е.В. 278
Мин Ю.З. 64
Минаев Н.В. 283
Минайчев В.В. 192, 194
Мингалеева Р.Н. 85
Минсеев К. 78
Минсеев К.С. 105, 109
Минервина А.А. 223
Миргаязова Р.М. 85
Миронов В.В. 183
Миронов К.С. 197
Миронов П.А. 133
Миронова Е.С. 80
Миронова М.В. 68
Миронова Н.Л. 20, 29
Мирошников К.А. 194
Мирошников К.К. 183
Мирошникова В.В. 238, 264
Мисюрин В.А. 134, 142
Мисюрина М.А. 100
Митин А.Н. 162
Митько Т.В. 179, 260
Мифтахова Р.Р. 51, 85
Михайличенко А.С. 189
Михайлова А.Г. 118
Михайлова А.С. 134, 142
Михайлова Е.В. 201
Михайлова И.Н. 86
Михеева П.В. 194
Михневич Н.В. 274
Мичурина С.С. 263
Мишин А.В. 112
Мишин А.С. 7
Мишина Ю.А. 260
Миязаки Н. 196
Можжаев А.А. 102, 294
Можжаева И.В. 240
Моисеев А.А. 18, 283, 284
Моисеев А.В. 105
Мокрушина Ю.А. 47, 61, 93, 110, 139
Молодых О.П. 274
Молокоедов А.С. 134, 137
Молокотина Ю.Д. 239
Монахова М.В. 19
Моор Н.А. 122
Моришо З. 127
Морозов В.В. 41
Морозов М.Д. 218
Морозов С.Ю. 65
Морозова А.Ю. 292

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

Морозова Д. 5
Морозова М.В. 221, 248
Морозова Н.Е. 75
Москаленко С.Е. 68, 148
Моторин Н.А. 118
Момир А. 26
Мошковский С.А. 152–154, 158, 170, 174
Мукба С.А. 16, 93
Мулюкина А.С. 177
Муминов М.И. 95
Муронец В.И. 77, 89
Мусабаев Э.И. 91
Мусарова В.А. 30, 235
Мусатова О.Е. 22
Мусинова Я.Р. 12
Мустьяца В. 5
Мухаметшина Л.Ф. 266
Мухаметшина Э.И. 176
Мыльников П.Ю. 72
Мышкин М.Ю. 133
Мягих И.В. 195
Мякотных В.С. 63, 236
Мясоедов Н.Ф. 136

Н

Новикова О.Д. 43, 58
Наволокин Н.А. 285
Нагао Р. 196
Нагибина Г.С. 104
Надеждин К.Д. 114
Назарова Н.М. 157
Назипова А.А. 110
Назипова А.Р. 154
Найр С.К. 49
Нарыжный С. 228
Нарыжный С.Н. 149
Науменко В.А. 227
Науменко К.Н. 40, 122
Науменко Н.В. 38
Науменков С.Д. 183
Наумова Л.И. 261
Невзорова Т.Г. 135
Невинский Г.А. 75, 242
Негрэ С.Д. 256
Некрасова О.В. 106
Немашкалов В.А. 94
Немашкалова Е.Л. 110
Немудрая А.А. 225
Нериновский К.Б. 220, 267
Нестеров Е.А. 281
Нестеров М.С. 48
Нефедова А.А. 204
Нечаева Н.Л. 114
Нечипуренко Д. 5
Никитин А.Э. 93
Никитин Н.А. 89, 96, 98–100
Никитин Т.Д. 136
Никитина А.С. 170
Никифоров А.А. 220, 267

Никифорова А.В. 205
Никифорова О.Н. 226
Николаев Е.Н. 113, 117, 151, 152, 292
Николаев Ю.А. 183
Николаева А.Ю. 7, 98, 102, 114, 117, 119, 121
Николенко Т.А. 20
Никольская А.И. 241
Никонова Д.Д. 99
Никонова М.Ф. 162
Никотина А.Д. 90, 269, 272
Никулин А.Д. 90
Никулин Н.А. 166
Никулина Д.М. 223, 245, 261
Никулич И.Ф. 247
Нил Б.Г. 113
Новиков А.Д. 189
Новиков М.С. 235
Новиков П.Е. 200, 201
Новикова Л.А. 262
Новикова С.Е. 152, 154, 155, 174
Новопашина Д.С. 210
Новоселова А.В. 236
Нольде Д.Е. 103, 107
Носик М. 208
Нураева Г.К. 256
Нургалиева А.К. 80, 142
Нуштаева А.А. 24, 41, 145, 225

О

Обухова Л.М. 226
Овсянникова Н. 7
Овчинников Л.П. 12
Овчинников М.В. 134, 137
Овчинникова Л.А. 61, 69, 134
Овчинникова Т.В. 133
Огисенко А.Д. 9
Огородова Л.М. 227
Одаренко К.В. 218, 233
Олина А.В. 9, 18, 38, 121
Ольхов А.А. 255
Опарин П.Б. 46
Орешков С.Д. 134, 142
Орищенко К.Е. 40
Орлинская Н.Ю. 226, 291
Орлов Д.С. 133
Орлов Ю.А. 263
Орлова А. 230
Орлова А.А. 264
Орловская В.В. 279, 280
Орса А.Н. 294
Осипов А.В. 46
Осипов В.Н. 138, 281
Осипова Е.В. 231
Османова Ф.Р. 98
Осморская З.И. 192
Осолодкин Д.И. 66
Остапок М.В. 226
Остерман И.А. 16, 37, 276
Острик А.А. 13, 23, 33, 38

Остроумова О.С. 53, 58, 135, 145, 214, 231
Осьмак Г.Ж. 173
Охезин Е.В. 213
Охманович К.А. 138
Охрименко И.С. 102, 232
Очкасова А.С. 81
Ошкин И.Ю. 183
Ощепков Д.Ю. 11

П

Павельев Р.С. 254
Павленко А.В. 218
Павлов К.В. 102
Павлова А.В. 19
Павлова Ю.А. 276
Павлова Ю.И. 7
Павлович С.В. 178, 228, 252
Павлюков М.С. 22, 60, 225, 226
Павлюченкова А.Н. 241
Паи Е.Ф. 113
Палькеева М.Е. 134, 137
Паниковская К.А. 198
Панина А.А. 95, 139, 179
Панина И.С. 144
Панова А.С. 290, 295, 297
Пантелеев Д.Ю. 96
Пантелеев М. 5
Пантелеев П.В. 133
Пантелеева А.А. 238, 264
Панфилов А.В. 88, 175
Панфилова М.А. 201
Парамонов А.С. 45, 51, 60, 90, 103, 115
Парунова Ю.М. 190
Парфенова Е.В. 137, 165, 239, 263
Паршина Е.Ю. 58
Паршина Ю.П. 295
Паршкова Е.В. 23
Паршукова Д.А. 123, 246
Пастре Д. 83
Пастушкова Л.Х. 151
Патракова Е.А. 278
Патрушев Д.Э. 21
Патрушев Л.И. 225
Патутина О.А. 20, 32, 42
Пахомов А.А. 294
Пашанова А.В. 279
Пашковская О.А. 273
Пеков С.И. 177
Пелевина А.В. 183
Пенкин Л.Н. 165
Пеньёр С. 43
Пеньков Д.Н. 165
Пермяков О.А. 15
Пермяков С.Е. 110
Пермякова М.Е. 110
Першина А.Г. 194, 227, 281
Петренко А.Г. 294
Петренко Д.Е. 118
Петров Е.А. 81, 151, 159

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

Петрова А.А. 154, 289
Петрова М.А. 9
Петрова Н.В. 11, 196
Петрова О.В. 245, 261
Петрова У.Л. 236
Петровская Л.Е. 98
Петровский Д.В. 158
Петрунина Н.А. 216
Петрусева И.О. 38, 40
Петухов А.В. 51
Петушков И.В. 127
Петушкова А.И. 131
Пешкова А.Д. 261, 264
Пикин О.В. 117
Пилигримова Э.Г. 166, 211, 214, 233, 235
Пилипчук Т.А. 208
Пименов Н.В. 183
Пиньейро-Жуниор Э.Л. 43
Пиняев С.И. 248
Пипия С.О. 110, 139
Писарев Е.В. 19
Писарев Э.К. 39
Писарюк А. 5
Писклова М.В. 173
Питинова М.А. 220
Пичугин А.В. 274
Плахова Т.В. 277
Плеханов А.А. 284
Плешакова Т.О. 150, 163, 171
Плешкан В.В. 273
Плотников Е.Ю. 60
Побегалов Г.Е. 75
Побегутц О.В. 63, 164
Побожева И.А. 238, 264
Поверенная Е.В. 150, 156, 164, 169
Повыдыш М. 230
Повыдыш М.Н. 264
Погодин П.В. 155
Погорельый М.В. 223
Подгорный О.В. 266
Подкуйченко Н.В. 263
Поздняков Н.В. 70
Позднякова-Филатова И.Ю. 29, 39
Позмогова Г.Е. 7, 20, 25, 216, 235
Покровский В.С. 141
Полиенко А.Е. 207, 211
Политко М.О. 273, 274
Полужктова Е.А. 262
Польшаков В.И. 101, 105, 154
Поляков К.М. 122
Полякова Е.А. 199, 264
Полянский А.А. 103
Пометун А.А. 69
Пометун Е.В. 69
Поминова Д.В. 284
Пономарева Е.В. 82
Пономарева Н.И. 14, 205, 217, 232, 234, 255
Пономарёва Т.И. 70
Пономаренко Е.А. 150, 155, 156, 164
Попов А.А. 40, 180, 255
Попов А.В. 60
Попов А.М. 123

Попов В.Е. 80
Попов В.О. 7, 98, 102, 115, 119, 121, 122, 131
Попов В.П. 150
Попов Д.В. 14
Попов Д.В. 147, 156
Попов И.А. 177
Попов К.А. 241
Попова М.А. 249
Поправко Д.С. 191
Поройков В.В. 5, 155, 173, 234
Портнягина О.Ю. 43, 58, 111, 185
Порфирьева Е.И. 100
Посыпанова Г.А. 281
Похолкова Г.В. 11
Почечуев М.С. 290, 294
Прасолов В.С. 16
Примак А.Л. 106
Прокаева А.И. 273
Прокопенко П.И. 206
Прокопенко Ю.А. 119, 128
Проскурин Г.В. 136
Простова М.А. 18, 120
Протасов Е.А. 133
Протасова Е.А. 297
Прохорова Д.В. 40
Прохорчук Е.Б. 15
Проценко Д. 5
Пугачев М.В. 254
Пудова Д.С. 94, 101
Пурвиньш Л.В. 213
Пустогогаров Н.А. 96
Путевич Е.Д. 275
Пучкова Л.В. 263
Пчелина С.Н. 237, 238, 264
Пышный Д.В. 20, 40
Пьянзина А.Е. 248
Пятницкий М.А. 152, 156, 169

Р

Равин Н.В. 51, 182, 183
Раденович С.Н. 202
Радько С.П. 150
Раевский Р.И. 290, 295, 298
Разин С.В. 3, 7, 9, 21
Разникова Е.В. 110
Ракитина Т.В. 62, 115, 118, 119, 121, 122
Расин А.Б. 125, 128
Ратчина С. 5
Рахмаев И.И. 254
Рахматуллина А.Р. 51
Ревин В.В. 242, 248, 260
Резникова О.В. 133
Рекстина В.В. 53, 118
Ремизова Ю.А. 41
Речкунова Н.И. 120
Решетникова Д.Д. 82, 142
Риггс К.Л. 16
Ризванов А.А. 51, 85

Ризниченко Г.Ю. 112
Рихтер В.А. 27, 34, 41, 145, 225, 278
Рогов А.С. 281
Рогоза Т.М. 100
Рогоза Т.М. 185
Родимова С.А. 283, 296
Родионов В.В. 252
Родионова М.В. 202
Родькин С.В. 220
Рожков В.А. 282
Рожкова А.М. 94, 193
Розенфельд М.А. 113, 114
Розов А.В. 266
Романишкин И.Д. 284, 294
Романов В. 113
Романов Р.С. 105
Романова В.А. 176
Романова Л.Ю. 207, 211
Романова Ю.Д. 85
Ромозанова А.М. 236
Росинская А.В. 249
Ростова Ю.Г. 128
Ротанова Т.В. 124
Рубин А.Б. 112
Рубиновский Г.А. 268
Рубцов М.А. 32, 36
Рубцов Н.Б. 11
Рубцов Н.К. 128
Рубцов Ю.П. 22
Рубцова М.П. 15, 22, 42, 86
Рудакова А.А. 68
Руденко А.Ю. 31, 101
Руденко Л.Г. 206
Руденок М.М. 222, 249
Руднев В.Р. 158
Рузанов М. 113
Рузина М.Н. 206
Руле Дж. 26
Румш Л.Д. 119
Румянцев А. 5
Румянцева Н.А. 74, 82
Рунов А. 208
Русинова Т.В. 182, 275
Рыболовлев И.Н. 222
Рыбченко В.С. 95, 139
Рыжиков И.А. 114
Рыков С.В. 48
Рябков М.Г. 291
Рябова А.В. 58, 284, 294
Рябова Н.А. 233, 235
Рябоконе А.М. 117
Рябчевская Е.М. 89, 96, 98, 100
Рябченко Л.Е. 191
Рябчикова Е.И. 41
Рязанский С.С. 9, 18, 120, 127
Рязанцев Д.Ю. 65

С

Сабирова А.Э. 253
Савватеева Л.В. 131, 132

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

- Савельева А.В. 41
Савенкова Д.В. 80, 82, 142
Савин И.А. 219, 273
Савин С.С. 69
Савиновская Ю.И. 24, 41
Савицкий А.П. 288, 289, 292, 293, 296
Садкин В.Л. 281
Садыкова Э.З. 284
Саеи Амир Ата 147
Сазонова Н.М. 70, 79
Сазонова Н.М. 80
Сайганова М.А. 231
Салахутдинов Н.Ф. 218, 233
Салина Е.Г. 13, 23, 33, 38
Салихов А.И. 257
Салл Ф. 271
Саломатина О.В. 218, 233
Сальников В.В. 188
Сальникова М.А. 223
Самарин А.А. 187
Самойленко И.В. 227
Самохвалова Л.В. 65, 65
Санникова С.С. 261
Санчугова Д.А. 108
Сапарбаев М.К. 130
Сапожников С.В. 253
Сапожникова К.А. 134, 139, 142
Сафенкова И.В. 190, 191
Сафина Д.Р. 85
Сафина С.З. 80
Сафиуллина С.И. 261
Сафонов В.А. 258
Сафроненко А.В. 254
Сафронова В.Н. 133
Сахабуддинова А.Р. 64
Сачкова А.С. 193
Сачкова Д.А. 291
Свергун Д.И. 107
Сверчинский Д.В. 82
Светлова А.О. 52, 83, 85
Светлова М.П. 220, 267
Светлова Ю.И. 298
Свешников П.Г. 95, 139
Свиридов О.В. 55, 217
Свищевская Е.В. 13
Северин Ф.Ф. 244, 268
Северинов К. 49
Северов В.В. 25
Севостьянов И.А. 244
Седлов И.А. 57, 159
Седых С.Е. 242
Селезнёва И.И. 189
Селимзянова А.И. 48
Селина П.И. 273
Селиханов Г.К. 111, 196
Семаков Г.П. 250
Семашко Т.А. 26, 164, 167
Семенов Д.В. 24, 27, 34, 37, 41, 278
Семенова Е.И. 222
Семин Я.К. 30
Семисотнов Г.В. 90
Семке А.В. 156, 157, 166, 248, 266
Семкина А.С. 287
Семьянов А.В. 60
Сенина А.М. 176
Сенькова А.В. 29, 218, 219, 233, 273
Сергеева А.Д. 290, 295, 297, 298
Сергеева М.В. 34, 75, 229
Сергеева М.Г. 241, 243, 269
Сергеева О. 26
Сергеева О.С. 68
Сергиев П.В. 15, 16, 31, 37, 76, 105, 154
Серебрянский И. 5
Серебровская Е.О. 222, 227
Серебрякова И.А. 293
Серебрякова М. 49
Серебрякова М.В. 132
Серегин А.А. 156, 157, 166
Серегина Е. 5
Серова О.В. 294
Серченя Т.С. 217
Сивкина А.Л. 8
Сидоренко С.В. 243
Сидорин Е.В. 111
Сидорова М.В. 134, 137
Сизов М.А. 291
Сизова С.В. 179, 260
Сили-Радке К.Л. 257
Силичева М.А. 95, 204
Сильченко А.С. 125, 128
Симонова М.А. 70, 93, 94
Симуткин Г.Г. 156
Сингатулина А.Ш. 83
Синенко О.С. 201, 202
Синетова М.А. 200
Синицын А.П. 94
Синицын Б.Ф. 238
Синцова О.В. 56
Синявин А.Э. 212
Синягина М.Н. 30, 176
Сироткина М.А. 284
Ситдикова Г.Ф. 264
Ситнический А.Э. 77
Скворцов Д.А. 20
Скворцова Ю.В. 13, 23, 38
Скитченко Р.К. 185
Скобельцин А.С. 284
Скоморохова Е.А. 263
Скопенкова В.В. 215
Скорынина А.В. 166, 214, 233, 235, 276
Скрастина Д. 208
Скробков А.С. 71
Скрипникова В.С. 128
Скрипова В.С. 80, 142
Скрябин Г.А. 70, 93, 94
Сластникова Т.А. 58
Слатинская О.В. 202
Слизень М.В. 88, 175
Сломинский П.А. 219, 222, 249
Слонимская Е.М. 275
Слонимский Ю.Б. 58
Слуцкая Е.А. 58, 299
Случанко Н.Н. 58, 74, 207
Слядовский Д.А. 70
Смирнов И.В. 47, 61, 68, 93, 106, 110, 119, 124, 139, 194
Смирнова Д.И. 219
Смирнова Е.А. 268
Смирнова Е.В. 62
Смирнова Л.П. 123, 156, 157, 166, 246, 248, 266
Смирнова О.А. 208
Смит Дж.Л. 207
Смоликова Г.Н. 146, 167
Смолин Е.А. 12, 26, 32
Снытникова О.А. 160, 221, 248
Соболев А.М. 21
Соболев А.С. 280
Соболев Б.Н. 173
Соболева А. 230
Соболева А.В. 146, 158, 167
Согомонян А.С. 287
Согорин Е.А. 70
Соколов А.О. 168
Соколов Д.К. 273, 274
Соколов О.И. 168
Соколов С.С. 244, 256, 268
Соколова Е.А. 104
Соколова Е.Е. 15, 16, 31
Соколова О.С. 8, 105
Соколова Т.Г. 160
Соловьев И.Д. 288, 289, 293
Соловьев М.А. 21
Соловьева А.Ю. 131
Соловьева Е.М. 147, 153, 158, 173
Соловьева Л.В. 220
Соловьева Т.Ф. 185
Солопова О.Н. 95, 139
Сольев П.Н. 256
Солкос Г.М. 266
Сон Л.В. 45
Сонец И.В. 21
Сопова Ю.В. 100
Соркина Е.Л. 263
Сорокань А.В. 199
Сорокин Д.Ю. 119
Сорокин М.И. 18
Сорокоумов В.Н. 217
Сотников Д.В. 186
Сошникова Н.В. 12, 41
Спеченкова Н.А. 198
Спиридонов И. 5
Ставчанский В.В. 41
Станишевская В.А. 249
Старков В.Г. 45, 46
Староверов С.А. 205
Стародубова А.В. 154
Стародубцева Н.Л. 157, 178, 228, 236, 252
Старожук В.А. 111
Староселец Я.Ю. 27, 242
Старшин А.С. 15
Стасюк Е.С. 281
Стафеев Ю.С. 263
Степаненко В.Н. 195
Степанов А.А. 158
Степанов А.В. 58, 110, 267, 269, 271
Степанов Г.А. 27, 34, 37, 40, 75, 97, 106, 210
Степанова А.В. 110
Степанова Е.А. 206
Стефанов В.Е. 47

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

Стефенсон-Кларк Д. 85
Стеценко Д.А. 20, 21, 28
Столярова А.Н. 241, 249
Стратиенко О.Н. 93
Стрельникова П.А. 177
Стрельцова М.А. 250
Стройлова Ю.Ю. 77
Строкотов Д.И. 216
Струшкевич Н.В. 123, 147, 161
Студитский В.М. 8, 33, 109
Стукова М.А. 229
Стышова О.Н. 123
Субач О.М. 114, 117
Субач Ф.В. 114, 117
Судницына Ю.С. 220
Сулейманова А.Д. 191
Султанов Р.И. 9, 147, 177
Сумбатян Н.В. 24, 276
Супрунова Т.П. 198
Суринов А.К. 88, 123, 175
Сурков Ю.И. 293
Суханов С.В. 133
Суханова М.В. 83
Сухарева А.С. 201
Сухарева М.С. 133
Сухачева О.А. 112
Сухинина Е.В. 194
Суховских А.В. 274
Сушко Т.А. 161
Сысоев А.А. 84, 207
Сычев И.А. 206
Сычев С.В. 133
Сычева А.Л. 223
Сюсин И.В. 242, 248

Т

Табакмахер В.М. 43
Таллерова А.В. 79
Тальзина И. 78
Тальшев В.А. 218
Тальянский М.Э. 198
Танянский Д.А. 262
Таранин А.В. 256
Тарасов Д.Г. 245
Тарасов М.С. 247
Тарасова О.А. 234
Тарасова И.А. 153, 158, 173
Тарасюк А.В. 70, 80
Тараховская Е.Р. 264
Татарникова И.С. 242
Татарский В.В. 12
Татарский Е.В. 12
Таувин М. 290, 297
Тверской А.М. 243
Творогова А.В. 12
Тевнева Н.С. 248
Телегина Д.В. 247
Терехов С.С. 47, 51, 61, 106, 110, 139
Терешин М.Н. 195
Терешкин Э.В. 71

Терешкина К.Б. 71
Терещенков А.Г. 276
Терпинская Т.И. 46
Тетерина А.Ю. 194
Тимашев П.С. 283
Тимонина А.А. 142
Тимофеев В.И. 62, 118
Тимофеева А.М. 242
Тимофеева М.М. 34
Тимченко М.А. 70
Титгат Я. 43
Титченко Н.А. 279, 281
Тихонова О.В. 155, 166
Тихонова П.О. 7
Тихонова Т.В. 119, 122, 131
Тишков В.И. 69, 105
Тищенко С.В. 117
Ткачев В.С. 18
Ткаченко А.А. 231
Тодоренко Д.А. 202
Тойменцева А.А. 98
Токарева А.О. 157
Токарчук А.В. 292
Токмакова И.П. 189
Толстова П.О. 40
Томо Т. 196
Топорова В.А. 139, 179
Топорова В.А. 95
Торопыгин И.Ю. 152, 166
Тосунян М.А. 290, 295
Тресцова М.А. 265
Третчикова О.А. 196
Третьяков Д.О. 76, 84
Третьякова Е.В. 251
Трипти 201
Трифорова О.П. 153, 159
Трифорова Т.С. 105
Троицкая О.С. 145, 225, 278
Трофимов Ю.А. 103, 111
Трубицина Н.П. 100
Трушина Д.Б. 140
Тугасва К.В. 84, 207
Тумилович А.М. 147
Туник С.П. 295
Тупикин А.Е. 57, 61
Тураев А.В. 216
Турдикулова Ш.У. 91, 95
Тухватуллин А.В. 221
Тучин В.В. 284, 288, 293
Тучина Д.К. 288
Тюбаева П.М. 255
Тюрин А.П. 45, 48, 51
Тюрин-Кузьмин П.А. 237
Тягт А.В. 7, 21

У

Узденский А.Б. 220, 246
Украинская В.М. 267
Украинцев А.А. 132
Ульянов С.В. 7, 21, 36

Умнов Р.С. 76
Унания Л.С. 129
Урбан А.С. 102, 114, 162
Усанов С.А. 102, 123, 147, 184
Усачев К.С. 17
Устинова Е.С. 241
Утепова И.А. 55, 265
Уткин Ю.Н. 4, 44–46
Ушаков В.С. 274
Ушакова Е.И. 274
Уштанит А.И. 259

Ф

Фаворов А.В. 69
Фаворова О.О. 30, 173, 174
Фадеев Р.С. 194, 270, 272
Фадеева И.С. 192, 194
Файзуллин Д.А. 188
Фанг Динг 91
Фарафонова Т.Е. 155, 174
Фарберов Л. 24
Фатеев И.В. 130
Фатыхова С.А. 123
Федина М.П. 207
Федоров А.Н. 91, 97, 131
Федоров А.С. 186
Федоров В.А. 112
Федоров Д.А. 243
Федоров Д.Е. 218
Фёдоров Д.М. 165
Федорова А.А. 274
Федорова О.С. 10, 126, 130, 279, 280
Федосеева А.И. 177
Федотов А.Б. 290, 294
Федотов И.В. 290, 294
Федотова А.О. 281
Федотова О.А. 199
Федченко В.И. 72
Федякина И.Т. 208
Фенюк Б.А. 73, 76, 78, 84, 96, 129
Феокистов А.В. 41
Феофанов А.В. 8, 106, 109
Фесенко И.А. 57, 74, 79, 81, 151, 159, 198
Фикслер Д. 292
Филатенкова Т.А. 133
Филатов А.В. 20, 256
Филатова Е.В. 219
Филимонов В.В. 90
Филимонов Д.А. 173, 234
Филимонова Е.И. 200
Филиппенков И.Б. 41
Филиппов М.В. 70
Филиппова Т.А. 126
Филькин С.Ю. 131
Финкельштейн А.В. 104
Фисунов Г.Ю. 63, 167, 178, 206
Фокина А.А. 21, 28
Фомин А.С. 205
Фотина А.С. 100

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

Франкевич В.Е. 157, 178, 228, 236, 252
Френкель Ф.Е. 274
Фридрих Т. 58
Фриз С. 290, 297
Фролов А. 230, 247
Фролов А.А. 64, 146, 159, 167, 264
Фролова А.А. 39, 84
Фролова Н.В. 146, 159, 167
Фуджин М. 28
Фурсова А.Ж. 247
Фуфина Т.Ю. 111, 196

Х

Хабас Г.Н. 178, 228, 252
Хабатова В.В. 202
Хабипова Н.Н. 236
Хабирова А.И. 261
Хабирова С.Ю. 277
Хавинсон В.Х. 56, 76, 80
Хаген В.Р. 122
Хадиуллина Р.Р. 85, 236
Хаертдинов Н.Н. 264
Хайдуков Е.В. 132
Хайдукова М.М. 133
Хайруллин Р.Ф. 236
Хайтович Ф.Е. 292
Хаматова А.Ю. 215
Хамид З.М. 238
Хандажинская А.Л. 235, 257
Хао Д. 202
Харлампиева Д.Д. 57, 74
Харченко М.С. 128
Хачатрян Д.С. 281
Хвостов Д.В. 48
Хисматуллин Р.Р. 261
Хлынова А.Э. 285
Хмелевская Е.С. 227
Ходорковский М.А. 74, 75, 82
Хокис Д.Э. 207
Холод Н.С. 88
Холодилов И.С. 211, 213
Хомутов А.Р. 233, 257, 257
Хомутов М.А. 233, 257
Хорн П.А. 112
Храброва Д.А. 19
Хренова М.Г. 59, 115, 119, 122, 131, 296
Хрулев А.А. 298
Хрущев С.С. 112
Хуснутдинов Э.А. 201
Хуснутдинова Д.Р. 176

Ц

Цабай П.Н. 70
Цаллагов С.И. 122
Царев А.А. 159

Царенко С. 5
Цветков В.О. 199
Цветков В.Б. 7, 20
Цвиркун Д.В. 215
Цедилин А.М. 97
Целых И.О. 195
Центалович Ю.П. 149, 160–162, 221, 248
Цетлин В.И. 4, 44–46
Цидулко А.Ю. 273
Цимайло И. 215
Циммер С.Л. 23
Циферова Н.А. 91, 95
Цой В.Э. 95
Цой Е.А. 167, 178
Цоколаева З.И. 239
Цурин Н.В. 48
Цыганов М.М. 270, 275
Цымбалюк И.Ю. 241

Ч

Чаговец В.В. 157, 178, 228, 236, 252
Чарушин В.Н. 265
Чарышникова О.С. 91, 95
Часов В.В. 85
Чашин И.С. 180
Чеботарев А.С. 290
Чеботарева Н.В. 152
Челомбитько М.А. 241
Челуснова Ю.В. 61
Чепикова О.Е. 132
Черданцев И.А. 39
Черевацкая М.А. 146, 167
Черепанова Е.А. 199
Черневская Е.А. 21
Черников И.В. 20, 22, 34, 230, 271, 59
Чернов А.Н. 133
Чернов И.П. 87
Черноловская Е.Л. 22, 34, 59, 230
Черноносков А.А. 97, 106
Чернуха И.М. 165
Черных Н.А. 160
Черныш М.А. 64
Чернышева М.Г. 71
Чернышева Н.Ю. 185
Чернышова Д.Н. 145
Черткова Р.В. 99
Чертова Н.В. 131
Чесноков Ю.М. 103
Чечекина О.Г. 15
Чиглинцева Д.А. 32, 42
Чикаев А.Н. 256
Чиргадзе Н.Ю. 113
Чиргадзе Ю.Н. 113
Чиринскайте А.В. 100
Чистов А.А. 48, 136
Чистяков Д.В. 241, 243, 269
Чистякова А.К. 206
Чиччи Р. 289
Чугунов А.О. 103

Чугунов А.О. 43, 50, 103, 107, 115, 144
Чудаков Д.М. 222, 223, 225, 227, 229, 250
Чуйкова С.В. 137, 138
Чукина Н.В. 201
Чуланов В.П. 14, 205, 217, 232, 234, 255
Чуланова Ю.В. 260
Чулина И.А. 60
Чулкин А.М. 193
Чумаков П.М. 158
Чумакова О.С. 173
Чупахин О.Н. 265
Чупраков И.А. 282
Чухонцева К.Н. 52, 73, 85, 92

Ш

Шабалин И.Г. 122
Шабалина А.В. 208
Шабалкина А.В. 105
Шабуня П.С. 123
Шабурова О.В. 105
Шагимарданова Е.И. 156, 268
Шадрин А.М. 166, 208, 211, 212, 214, 233, 235, 276
Шадрин М.И. 219, 222, 249
Шадрин О.А. 204, 211, 214
Шайтан А.К. 118
Шакирова Э.Ж. 80
Шакуров Р.И. 179, 260
Шамова О.В. 133, 143
Шарипова М.Р. 85, 94, 98, 101
Шаров Д.А. 118
Шарова Е.И. 170, 177
Шарова Н.И. 162
Шарова Н.П. 59
Шаронов Г.В. 222, 225, 227, 229
Шархемуллина А.Р. 176
Шахиджанов С. 5
Шахпаронов М.И. 225, 226
Шашин Д.М. 293
Шашин С.А. 245
Швейгер И.В. 278
Шеваль Е.В. 12
Шевелёв Г.Ю. 40
Шевелёва М.П. 110
Шевцов М. 78
Шевченко К.В. 136
Шевченко О.В. 256
Шедл П. 17
Шекунов Е.В. 214
Шелихова Е.А. 281
Шелухина И.В. 4, 44
Шемякина А.О. 189
Шен Д.-Р. 196
Шендер В. 15, 87, 141, 144, 162, 167, 168, 170, 172, 226
Шенкарев З.О. 45, 51, 60, 90, 103, 115, 133
Шепелюк М.А. 15, 154

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи – Дагомыс

3–8 октября 2021

Шереметьева М.Е. 191
Шерстюк В.В. 162
Шестакова М.В. 263
Шеховцов С.В. 149
Шешукова Е.В. 17, 52, 54, 72
Шидловский Ю.В. 17
Шилкин Е.С. 120
Шилов С.В. 70
Шиловский Г.А. 56
Шимолина Л.Е. 285
Шинода Т. 196
Шиюхама Я. 28
Шипков Н.С. 119
Шипунова В.О. 20
Шипунова В.О. 271, 287
Ширманова М. 289
Ширманова М.В. 285, 291, 295, 299
Ширшиков Ф.В. 260
Ширшикова Т.В. 85
Ширяев Г.И. 200
Шитиков Е.А. 146, 206
Шишкина Т.А. 261
Шишова А.А. 195
Шкель Т.В. 123
Шлеева М.О. 293
Шлепова О.В. 60, 86
Шливко И.Л. 291
Шлихт А. 228
Шлихт А.Г. 161
Шляпина В. 15
Шляпина В.Л. 86
Шляпников М.Г. 88
Шмаков Р.Г. 236
Шмакова А. 9, 215
Шмальгаузен Е.В. 89
Шмаров М.М. 274
Шмендель Е.В. 230
Шмидт А.А. 215
Шнайдер П.В. 87, 141, 144, 167, 170, 172, 175
Шнитко А.В. 71
Шомрон Н. 24
Шпаков А.О. 217
Шпаков А.О. 220
Шпилевая М.В. 61
Шпичка А.И. 283
Шпудейко П.С. 227
Шрам С.И. 219
Штам Т. 228
Штам Т.А. 275
Штарк О.Ю. 146
Штырлин Н.В. 253
Штырлин Ю.Г. 253, 254
Шуберт Ф. 11
Шубина М.Ю. 12, 260
Шувалов А.В. 15, 16, 31, 93
Шувалов М.В. 136
Шувалова Е.Ю. 15, 16, 93

Шугаева Т.Е. 73
Шулепко М.А. 60, 60, 86, 89, 103
Шульга А.А. 271
Шумилина Ю.С. 159
Шумов И.Д. 171
Шумянцева В.В. 126, 184
Шустова Е.Ю. 235
Шутов А.В. 186
Шушкова Н.А. 155

Щ

Щербак Д.Л. 63
Щеславский В.И. 289, 291, 295
Щукина А.А. 277
Щукина Д.А. 200
Щулькин А.В. 72

Э

Эзериня Д. 295
Эльбекьян К.С. 129
Эльдаров М.А. 131
Эльмуратов А. 208
Эстерас Н. 232

Ю

Югай В.Н. 251
Юдин Д.А. 9
Южакова Д. 289
Южакова Д.В. 225, 229, 299
Юнин М.А. 47
Юрина Л.В. 113, 114
Юркова М.С. 91, 97
Юрова М.В. 178, 228, 252
Юрченко В.Ю. 23
Юрченко Т.С. 69
Юсаф С. 27
Юсубалиева Г.М. 299
Юсупов М.М. 17

Я

Яблоков Е.О. 103, 123, 147, 161
Яголович А.В. 91, 140

Якимов А.П. 220, 267
Якунина М. 105
Якушева Е.Н. 72
Ямпольский И.В. 286
Ян Р. 290
Яненко А.С. 187, 189, 191
Янина И.Ю. 284, 285
Янсонс Ю. 208
Янцевич А.В. 281
Яньшолле В.В. 160, 161
Яньшолле Л.В. 149, 160–162
Яренков Н.Р. 39
Ярочка О. 271
Ярослав А.А. 255
Яруллина Л.Г. 199
Ясько М.В. 256
Яшин К.С. 60, 283

Ait-Si-Ali S. 10
Anarbaev R. 127
Bruno L.B. 198
Del-Maestro L. 10
Demidov O. 10
Farafonova T. 148
Glebe D. 14, 217, 232
Glentis A. 10
Joliot V. 10
Kappenberger J. 127
Karpukhina A. 10
Kisker C. 127
Kumar A. 198
Kuper J. 127
Kurbatov L. 148
Lavrik O. 127
Magnitov M.D. 10
Mège R.-M. 10
Naumenko N. 127
Neumaier B. 279
Novikova S. 148
Petruşeva I. 127
Piel M. 10
Rajkumar M. 198
Razin S.V. 10
Tikhonova O. 148
Tripti 198
Ulianov S.V. 10
Ulyanik B. 10
Urusova E.A. 279
Vassetzky Y.S. 10
Williart A. 10
Zakharova V.V. 10
Zarrad F. 279
Zgoda V. 148
Zlatopolskiy B.D. 279



**III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ,
БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ
◆ VII СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ ◆
◆ X РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ» ◆
◆ VII СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ ◆
(Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021).
ТОМ 2**

Издательство «Перо»
109052, Москва, Нижегородская ул., д. 29-33, стр. 15, ком. 536
Тел.: (495) 973-72-28, 665-34-36
Подписано в печать 16.11.2021. Формат 60×90/8.
Усл. печ. л. 39,125. Заказ 713.