ISBN 978-5-906988-33-1
ActaNaturae

СПЕЦВЫПУСК | 2017

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАДЕМИКОВ
М.М. ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА РАН

НАУЧНЫЕ ТРУДЫ

ОБЪЕДИНЁННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ

МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ «XII ЧТЕНИЯ ПАМЯТИ АКАДЕМИКА ЮРИЯ АНАТОЛЬЕВИЧА ОВЧИННИКОВА»

VIII РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

Под редакцией
В.Т. Иванова, А.Г. Габибова

Москва, Россия
18–22 сентября 2017

УДК 57
ББК 28.4я43
Д23

Под редакцией
академика В.Т. Иванова и академика А.Г. Габибова

Д23 МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ «XII ЧТЕНИЯ ПАМЯТИ АКАДЕМИКА ЮРИЯ АНАТОЛЬЕВИЧА ОВЧИННИКОВА» И VIII РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ» (Москва, ИБХ РАН, 18–22 сентября 2017. – М. : Издательство «Перо», 2017. – 192 с.

ISBN 978-5-906988-33-1

Сборник научных трудов включает материалы актовых и пленарных лекций, симпозиальных докладов, выступлений на заседаниях круглых столов и стендовых докладов, представленных на Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российском симпозиуме «Белки и пептиды», состоявшихся в рамках единого научного форума Москве 18–22 сентября 2017 года.

Тематика представленных докладов охватывает актуальные разделы биоорганической химии, биотехнологии, молекулярной биологии и смежных дисциплин, в том числе:

- Поиск и выделение новых природных пептидов и белков. Пептидомика. Протеомика
- Биологические функции и механизмы действия пептидов и белков
- Пептидный синтез. Белковая инженерия
- Физико-химические методы исследования структуры пептидов и белков. Взаимосвязь «структура – функция»
- Химия и биология ферментов
- Инновационные лекарственные средства на основе пептидов и белков
- Биотехнология
- Биоинженерия растений
- Ионные каналы и рецепторы нервной системы: структура, физиология и болезни

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.

УДК 57
ББК 28.4я43
© Коллектив авторов, 2017

ISBN 978-5-906988-33-1



АКТОВЫЕ ЛЕКЦИИ

THE UBIQUITIN PROTEOLYTIC SYSTEM – FROM BASIC MECHANISMS THRU HUMAN DISEASES AND ON TO DRUG DEVELOPMENT

Aaron Ciechanover
Cancer and Vascular Biology Research Center, Faculty of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

Between the 50s and 80s, most studies in biomedicine focused on the central dogma – the translation of the information coded by DNA to RNA and proteins. Protein degradation was a neglected area, considered to be a non-specific, dead-end process. While it was known that proteins do turn over, the high specificity of the process – where distinct proteins are degraded only at certain time points, or when they are not needed any more, or following denaturation/misfolding when their normal and active counterparts are spared – was not appreciated. The discovery of the lysosome by Christian de Duve did not significantly change this view, as it was clear that this organelle is involved mostly in the degradation of extracellular proteins, and their proteases cannot be substrate-specific. The discovery of the complex cascade of the ubiquitin solved the enigma. It is clear now that degradation of cellular proteins is a highly complex, temporally controlled, and tightly regulated process that plays major roles in a variety of basic cellular processes such as cell cycle and differentiation, communication of the cell with the extracellular environment and maintenance of the cellular quality control. With the multitude of substrates targeted and the myriad processes involved, it is not surprising that aberrations in the pathway have been implicated in the pathogenesis of many diseases, certain malignancies and neurodegeneration among them, and that the system has become a major platform for drug targeting.

HOW ENZYMES CATALYSE PHOSPHORYL TRANSFER. A GREAT PARADOX SOLVED!

G.M. Blackburn and Yi Jin
Krebs Institute, Department of Molecular Biology, University of Sheffield, UK; School of Chemistry, Cardiff University, Wales, U.K.

The phosphoryl group, PO_3^-, is the ultimate dynamic structural unit in the biological chemistry of phosphate. Its transfer from a donor to an acceptor atom, with oxygen much more prevalent than nitrogen, carbon, or sulfur, is at the core of a great majority of enzyme-catalysed reactions directed at phosphate esters, anhydrides, amidates, and phosphorothioates.

Studies of these life-delivering processes at a molecular level hit the headlines with work on Ribonuclease A by Brian Rabin in the 1960s,[1] and reached a plateau by the end of the century. Then the serendipitous discovery that the phosphoryl group could be simulated by "nuclear mutation," *i.e.* replacement of PO_3^- by MgF_3^- or AlF_4^-, provided a fresh impetus that has underpinned the wide application of metal fluoride (MF_x) complexes as mimics of transition states for enzymatic phosphoryl transfer.[2] MF_x complexes can be studied equally in the solid state or in solution and used as a platform for advanced computational analysis. Direct observation of ternary and quaternary protein complexes embracing MF_x transition state models has been precisely achieved by means of x-ray crystallography in the solid state and ^{19}F NMR in solution. Many such studies have underpinned a radically new mechanistic approach to enzyme catalysis for a huge range of phosphoryl transfer processes, as varied as kinases, phosphatases, phosphomutases, and phosphohydrolases.[3] The results, without exception, have endorsed trigonal bipyramidal geometry (tbp) for concerted, "in-line" stereochemistry of phosphoryl transfer.

QM DFT computation has established the validity of tbp MgF_3 complexes as reliable models for true PO_3^- transition states, delivering closely similar bond lengths, coordination to essential metal ions, and virtually identical extended networks of hydrogen bonds.[2,3] Dramatically, the revelation of hydrogen-bond control of transition state organisation to achieve orbital overlap between bond-forming species within enzyme transition states is a new challenging theme for wider exploration.[2,4] This will be exemplified for recently published[5] and unpublished examples of enzyme mechanisms.

References

1. Findly D, Herries DG, Mathias AP, Rabin BR, Ross CA. "The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease." Nature. 1961, 190, 781-4.
2. Jin Y, Molt RW, Blackburn GM. "Metal Fluorides: Tools for Structural and Computational Analysis of Phosphoryl Transfer Enzymes." Topics Curr. Chem., 2017, 375, 36-59.
3. Jin Y, Richards NG, Waltho JP, Blackburn GM. "Metallfluoride als Analoga für Studien an Phosphoryltransferenzymen." Angew. Chem., 2017, 15, 4172-92.
4. Jin Y, Molt RW, Waltho JP, Richards NG, Blackburn GM. "19F NMR and DFT Analysis Reveal Structural and Electronic Transition State Features for RhoA-Catalyzed GTP Hydrolysis," Angew. Chem. Int. Ed., 2016, 55, 3318-22.
5. Jin Y, Molt Jr RW, Pellegrini E, Cliff MJ, Bowler MW, Richards NG, Blackburn GM, Waltho JP, "Assessing the Influence of Mutation on GTPase Transition States using X-ray, 19F NMR, and DFT Approaches." Angew. Chem. Int. Ed., 2017, in press

ПЛЕНАРНЫЕ ЛЕКЦИИ

COMBINATORIAL APPROACHES TO STUDY BIODIVERSITY

Alexander Gabibov
M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

We developed several screening platforms to isolate different clones of biological species with different functionalities. We used microfluidic approaches for screening microbiota, biocatalytic clones, antibody diversity and specific chimeric antigen receptors (CARs). We report the development of a novel platform to significantly enhance the efficacy and safety of Follicular lymphoma treatment. Since lymphoma is a clonal malignancy of a diversity system every tumor has a different antibody on its cell surface. Combinatorial autocrine-based selection is used to rapidly identify specific ligands for these B cell receptors on the surface of FL tumor cells. The selected ligands are used in a CAR-T format for redirection of human CTLs. Essentially, the format is the inverse of the

usual CAR-T protocol. Instead of being a guide molecule, the antibody itself is the target. Thus, these studies raise the possibility of personalized treatment of lymphomas utilizing a private antibody binding ligand that can be obtained in less than three weeks.

Ultrahigh-throughput screening (uHTS) techniques can identify unique functionality from millions of variants. To mimic the natural selection mechanisms that occur by compartmentalization in vivo, we developed a technique based on single-cell encapsulation in droplets of a monodisperse microfluidic double water-in-oil-in-water emulsion (MDE). Biocompatible MDE enables in-droplet cultivation of different living species. The combination of droplet-generating machinery with FACS followed by next-generation sequencing and liquid chromatography-mass spectrometry analysis of the secretomes of encapsulated organisms yielded detailed genotype/phenotype descriptions. This platform was probed with uHTS for biocatalysts anchored to yeast with enrichment close to the theoretically calculated limit and cell-to-cell interactions. MDE-FACS allowed the identification of human butyrylcholinesterase mutants that undergo self-reactivation after inhibition by the organophosphorus agent paraoxon. The versatility of the platform allowed the identification of bacteria, including slow-growing oral microbiota species that suppress the growth of a common pathogen, Staphylococcus aureus, and predicted which genera were associated with inhibitory activity.

We developed a novel platform for maturation of antibody molecule in silica. In vitro selection of antibodies from large repertoires of immunoglobulin (Ig) combining sites using combinatorial libraries is a powerful tool, with great potential for generating in vivo scavengers for toxins. However, addition of a maturation function is necessary to enable these selected antibodies to more closely mimic the full mammalian immune response. We approached this goal using quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations to achieve maturation in silico. We preselected Ig template, from a naïve library for its ability to disarm a toxic pesticide related to organophosphorus nerve agents. Virtual screening of 167,538 robotically generated mutants identified an optimum single point mutation, which experimentally boosted wild-type Ig scavenger performance by 170-fold. We validated the QM/MM predictions via kinetic analysis and crystal structures of mutant apo-A17 and covalently modified Ig, thereby identifying the displacement of one water molecule by an arginine as delivering this catalysis.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ РАКА

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

Точная диагностика молекулярных мишеней патогенных клеток и адресное воздействие на них должны обеспечивать высокую селективность противоопухолевой терапии. Этим задачам отвечает новая дисциплина – тераностика (терапия+диагностика), которая объединяет диагностику заболевания и персонифицированное лечение пациента с улучшенной эффективностью и безопасностью. При этом особое внимание уделяется оптимизации физиологических характеристик создаваемых конструкций с целью увеличения времени циркуляции в кровяном русле, минимизации нежелательного накопления в почках, печени и других органах.

В докладе суммированы результаты последних работ лаборатории по конструированию агентов для визуализации и уничтожения раковых клеток [1-8].

Разработанные подходы позволяют осуществлять рациональный дизайн терапевтических и диагностических агентов с заранее заданными свойствами, регулируя их размер, поверхностный заряд, гидрофобность и тем самым оптимизировать их поведение в организме. Полученные мультифункциональные конструкции обладают совокупностью свойств, которые трудно или нельзя использовать по отдельности. Такое комбинированное воздействие на опухоли позволяет реализовать принцип, когда «целое есть больше, чем сумма составляющих его частей». *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-24-00106-п.*

Литература

1. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., et al. Russ. Chem. Rev. 2015. 84 (1), 1–26.
2. Guller A.E., Grebenyuk P.N., Shekhter A.B., et al. Acta Naturae. 2016. 8(3), 44-58.
3. Shipunova V.O., Nikitin M.P., Nikitin P.I., et al. Nanoscale. 2016, 8(25), 12764-12772.
4. Schulga A.A., Mechev P.V., Kirpichnikov M.P., et al. Biochimie. 2016. 128-129, 148-153.
5. Grebenik E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. Russ. Chem. Rev. 2016, 85, 1277–1296.
6. Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., et al.. J. Control Release. 2016, 233, 48-56.
7. Khaydukov E.V., Mironova K.E., Semchishen V.A., et al. Sci. Rep. 2016, 6, 35103.
8. Souslova E.A., Mironova K.E., Deyev S.M. J. Biophotonics. 2017. 10(3), 338-352.

РАСПУТЫВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У МИКРООРГАНИЗМОВ С РЕДУЦИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ. РАЛЛИ ПРОДОЛЖАЕТСЯ…

В.М. Говорун
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Бактерии класса Mollicutes имеют чрезвычайно редуцированный геномы, но способны к саморепликации на искусственных средах. Молликуты и, в частности, микоплазмы широко изучаются как объекты для системной биологии, включая синтез искусственного генома [C. Venter et al., Nature, 531, 557–558, 2016]. Считается, что микоплазмы, как наиболее редуцированная группа Mollicutes, имеют минимальные системы контроля экспрессии генов наряду с общим уменьшением генома.

Ряд исследований, направленных на изучение изменений экспрессии генов в микоплазмах, привел к противоречивым выводам. С одной стороны, микоплазмы демонстрируют значительный транскрипционный ответ с точки зрения числа задействованных генов. С другой стороны, абсолютные транскрипционные изменения относительно малы и изменения белков, за некоторыми исключениями, незначительны. Для выявления адаптационной стратегии и основной регуляторной сети микоплазм мы провели комбинацию -омиксных исследований с использованием методов биоинформатики.

Мы определили, что большая часть транскрипционных изменений под воздействием сублетальных стрессовых условий представляет собой шум. Хотя этот шум возникает на уровне транскрипции, рибосома не позволяет ему далее распространяться на уровень трансляции. В наших исследованиях было показано, что существует «рибосомный фильтр», который, в конечном счете, позволяет транслироваться только тем белкам, которые способствуют адаптивным изменениям. Далее мы сосредоточились на поиске новых механизмов регуляции транскрипции, а также поиске более физиологических моделей искусственного сдвига для микоплазмы.

Мы использовали карту точек инициации транскрипции (TSS) и анализ межвидовой консервативности промоторов и оперонов для реконструкции транскрипционных сетей консервативных регуляторов. Мы пришли к выводу, что консервативная часть транскрипционных факторов в основном участвует в регуляции метаболических путей. Уменьшение последнего приводит к редукции консервативных регуляторов в микоплазмах по сравнению с другими Молликутами. Некоторые из высококонсервативных регуляторов участвуют в контроле клеточного цикла и белков-шаперонов. В то же время мы выявили наличие значительного слоя транскрипционной регуляции, опосредованной неизвестными механизмами. Эксперименты с использованием искусственных генетических конструкций подтвердили это открытие.

В настоящее время мы можем утверждать, что регуляция экспрессии генов в микоплазмах более развита, чем предполагалось ранее, но опирается на неизвестные механизмы и менее консервативна. Мы предположили, что модели стрессовых условий *in vitro*, которые были использованы до сих пор, плохо соответствуют физиологии микоплазм. Внутриклеточная среда, которая представляет собой естественную среду обитания микоплазм, характеризуется сложностью с точки зрения взаимодействия «хозяин–микоплазма». Адаптационный ответ достигается при воздействии многих факторов, действующих одновременно и с определенными динамическими параметрами.

Для дальнейших исследований мы использовали модель внутриклеточного культивирования микоплазмы. В отличие от состояния *in vitro*, в данной модели микоплазма претерпевает сильные изменения на уровне белков. Мы обнаружили, что эти изменения сохраняются при длительном культивировании в условиях *in vitro* после внутриклеточной инфекции. Используя генетические инструменты, мы определили несколько ключевых белков, которые участвуют в регуляции перехода к внутриклеточной инфекции. Таким образом, было показано, что в физиологических условиях микоплазма демонстрирует сильную способность к регуляции и адаптации. Протеом микоплазмы способен формировать стабильные самоподдерживающиеся состояния.

TONIC $GABA_A$ CONDUCTANCES BIDIRECTIONALLY REGULATE NEURONAL EXCITABILITY AND BRAIN RHYTHMS

Alexey Semyanov
M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow; University of Nizhny Novgorod, Russia

$GABA_A$ receptors mediate two forms of signaling in the brain: phasic and tonic. Phasic signaling (*e.g.*, IPSCs) is mediated by synaptic $GABA_A$ receptors, while tonic signaling (*e.g.*, tonic conductances) is mediated by extrasynaptic $GABA_A$ receptors. Tonic $GABA_A$ conductances are commonly named as tonic inhibition. Two main mechanisms for inhibition have been proposed: hyperpolarization and shunting. Shunting results from increased membrane conductance and it reduces the neuron-firing probability. We found that ambient GABA can actually excite adult hippocampal interneurons. In these cells, the $GABA_A$ reversal potential is depolarizing, making baseline tonic $GABA_A$ conductance excitatory. Increasing the tonic conductance enhances shunting-mediated inhibition, which eventually overpowers the excitation. Because hippocampal interneurons are the key to setting the network rhythms this mechanism allows bidirectional control of network synchronization by tonic $GABA_A$ receptor-mediated signaling. Our findings thus challenge the current dogma which postulates a monotonic effect of tonic $GABA_A$ conductance on the brain rhythmic activity.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ С ПОМОЩЬЮ ОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКИ

К.А. Лукьянов, М.М. Перфилов, Н.Г. Божанова, Н.Г. Гурская, А.С. Мишин
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Специфическое флуоресцентное мечение целевых белков широко используется в современной молекулярной и клеточной биологии. Вместе с тем, существующие подходы с использованием ковалентно присоединенных флуоресцентных белков или красителей имеют определенные ограничения по таким параметрам как фотостабильность сигнала, плотность мечения целевых молекул, скорость появления флуоресценции. В данной работе мы предлагаем методы на основе обратимого связывания флуоресцентной молекулы с целевым белком.

Первый подход основан на обратимой гетеродимеризации искусственных альфа-спиралей (K/E-спиралей), одна из которых присоединена к целевому белку, а вторая – к флуоресцентному белку. Коэкспрессия таких белков в клетке приводит к их ассоциации. Были подобраны пары K/E-спиралей, обеспечивающих, с одной стороны, выраженную колокализацию флуоресцентного и целевого белков, а с другой – быстрый обмен флуоресцентного белка в данном комплексе. К преимуществам метода можно отнести небольшой размер белкового тага (21 аминокислотный остаток) на целевом белке, а также повышенную фотостабильность сигнала в условиях облучения небольшой области клетки, например, при высокоразрешающей конфокальной микроскопии выбранного участка ядра или цитоплазмы.

Второй подход основан на специфическом связывании флуорогенного красителя с мутантными вариантами липокалина бактерий. Флуорогенный краситель, добавленный в клеточную среду, быстро проникает в живые клетки и обратимо связывается в белковом кармане липокалина. Связывание приводит к многократному усилению квантового выхода флуоресценции, благодаря чему достигается визуализация внутриклеточной локализации целевого белка, слитого с липокалином. Быстрый обмен молекул красителя между клеткой и средой приводит к высокой фотостабильности сигнала. Мечение с низкими концентрациями красителя позволяет реконструировать изображения со сверхвысоким разрешением на основе детекции одиночных молекул. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-10364).*

ОТКРЫТИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО МЕДЬ-СОДЕРЖАЩЕГО ФЕРМЕНТА – *ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ*

В.О. Попов
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Тиоцианат, SCN^-, относится к классу C1 соединений и образуется в природе в процессе детоксикации цианидов, которые используются в ряде масштабных промышленных процессов. Некоторые хемоаутотрофные сероокисляющие бактерии, обитающие в содовых озерах, могут расти на тиоцианате как единственном источнике углерода и азота. Можно представить себе несколько путей первичной утилизации SCN^- микроорганизмами, включая гидролитический разрыв нитрильной связи

или связи C-S, а также окислительные реакции. Только первый из перечисленных процессов, дающий карбонилсульфид и аммиак, был подтвержден экспериментально к настоящему времени.

В данной работе мы впервые описываем химическую реакцию, приводящую к прямому образованию из тиоцианата цианата и элементарной серы, и характеризуем новый, ранее не известный медь-содержащий фермент из галоалкалифильной бактерии рода Thioalkalivibrio, ответственный за данное каталитической превращение – тиоцианатдегидрогеназу (предполагаемый EC 1.8.2.5). Впервые выделенный нами фермент обладает уникальным, ранее не описанным активным центром, содержащим три иона меди, два из которых могут быть замещены ионами других переходных металлов с сохранением каталитической активности (Cu>Ni>Co). Основываясь на моделях структуры тиоцианатдегидрогеназы, полученных с высоким разрешением (до 1.45 Å), и QM/MM моделировании процессов, протекающих в активном центре фермента, нами предложен молекулярный механизм действия, который подтвержден результатами направленного мутагенеза. Гены белков, гомологичных тиоцианатдегидрогеназе, были обнаружены в бактериальных геномах различных родов и классов, в том числе у тех организмах, для которых утилизация тиоцианата ранее показана не была. Все они содержат характеристический консервативный мотив, включающий 11 аминокислотных остатков, которые принимают участие в координации ионов меди в активном центре, кислотно-основном катализе и формировании субстратного канала. Наши исследования расширяют познания в области медь-содержащих ферментов и описывают новый каталитический механизм, обеспечивающий эффективное окисление C1-серосодержащих соединений.

EMERGENCE OF CATALYTIC BIOSCAVENGERS FOR TREATMENT OF ORGANOPHOSPHORUS POISONING

Patrick Masson
Kazan Federal University, Neuropharmacology Laboratory, Kazan, Russia

After more than 70 years of research, the therapy of poisoning by organophosphate (OP) pesticides and nerve agents (NAs) is still imperfect. Bioscavengers are an appealing alternative approach to pharmacological drugs for improving pre- and post-exposure current medical counter-measures against OP poisoning [1]. Bioscavengers against OPs are enzymes, target proteins or antibodies that specifically react with OPs. The toxic molecules are neutralized in the bloodstream before they reach physiological targets. Neutralization has to be fast to impair the deleterious actions of OPs: irreversible inhibition of acetylcholinesterase in peripheral and central nervous system, and binding on non-cholinergic targets. As biopharmaceuticals, they can be administered by injection or inhalation. In the future, *in vivo* biosynthesis via gene-delivery vectors will be possible. Their clearance from blood must be slow. In addition, they must be immuno-compatible and do not cause iatrogenic side effects. Ideally, association of several bioscavengers can be used for prophylaxis and post-exposure treatment against all types of OPs. Fieldable bioscavengers for use in the military or under emergency situations have to be produced at low cost and must be stable on storage.

First generation bioscavengers are stoichiometric bioscavengers. These are serine enzymes that are irreversibly phosphylated by OPs. Among them, human butyrylcholinesterase (BChE) has proven to be safe and effective in challenging multiple LD_{50} of NAs (2). However, stoichiometric neutralization of OP lethal doses needs administration of huge amounts (>200 mg/70kg) of these extremely expensive biopharmaceuticals. Thus, the use of stoichiometric bioscavengers, even for protection of first responders, is unrealistic under current biopharmaceutical technology. Yet, considerable efforts have been made to develop new methods for mass production of plasma-derived [2] and recombinant human BChE [3].

Second generation bioscavengers are catalytic bioscavengers, displaying an OP degrading activity. Unlike stoichiometric bioscavengers, they are capable of detoxifying OPs under first-order conditions with a turnover [4]. Then, by virtue of high bimolecular rate constant ($k_{cat}/K_m > 10^6$ $M^{-1}min^{-1}$), low enzyme doses are needed for rapid detoxification of OPs in the bloodstream. The most advanced catalytic bioscavengers are evolved phosphotriesterases (stable muteins of enzymes from bacteria, archaea, and mammalian paraoxonase-1). These evolved enzymes display enantiomeric preference for the most toxic NA stereoisomers, and confer *in vivo* protection against OP pesticides and NAs, including V agents [5]. Engineering of other OP-reacting enzymes: prolidases, cholinesterases, carboxylesterases, oxidases and catalytic antibodies is actively pursued [1, 4]. Research of novel enzymes is based on computer re-design of known OP-reacting enzymes, implementation of combinational strategies for mutagenesis/evolution, and high throughput screening of libraries of mutated/evolved enzymes. A new computational strategy based on mining structural databases and molecular modeling has led to discovery of unexpected OP-hydrolyzing enzymes [6]. Lastly, highly stable thermophilic phosphotriesterases have been discovered in screening extreme biotopes [7].

Association of cholinesterase mutants - not susceptible to “age” after phosphylation - with fast-reactivating oximes leads to pseudo-catalytic bioscavengers [1, 4]. Lastly, artificial enzymes, e.g. functionalized β-cyclodextrins and hybrid molecules bearing nucleophile groups, are also promising. Certain small molecules have proven their effectiveness in detoxifying NAs at high rate both *in vitro* and *in vivo* [1]. Chemical modifications [8] and/or encapsulation into nanoparticles make long-lasting bioscavengers in the bloodstream, prevent immune response of non-human enzymes, and are template for future detoxification nanobioreactors.

In the near future, catalytic bioscavengers are expected to greatly improve treatments of OP poisoning in terms of efficacy, safety and cost. Nano-medicine technologies will make implementation of bioscavengers easier against large spectrum of agents. Transient *in vivo* generation of catalytic bioscavengers, using short-induction vectors, is promising. However, the way for safe and effective gene therapy is still long.

References

1. Masson, P and Nachon, F. (2017) *J. Neurochem*. In press (PMID:28542985).
2. Lockridge, O. (2015) *Pharmacol. Ther*., 148, 34-36.
3. Terekhov SS, Smirnov IV, Stepanova AV, Bobik TV,Mokrushina YA, Ponomarenko NA, Belogurov AA, Rubtsova MP, Kartseva OV, Gomzikova MO, Moskovtsev AA, Bukatin AS, Dubina MV, Kostryukova ES, Babenko VV, Vakhitova MT, Manolov AI, Malakhova MV, Kornienko MA, Tyakht AV, Vanyushkina AA, Ilina EN, Masson P, Gabibov AG and Altman S. A. (2017) *PNAS*, 114, 2550-2555.
4. Masson, P. and Luschekina, SV. (2016) *Chem-Biol. Interact*., 259 (part B), 319-326.
5. Wille T, Neumaier K, Koller M, Ehinger C, Aggarwal N, Ashani Y, Goldsmith M, Sussman JL, Tawfik DS, Thiermann H and Worek F (2016) *Toxicol. Lett*. **25**,198-206.
6. Jacobs, RB, Michaels, KC, Anderson CJ, Fay, JM. and Dokholyan, NV. (2016) *Sci. Reports*, 6, e37175.
7. Jacquet P, Daudé D, Bzdrenga J, Masson P, Elias M and Chabrière E. (2016) *Environ Sci Pollut Res Int.* **23**, 8200-8218.
8. Terekhov SS, Smirnov IV, Shamborant OG, Bobik TV, Ilyushin DG, Murashev AN, Dyachenko IA, Palikov VA, Knorre VD, Belogurov AA, Ponomarenko NA, Kuzina ES, Genkin DD, Masson P and Gabibov, AG. (2015) *Acta Naturae*, 7, 136-141.

BRIDGING POLYPHENOLS AND SUGARS TOWARDS NEW APPROACHES FOR THE PREVENTION OF ALZHEIMER'S DISEASE AND DIABETES TREATMENT

Amélia P. Rauter
Centro de Química Ed C8, Piso 5, Lisboa, Portugal

Type 2 diabetes (T2D) affects over 400 million people worldwide. There is also growing evidence for a shared pathophysiology between T2D and Alzheimer's disease (AD), the most prevalent form of dementia, that leads to memory loss, cognitive decline and ultimately to death. Indeed, discovery of new antidiabetic drugs with new mechanisms of action remains a challenge to overcome issues related to drug safety, tolerability, and side effects, and to target the prevention of AD in T2D patients.

This presentation provides an overview of our efforts in this direction, starting from a medicinal plant traditionally used against diabetes. The identification of the plant active principle as a C-glucosyl polyphenol encouraged the generation of a library of C-glucosyl polyphenols exhibiting a diversity of structures. Their chemistry, antidiabetic mechanisms of action, ability to interact with amyloid peptides and ultimately the role of the glycone to prevent PAINS (pan assay interference compound) were discussed. This multidisciplinary approach covering phytochemistry, organic synthesis, NMR guided approaches for interaction studies, computational science, biology, biochemistry, and biophysics also illustrates the science of todaytowards the technology of tomorrow in medicinal glycochemistry.

Acknowledgements: The European Union is gratefully acknowledged for the support of the project "Diagnostic and Drug Discovery Initiative for Alzheimer's Disease" (D3i4AD), Industry-Academia Partnerships and Pathways (IAPP), FP7-PEOPLE-2013-IAPP, GA 612347.

АРХИТЕКТУРНЫЕ БЕЛКИ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ BITHORAX КОМПЛЕКСА ДРОЗОФИЛЫ

П.Г. Георгиев, О.В. Кырчанова, О.Г. Максименко, Н.А. Золотарев, Н.Е. Постика, А.Н. Бончук, А.А. Федотова, В.А. Могила, М.С. Сабиров
Институт биологии гена РАН, Москва

В настоящее время остаются нерешенными многие вопросы, связанные с регуляцией транскрипции генов, организацией структуры регуляторных элементов и механизмами дистанционных взаимодействий. В отличие от других классов хорошо изученных транскрипционных факторов (ТФ), некоторые C_2H_2-белки специфично связываются с длинными последовательностями ДНК, достигающими несколько десятков п.н. C_2H_2-белки могут эффективно связываться с ДНК как мономеры, что является нехарактерным для большинства других ТФ, которые связываются с короткими палиндромами как гомо- или гетеродимеры. К таким C_2H_2 белкам относятся хорошо исследованные инсуляторные белки: консервативный у всех высших эукариот белок CTCF и распространенный у двукрылых белок Su(Hw). На примере модельного локуса Bithorax комплекса *Drosophila melanogaster* будут представлены экспериментальные результаты, которые демонстрируют кооперативную роль C_2H_2-белков в формировании регуляторных доменов и поддержание специфичных дистанционных взаимодействий.

FROM SINGLE PEPTIDE-MHC TO PEPTIDE-MHC CLUSTERS

Yuri Sykulev
Departments of Microbiology and Immunology and Medical Oncology, The Sidney Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107, USA

Analysis of the dependence of peptide-MHC (pMHC) density upon TCR affinity showed that at the affinity below 1 μM the epitope density becomes insensitive to variations in TCR affinity. This suggests that at a very low level of stimulatory pMHC ligands, the TCR affinity reaches its physiological limit termed an "affinity ceiling". This also raised a question about how low the epitope density on target cells could still be sufficient to trigger CTL response. Answering this question led us to a milestone discovery demonstrating that even a single agonist pMHC ligand displayed on the surface of live target cells could elicit CTL response and target cell destruction. We have then shown that the remarkable sensitivity of CTL responses is facilitated by non-stimulatory, i.e. "self" pMHC proteins that are abundant on the cell surface. Close proximity of stimulatory and self pMHC ligands assembled on fluorescent nanoparticles, allowed us to demonstrate that "foreign" and "self" ligands cooperate augmenting CTL responses. These data led us to propose that signaling from a few TCR bound to stimulatory ligands could be spread to many other TCR, explaining the remarkable ability of CTL to respond to minute amounts of agonist pMHC on virally infected cells.

Close proximity between pMHC proteins at the cell surface is achieved through formation of nano-scale clusters. To evaluate the effect of pMHC clustering, we utilized nanolipoprotein particles containing functional nickel-chelating lipids allowing capturing and displaying His6-tagged pMHC ligands at various densities. Using these nano-scale discoidal membrane mimetics, we examine how the density and nature of pMHC ligands influence the binding parameters of the model membrane clusters to the surface of live CTL and triggering of TCR signaling. We have found that the density of pMHC within model membrane clusters regulates the contribution of CD8-MHC and T-cell receptor-pMHC interactions, and that the balance between T-cell receptor and CD8 co-receptor engagement determines the quality of antigen recognition and the induced T cell response.

КОМПЛЕКСНЫЕ СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АССОЦИАЦИИ МЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ ТИПА I

А.С. Арсеньев, Э.В. Бочаров, К.С. Минеев, Д.М. Лесовой, К.Д. Надеждин, С.А. Гончарук, О.В. Бочарова, А.В. Феофанов, Г.В. Шаронов, Р.Г. Ефремов, П.Е. Волынский, А.А. Полянский
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Рецепторы с одним трансмембранным сегментом в виде α-спирали (рецепторы типа I или битопные рецепторы) составляют половину от общего числа α-спиральных интегральных мембранных белков. Многие из них являются сигнальными рецепторами (например, рецепторные протеинкиназы и иммунорецепторы), которые обеспечивают передачу внешнего биохимического сигнала через плазматическую мембрану и запускают в цитоплазме клетки каскады сигнальных путей, опосредуя разнообразные клеточные процессы в организме человека. Передача сигнала рецепторами типа I как правило сопровождается конформационными перестройками и димеризацией всех доменов, включая α-спиральные трансмембранные домены

(ТМД). Для исследования пространственной структуры и функциональной димеризации ТМД рецепторов типа I (в том числе ErbB, EphA, VEGFR, FGFR, p75NTR, APP, Toll-like рецепторов) мы разработали комплексный подход, использующий передовые методики белковой инженерии, ЯМР спектроскопии, оптической спектроскопии и молекулярного моделирования. На основе разработанных бактериальной и бесклеточной систем экспрессии получены обогащенные изотопами 15N и 13C образцы рекомбинантных ТМД в количествах, достаточных для экспериментальных исследований. С помощью гетероядерной спектроскопии ЯМР получены структурно-динамические данные о функциональной димеризации ТМД, солюбилизированных в детергентных мицеллах и липидных бицеллах, имитирующих мембранное окружение 40-50 кДа супрамолекулярных комплексов. Для детализации белок-белок и белок-липид взаимодействий с помощью молекулярной динамики результирующие пространственные ЯМР структуры ТМД помещали в явно заданные липидные бислои различного состава. Анализ результатов исследований позволил построить молекулярные модели активации рецепторов типа I из различных биологических систем в норме и при патологиях организма человека. С помощью мутагенеза принципы функционирования ряда исследуемых рецепторов типа I были верифицированы на модельных клеточных линиях. Понимание сложных механизмов сигнальных процессов будет способствовать успеху в поиске новых возможностей влияния на биологические функции рецепторов типа I с перспективным терапевтическим значением. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 14-50-00131).*

НОВЫЕ АСПЕКТЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ ТЕЛОМЕРАЗЫ

А. Малявко[1], О. Петрова[1], М. Зверева[1], Е. Родина[1], А. Манцызов[1], В. Польшаков[1], Ю. Нарайкина[1], Д. Василькова[1], М. Рубцова[1], А. Белецкий[2], Н. Равин[2], И. Бутенко[3], О. Побегуц[3], В. Говорун[3], О. Донцова[1,4]
[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; [2]Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [3]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [4]Сколковский институт науки и технологии, Россия

Теломераза – ключевой компонент системы поддержания длины теломер. Используя дрожжевую модельную систему мы обнаружили новый способ контроля длины теломер теломеразным комплексом. Дальнейшие исследования позволили нам выявить особенности регуляции длины теломер специфическими теломер-связывающими белками. Структура N-концевого домена теломеразной обратной транскриптазы и особенности его взаимодействия с нуклеиновыми кислотами определены методом ЯМР.

У млекопитающих теломераза активируется при раковой трансформации клеток. Теломеразная РНК осуществляет в клетках альтернативные функции, не связанные с функционированием теломеразы. Данные о новой роли теломеразной РНК в клетках млекопитающих будут представлены.

Теломеразная РНК – один из коровых компонентов теломеразного комплекса. Нарушения в биогенезе теломеразной РНК приводят к развитию заболеваний с фенотипом старения в результате сниженного клоногенного потенциала стволовых клеток. Новые аспекты процессинга теломеразной РНК человека будут представлены. *Работа поддержана РНФ проект [16-14-10047] и РФФИ проекты [17-04-00948 А],[17-04-01692 А], [15-54-74005 ЕМБЛ_а].*

MOLECULAR STRATEGIES FOR DRUG DISCOVERY FROM THE DIVERSITY OF LIBRARIES

Bérangère Avalle, Rita Maalouf, Nancy Chaaya, Séverine Padiolleau-Lefèvre, Alain Friboulet
Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, CNRS Enzyme and Cell Engineering Laboratory, Compiègne Cedex, France

Libraries of biomolecules are reservoirs of active compounds. The construction of protein-, peptide- and nucleic acid libraries turned out to be an effective tool for the selection of new biomolecule-based drugs.

Recent results on the selection of biomolecule potential drugs will be presented with a focus on compounds displaying affinity to STAT5a/b proteins and regulating the survival of cells dependent on the activation of STAT5a/b.

STAT5 is a member of the Signal Transducer and Activators of Transcription (STAT), comprising two proteins (STAT5a and STAT5b). STAT5a and STAT5B were found to play a key role in haematopoiesis. They are activated by phosphorylation in response to a broad spectrum of stimulating cytokines interacting with membrane-plugged receptors. They dimerize and translocate to the nucleus to promote the transcription of anti-apoptotic and/or proliferative genes. STAT5a/b proteins can then be considered as the pivot of the self-renewal and proliferation of haematopoietic stem cells. Disruptions may occur when STAT5a/b are constitutively activated in the absence of extracellular signals. They inappropriately activate the transcription of target genes, leading to leukemia and solid tumors. STAT5a/b were thus demonstrated to be involved in some immune system cancers, especially in Chronic Myeloid Leukemia (CML). They hence constitute a prime target to therapeutic intervention.

ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ

В. Власов, М. Зенкова, Д. Пышный, Д. Стеценко
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Развитие методов синтеза аналогов нуклеиновых кислот и конъюгатов олигонуклеотидов, разработка технологий молекулярной селекции и открытие системы CRISPR – Cas9 создали возможности конструирования разнообразных диагностических систем и разработки интеллектуальных препаратов ген-направленного действия, способных подавлять функции целевых генов, корректировать генетические программы и регулировать функции определенных белков.

Нуклеазоустойчивые аналоги олигонуклеотидов, образующие комплементарные комплексы повышенной прочности нашли применение в качестве элементов эффективных аналитических биочипов. Разработка комплементарно-адресованных реакционноспособных олигонуклеотидных зондов позволила конструировать высокочувствительные системы детекции нуклеиновых кислот. Несколько антисмысловых олигонуклеотидов, корректирующих процессы сплайсинга и подавляющих трансляцию специфических мРНК, разрешены для применения в клинике. Аптамеры, связывающие определенные белки, оказались перспективными терапевтическими препаратами, другим применением аптамеров является доставка препаратов к определенным клеткам-мишеням. Целый ряд препаратов на основе малых интерферирующих РНК проходят клинические испытания. Показано, что присоединение к олигонуклеотидам пептидов, проникающих в бактериальные клетки, позволяет получать конъюгаты, перспективные как потенциальные препараты для борьбы с антибиотикоустойчивыми патогенами. Системы генетического редактирования на основе CRISPR – Cas9 могут служить инструментами для целого ряда терапевти-

ческих применений, таких как коррекция генетических дефектов, введение новых программ в клеточный геном и инактивация вирусных геномов, присутствующих генетических программах клетки.

Разработка эффективных методов доставки нуклеиновых кислот и конъюгатов в клетки откроет возможности создания широкого спектра препаратов необходимых для развития медицины будущего.

ОТ ЛИНЕЙНЫХ И ЦИКЛИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ И НЕЙРОТОКСИНОВ К СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИЯМ НЕЙРОРЕЦЕПТОРОВ

В.И. Цетлин
Отдел молекулярных основ нейросигнализации, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Доклад посвящен юбилею акад. Вадима Тихоновича Иванова, под руководством которого автор защитил кандидатскую диссертации, затем прошел путь, указанный в заголовке доклада, а сейчас руководит отделом, где работают прекрасные молодые сотрудники, а заведуют лабораториями ученики автора доклада, имеющие докторские степени и профессорское звание. Синтез линейных пептидов (1970) оказался полезным при создании кривой Быстрова–Карплюса, сыгравшей важную роль в установлении пространственной структуры пептидов и белков методом ЯМР. Для циклических пептидов, ранее рассматривавшихся как ингибиторы протеолитических ферментов, при варьировании размера цикла впервые были получены высокоэффективные субстраты (1975). С помощью химически модифицированных производных нейротоксина змеи впервые идентифицированы области их контакта с никотиновым ацетилхолиновым рецептором (нАХР), лиганд-управляемым ионным каналом (1979). Различные (мышечные и нейрональные) подтипы нАХР и сейчас являются главным рецепторным объектом Отдела. В 1987 г. разработанный в нашей стране метод тритиевой планиграфии был впервые применен к мембранному белку – бактериородопсину, светозависимому протонному каналу. В содружестве с проф. F. Hucho (ФРГ) разработаны новые варианты фотоаффинной модификации (1992) и установлено, что змеиный нейротоксин связывается между субъединицами нАХР на половине высоты экстрацеллюлярного домена (1995). Впервые показано, что мишенью «слабых токсинов» являются нАХР (2001); впервые в яде кобры открыт гликозилированный трехпетельный токсин (2004). Вместе с голландскими исследователями (Profs. A. Smit, T. Sixma), открывшими ацетилхолин-связывающий белок (АХБ), показана его способность связывать α-конотоксины (нейротоксические пептиды из ядовитых моллюсков Conus) и установлена кристаллическая структура комплекса – первая в комплексе с биологической мишенью для громадного семейства конопептидов (2005). В протеомных исследованиях открыта димерная форма α-кобратоксина (2008) и для нее совместно с Prof. T. Sixma методом РСА установлен новый тип пространственной организации токсинов (20012). В яде гадюки открыт аземиопсин, новый тип ингибиторов мышечного нАХР (2012) и на его основе проведены предклинические испытания нового миорелаксанта (2016, 2017). Открыто ингибирование нАХР змеиными и панкреатической фосфолипазами А2 (2014). С использованием сочетания компьютерных подходов, радиолигандного анализа, электрофизиологии и кальциевого имиджинга удалось сконструировать и испытать синтетические аналоги α-конотоксина PnIA, имеющие высокое сродство к нейрональному α7 нАХР (2016). Впервые показано, что α-кобратоксин (классический блокатор нАХР) с высокой эффективностью способен блокировать и GABA-А рецептор (2015). При участии Prof. D. Bertrand (Швейцария), P. Bregestovskii (Франция) и Отдела биоинженерии ИБХ РАН установлено, что ws-Lynx1 (водорастворимая форма трехпетельного белка человека Lynx1) и rSLURP-1 (рекомбинантная форма секретируемого белка человека SLURP-1) с нейрональными нАХР связываются в аллостерических центрах (2011, 2013, 2016). В содружестве с Dr. T. Durek (Австралия) синтезирован SLURP-1, идентичный природному белку (81 аминокислотный остаток, 5 дисульфидов), для него показаны отличия в механизме действия от rSLURP-1 (несущего дополнительный Met0) и открыто действие на α9/α10 нАХР, являющийся мишенью анальгетиков. В настоящее время значительно расширяются функциональные исследования и показана роль холинергической системы в развитии мигрени (2017).

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

NOVEL CYTOKINES, AUGMENTOR A AND B, REGULATE FUNCTIONS OF NEURONAL CELLS BY ACTIVATING RECEPTOR TYROSINE KINASES ALK AND LTK

Andrey Reshetnyak
Yale School of Medicine, New Heaven, USA

Receptor tyrosine kinases (RTKs) are cell surface receptors that serve as signaling molecules for growth factors, cytokines, and hormones. Recently we discovered that a novel cytokine, Augmentor α (also named FAM150B or ALKL2), stimulates robust autophosphorylation of Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK), which before was known as an “orphan” RTK with oncogenic potential. Related Augmentor β (FAM150A or ALKL1) was previously established as activating ligand of Leukocyte Tyrosine Kinase receptor (LTK). We established robust procedure to produce Augmentor-α and Augmentor β and performed detailed biophysical and biochemical characterization of receptor:ligand interactions. We carried out detailed structure-functional analysis of Augmentor-α. We also employed zebrafish as a model system to explore the physiological function and to characterize *in vivo* links between Alk and Ltk with their ligands. Our experiments reveal the hierarchy and specificity of two new cytokines as ligands for ALK and LTK and set the stage for elucidating their roles in development and in pathologies such as cancer.

МЕХАНИЗМ УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМОГО ПРОТЕОЛИЗА ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ПРОТЕАСОМОЙ И ЕГО СВЯЗЬ С РАЗВИТИЕМ АУТОИММУННОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

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

Протеасома узнает абсолютное большинство субстратов только в виде конъюгата с молекулой убиквитина, который в свою очередь представляет собой универсальный сигнал деградации. Гидролиз белков в отсутствии убиквитина объясняется существованием двух типов прямого протеасомного сигнала (direct proteasome signals, DPS) – специфической аминокислотной последовательности или пост-трансляционной модификации, которые распознаются регуляторными субъединицами протеасомы. Исторически первый тип сигнала был обнаружен в последовательности орнитиндекарбоксилазы, в то время как ацетилирование коровых гистонов было недавно показано в качестве второго типа DPS. В настоящей работе мы продемонстрировали существование третьего типа DPS, который является заряд-опосредованным. Подобный сигнал протеасомной деградации, изначально обнаруженный в аутоантигене, ассоциированном с рассеянным склерозом, – основном белке миелина – был воссоздан в виде основных элементарных автономных дегронов (Basic Elementary Autonomous Degrons, BEADs). Было показано, что узнавание этого сигнала осуществляется регуляторными комплексами REGα или REGγ и является ATP-независимым. Регуляторные элементы класса REGα/β известны в качестве классических IFNγ-индуцибельных белков, напрямую ассоциированных с иммунопротеасомой, и вовлеченных в презентацию антигенов в условиях воспаления. Нам удалось продемонстрировать, что иммунопротеасомы из головного мозга мышей линии SJL с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) при гидролизе MBP генерируют повышенные количества пептидов, которые перенацеливают цитотоксические лимфоциты на олигодендроциты *ex vivo*. До десяти раз повышенное количество иммуногенных пептидов, образуемое при гидролизе MBP протеасомами из головного мозга мышей линии SJL с EAE, объясняется значительным увеличением количества иммунопротеасомы с каталитической субъединицей β1i в центральной нервной системе модельных животных. Таким образом, полученные данные в значительной степени расширяют знания о метаболизме миелина в патофизиологических условиях и свидетельствуют о том, что иммунопротеасомы, нагруженные REGα/β гептамерами, становятся машинами смерти, координирующими аутоиммунную атаку на миелиновую оболочку *ab intra*. *Работа была поддержана проектом РНФ № 14-14-00585*.

ВОСПОЛЬЗОВАТЬСЯ ИНСТРУМЕНТАРИЕМ ПРИРОДЫ: НЕЙРОТОКСИНЫ В РОЛИ «ХОРОШИХ ПАРНЕЙ»

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

Вместе с радионуклидами нейротоксины являются самыми смертоносными веществами, обнаруженными в природе. Типичные нейротоксины воздействуют на определенные белковые мишени в нервной системе или мышцах и вызывают их дисфункцию, а наблюдаемый токсический эффект связан с нарушением передачи нервного сигнала. Селективность нейротоксинов к их мишеням беспрецедентна и не сопоставима даже с селективностью антител. Ученые использовали эти фантастические свойства и превратили некоторые нейротоксины в высокоселективные метки нейрорецепторов и инструменты для тонкой регуляции активности нервной системы. По сути, смертоносные злодеи стали хорошими парнями. В докладе я попытаюсь проиллюстрировать современные подходы к применению нейротоксинов в нейронауках.

Существуют две основные тенденции. Одной из них является создание селективных инструментов для управления функцией определенных нейрорецепторов и ионных каналов или обнаружения их экспрессии. В последнее время нам повезло охарактеризовать селективные лиганды ряда хемовозбудимых и потенциал-чувствительных ионных каналов, в том числе пуринергических рецепторов, участвующих в восприятии боли, потенциал-чувствительных калиевых каналов, играющих ведущую роль в аутоиммунных заболеваниях, и потенциал-чувствительных натриевых каналов, важных участников развития мышечных расстройств. Мы смогли превратить эти лиганды в селективные зонды, способные детектировать экспрессию соответствующих мишеней в нервной или мышечной ткани. Другой тенденцией является поиск и разработка лекарств на основе нейротоксинов. Я кратко остановлюсь на вопросах, связанных с эпилепсией, воспалительной болью (например, при артрите или цистите), аутоиммунными заболеваниями (такими как рассеянный склероз) и редкими каналопатиями (такими как гипокалиемический периодический паралич). В каждом случае мы смогли идентифицировать высокоактивные вещества, влияющие на ионные каналы, которые участвуют в развитии заболевания и считаются важными фармакологическими мишенями.

LANDSCAPES OF T CELL RECEPTOR REPERTOIRES

M. Shugay[1-4], M. Izraelson[1,3,4], E.S. Egorov[1,3,4], N. Nakonechnaya[1,3,4], S. Kasackaya[1–3], O.V. Britanova[1,3,4], D.M. Chudakov[1-4]
[1] Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow; [2] Center for Data-Intensive Biomedicine and Biotechnology, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow; [3]Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow; [4]Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia

Individual repertoire of T cell receptors (TCR) is an individual “collection of keys” which adaptive immunity uses to select appropriate one(s) that would specifically recognize a cognate “lock” – a foreign peptide (or sometimes non-peptide) antigen presented in a context of the host major histocompatibility complex (MHC) (or MHC-like molecules) on the surface of antigen-presenting or infected/mutated cells.

The TCR repertoire is formed in thymus by semi-random combination of TCR gene segments, with random deletion and addition of nucleotides. This process initially produces enormous diversity of TCR beta chains, probably about 10^{10} in one individual and about 10^{13} in human population, that is further increased due to the pairing with also diverse set of TCR alpha chains.

However, this initial repertoire is shaped tightly first by positive and negative selection in thymus, and then on the periphery at the level of so called recent thymic emigrants. The resulting “landscape” of the antigen-recognizing surfaces of T cells TCRs determines the range of potentially recognizable antigens, depends strongly on the individual HLA context and thymic selection machinery, and differs prominently for the functional T cell subsets, even at the naïve T cells level. At least, the features of naïve Treg TCR repertoire differ dramatically from those of the naïve non-Treg CD4 T cells.

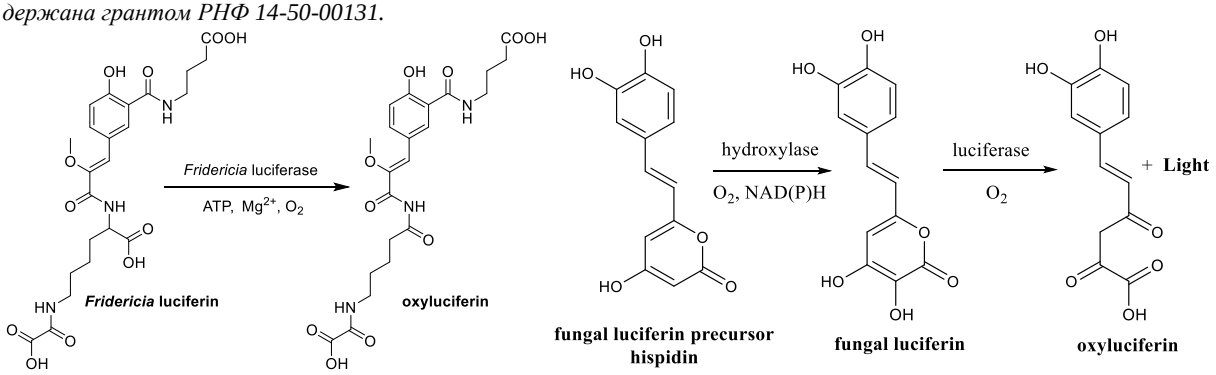
Importantly, there is a core of "public" (frequently met in humans) TCR variants that are often produced by recombination machinery, especially in the absence of terminal transferase (TdT, an enzyme that adds random nucleotides during recombination). This core forms semi-innate T cell immunity that includes but is not limited to iNKT, MAIT, and a portion of the semi-invariant gamma-delta T cells, and is actively generated during the pre-natal period.

The individual TCR landscape profoundly influences the ability of immune system to recognize new antigens, to fight cancer, and to provide balanced and appropriate immune responses. Nowadays, methods of high-throughput immune repertoires profiling and comparative bioinformatics post-analysis allow to study the features of TCR repertoire landscapes in detail. *Supported by Russian Foundation for Basic Research project №17-04-01994a.*

ХИМИЯ СВЕТА: ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ, ЛЮЦИФЕРИНЫ, ЛЮЦИФЕРАЗЫ

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

Биолюминесценция – излучение света живыми организмами – широко распространена в природе. По современной оценке, существует около 40 различных химических механизмов «холодного свечения». Излучение кванта света происходит в результате окисления молекулы органического субстрата – люциферина – при катализе ферментом – люциферазой. Среди высших грибов более 100 видов обладают способностью светиться в темноте. За последние годы международной команде исследователей под руководством докладчика удалось расшифровать структуры двух новых люциферинови выяснить механизмы их работы. В 2016 эта же группа установила последовательность и клонировала люциферазу грибов и ферменты биосинтеза люциферина. В докладе будут освещены работы по расшифровке строения люциферинов, механизмы излучения света, клонирование биолюминесцентных ферментов и раскрыты перспективы их практичского использования. *Работа поддержана грантом РНФ 14-50-00131.*



Литература

1. Petushkov et al. A novel type of luciferin from Siberian luminous earthworm Fridericia heliota: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 5566.
2. Dubinnyi et al. Novel mechanism of bioluminescence: oxidative decarboxylation outside of light-emitting moiety in luciferin from earthworm Fridericia heliota. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 7065.
3. Purtov et al. The chemical basis of fungal bioluminescence. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 8124.
4. Tsarkova et al. A Tale Of Two Luciferins: Fungal and Earthworm New Bioluminescent Systems. *Acc. Chem. Res.* 2016, 2372.
5. Kaskova et al. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chem. Soc. Rev.* 2016, 6048.
6. Kaskova et al, Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence, *Science Advances*, 2017, e1602847.
7. Kotlobay et al. The enzymatic basis of fungal bioluminescence, 2017, submitted

КОРОТКИЕ ОТКРЫТЫЕ РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ У РАСТЕНИЙ: ЭВОЛЮЦИЯ И АНАЛИЗ ПЕПТИД-КОДИРУЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА

И.А. Фесенко[1], И.В. Киров[1], А.Н. Князев[1], Р.А. Азаркина[1], А.С. Мамаева[1], В.Т. Иванов[1], В.М. Говорун[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Геномы всех живых организмов содержат сотни тысяч коротких открытых рамок считывания (<100 кодонов). Однако, алгоритмы аннотации геномов не приспособлены к работе с короткими рамками, поэтому они чаще всего отбрасываются как незначащие. Тем не менее, используя различные биоинформатические подходы, короткие открытые рамки считывания с высоким кодирующим потенциалом были идентифицированы у различных организмов. Недавние исследования показали, что пептиды, кодируемые короткими открытыми рамками считывания выполняют множество важных функций в клетке, среди которых регуляция эмбриогенеза у насекомых и рыб, участие в процессе образования азот-фиксирующих клубеньков у растений и ряд других. Несмотря на то, что некоторые короткие рамки были идентифицированы у растений, наши знания о их эволюции и функция скудны. Мы использовали модельный объект растительной биологии – мох *Physcomitrella patens*, для того, чтобы проследить эволюцию этих последовательностей и выявить их биологические функции.Мы обнаружили более 70 000 коротких рамок, локализованных на мРНК и длинных некодирующих РНК и транскрибирующихся в различных типах клеток мха. Используя протеомные и пептидомные подходы, мы обнаружили, что сотни из них транслируются. При этом, мы обнаружили, что пептид-кодирующий потенциал и эволюционная консервативность слабо коррелируют друг с другом. Мы предполагаем, что пептиды, кодируемые короткими открытыми рамками считывания могут использоваться растениями для глобальной регуляции протеома и адаптации. *Исследование было выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-14-01189).*

НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

И.В. Смирнов, Ю.А. Мокрушина, С.С. Терехов, А.В. Степанова, А.Г. Габибов
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Биокаталитическая функция – это одна из наиболее совершенных функций свойственных живым системам. Эта функция реализуется в ограниченном наборе биологических объектов, основная доля из которых приходится на белковые молекулы – ферменты и антитела. Биокаталитическая активность находит широкое применение в различных сферах современной промышленной и фармацевтической биотехнологии. «Ковалентный катализ» является одним из основных механизмов, определяющих свойства ферментов как наиболее эффективных эволюционно совершенных биокатализаторов. Такой тип катализа реализуется в широком спектре биокаталитических процессов, среди которых сигнальные киназные каскады и биохимические основы передачи нервного импульса. Таким образом, разработка способов создания биокатализаторов, способных к ковалентному катализу, является актуальной задачей не только фундаментальной энзимологии, где решение такой задачи позволит понять пути эволюционного развития биокаталитических функций, но и прикладной биохимии и молекулярной медицины. В представленной работе усовершенствована технология получения биокатализаторов на основе антител. Разработан универсальный метод *in silico* созревания антител, основанный только на знании механизма каталитической реакции, который и определяет дальнейший вектор поиска улучшений, таким образом, он может быть применим к биокатализаторам любой природы. Создана платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической активности в каплях двойной микрофлюидной эмульсии. Высокая селективность и чувствительность платформы позволили детектировать различные типы активности, а также дискриминировать уровни одинаковой активности. С использованием разработанной платформы были найдены новые каталитические антидоты на основе рчБуХЭ, способные к самореактивации при ингибировании пестицидом параоксон. Представленная в работе технология высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности может быть использована для поиска и новых ферментов без ограничения на механизм каталитической реакции. Метод является универсальным и может быть адаптирован для поиска других типов функциональной активности, например, антимикробной активности. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 14-50-00131.*

НИКОТИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ: ОТ ИССЛЕДОВАНИЙ *IN VITRO* ДО ФУНКЦИЙ В ОРГАНИЗМЕ

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

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) являются фармакологически важными мишенями, поскольку с нарушениями их функционирования связаны психические и нейродегенеративные заболеваниями, хроническая боль, сепсис, ревматоидный артрит и др. Особенно востребованы комплексные исследования, включающие поиск и дизайн холинергических лигандов, исследования молекулярной структуры и функционирования нАХР, а также выяснение их физиологических функций. Разработка и оптимизация цито- и гистохимической детекции и количественной оценки нАХР, а также быстрый анализ функционирования нАХР новым методом кальциевого имиджинга в сочетании с классическими методиками пептидного синтеза, радиолигандного анализа и электрофизиологии позволили нам охарактеризовать ряд новых синтетических и природных никотиновых лигандов и их механизмы связывания. Также была проанализирована роль нАХР в некоторых аспектах нейрогенеза во взрослом организме, нейропластичности, ноцицепции и воспаления. α7 нАХР участвуют в процессе нейрогенеза во взрослом организме, стимулируя созревание новообразованных гранулярных клеток в гиппокампе крысы. α7 и α4* нАХР также участвуют в нейрональных компенсаторных механизмах при моделировании ранних стадий болезни Паркинсона у мышей. В ноцицептивных чувствительных нервных волокнах представлен репертуар функциональных нАХР. Про-ноцицептивное действие нАХР было продемонстрировано в оболочках мозга, области возникновения боли при мигрени. α7, α3β2 или α6* нАХР регулируют специфические функции (продукцию активных форм кислорода и адгезию) нейтрофилов, наиболее оперативных клеток врожденного иммунитета. Среди новых никотиновых лигандов 6-бромогипафорин из морского голожаберного моллюска *Hermissenda crassicornis* был охарактеризован как специфический агонист α7 нАХР. Напротив, новые алкалоиды из яда кураре племени Matis, а также баптиды (7-10 аминокислотных остатков) из яда шумящей гадюки *Bitis arietans* ингибировали α7 и мышечный нАХР. Среди новых синтетических производных хинолина были обнаружены как агонисты, так и антагонисты нАХР. Фармакологический потенциал новых никотиновых лигандов иллюстрируется проводящимися доклиническими исследованиями синтетического полипептида аземиопсина (миорелаксанта), который ранее был выделен из яда бирманской гадюки *Azemiops feae*.

СЕССИЯ «ИОННЫЕ КАНАЛЫ И РЕЦЕПТОРЫ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ: СТРУКТУРА, ФИЗИОЛОГИЯ И БОЛЕЗНИ»

PHOTOPHARMACOLOGICAL MODULATION OF RECEPTORS AND ION CHANNELS

P. Bregestovski
Aix Marseille University, INSERM, Institute of System Neurosciences, Marseille, France; Department of Physiology, Kazan Medical State University, Kazan, Russia

Photopharmacology is a direction based on the creation of chemical compounds capable of controlling the functions of biological molecules possessing photosensitive switches. This approach is based on the ability of certain molecules (azobenzenes, spiropiranes, diarylethenes) to change their conformation upon illumination with the light of specific wavelength. Photochromic compounds that activate or inhibit the activity of key cellular proteins, especially ion channels, represent a powerful tools for non-invasive control of neuronal network activity and, consequently, functional control of organisms and behavior. Photoswitchable regulators have been designed and characterized for a large number of ligand-gated receptors in the mammalian nervous system, including nicotinic acetylcholine, glutamate and gamma amino butyric acid receptors. Photochromic switches can be divided into two main classes: (i) soluble photochromic ligands and (ii) compounds covalently bounding to target proteins. The presentation will review recent achievements and future perspectives in the light-induced modulation of receptor-operated channels, particularly, cys-loop receptors.

КОНСТРУИРОВАНИЕ, СИНТЕЗ И АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

И.Е. Кашеверов, И.А. Иванов, Д. А. Сенько, А.О. Чугунов, В.М. Табакмахер, Д.С. Кудрявцев, И.В. Шелухина, Е.В. Крюкова, Е.Н. Спирова, Ю.Н. Уткин
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР), которые вместе с глициновыми, серотониновыми рецепторами, а также рецепторами гамма-аминомасляной кислоты образуют суперсемейство цис-петельных рецепторов, играют важную роль в функционировании нервной и иммунной систем организма. Дисфункция этих рецепторов приводит к развитию многих патологий. Лигандами нАХР являются соединения совершенно разной природы – от низкомолекулярных соединений до пептидов и белков. Появление в последние годы высокоразрешённых структур нескольких представителей цис-петельных рецепторов, а также их структурных гомологов позволяет производить направленное конструирование лигандов с требуемыми свойствами. Небольшие дисульфид-богатые пептиды, выделенные из яда хищных морских улиток рода Conus, α-конотоксины имеют жёстко зафиксированную пространственную структуру и обладают широким спектром активности в отношении различных подтипов нАХР, являясь, таким образом, хорошей отправной точкой для получения лигандов с заданной селективностью. В случае наличия множественных данных по активности серии родственных соединений, как в случае с α-конотоксином PnIA, рациональным представляется использование компьютерного моделирования по недавно разработанному методу картирования поверхности рецептора PST (protein surface topography). В результате применения данного метода была получена серия новых аналогов α-конотоксина PnIA с высоким сродством к α7 подтипу нАХР, на основании которых были синтезированы радиоактивные маркеры этого рецептора. Другие представители конотоксинов – α-конотоксин RgIA и αO-конотоксин GeXIVA, а также их изомеры, были синтезированы для характеристики различных сайтов (ортостерического и аллостерического) связывания α9 подтипа нАХР, который, как полагают, участвует в передаче болевого импульса.

THE CHOLINERGIC MICROMANAGEMENT OF ANXIETY AND METABOLIC DISORDERS

Hermona Soreq
The Edmond and Lily Safra Center of Brain Science and the life Sciences Institute, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

MicroRNAs are miniature genes which rapidly emerge as global regulators of gene expression in all organisms, yet their evolutionary origin and the full scope of their roles in brain functioning is largely unknown. We study the microRNA regulators of brain signaling by the neurotransmitter acetylcholine (which we labeled 'CholinomiRs'). These studies revealed lately-evolved primate-specific CholinomiRs that suppress the activities of the acetylcholine hydrolyzing enzyme acetylcholinesterase or the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and mediate brain-to-body signals which regulate anxiety, cognition and inflammation or operate to avoid epilepsy. Intervening with these functions identified master 'CholinomiR' regulators that control entire biological pathways and compete with each other on co-balancing acute psychological stress reactions and metabolic disorders; and human carriers of inherited changes in such regulation show excessive alertness and resilience to post-traumatic stress disorder.

Acknowledgements: This study was supported by European Commission FP-7 Health-2013-Innovation Grant #602133, the European Research Council Advanced Award 321501, the European Research Council Grant #639314 (FLDcure), the Israel Science Foundation grant #817/13 and The Hebrew University's Translational Research program.

References

1. Soreq, H. (2015) Trends in Neuroscience 38, 448-458. Review.
2. Shaked, I. et al. (2009). Immunity 31; 965-973.
3. Meydan, C. et al., (2016) Trends in Mol. Med 22; 798-812.
4. Hanin, G. et al. (2014) Human molecular genetics 23, 4569-4580.
5. Lin, T. et al. (2016) Trans. Psych, 6, e801.
6. Hanin, G. et al., Gut (2017), on line.
7. Bekenstein et al., PNAS (2017), on line.
8. Barbash et al., Trans.Psych, 2017, on line.

ЛИГАНДЫ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИИ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

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

Много лет яды природного происхождения и лекарственные растения использовались в медицинских целях различными народами. Обычно их применяли без предварительного разделения, поэтому их применение имело множество ограничений из-за полифункционального действия. Будучи разделенными до отдельных молекул природные токсины сегодня становятся важными молекулярными инструментами для науки, а самые интересные молекулы переходят в разряд лекарственных средств. Залогом такого успеха является прежде всего специфичность действия на отдельные типы и подтипы клеточных рецепторов. Для ионотропных рецепторов ноцицептивной системы млекопитающих в природных ядах и лекарственных растениях методом направленного скрининга были найдены селективные лиганды. Использование этих молекул позволило определить важные фармакологические характеристики рецепторов TRPV1, TRPA1 и ASIC3.

P2X RECEPTORS – FROM MOLECULAR STRUCTURE TO PHYSIOLOGICAL FUNCTION

Annette Nicke
Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

P2X receptors (P2XR) are non-selective cation channels gated by extracellular ATP. They are widely distributed in mammalian tissues. A single P2X subunit contains only two transmembrane domains and in early biochemical studies we have originally demonstrated an unexpected trimeric quaternary structure. Using a disulfide cross-linking approach we further presented the first direct evidence that the agonist binding site is located at the interface between neighboring receptor subunits similar as in ligand-gated ion channels of the cys-loop receptor family. In more recent studies, we applied voltage clamp fluorimetry to reveal details of ATP binding and molecular movements associated with channel activation and desensitization.

Our current interest focuses on the investigation of the P2X7R subtype for which a role in inflammatory and neurodegenerative diseases has been shown. This subtype differs from all other P2XRs by a low sensitivity to ATP, a very long intracellular C-terminus, and the ability to induce diverse downstream effects such as the release of interleukin-1β, the formation of large plasma membrane pores, and changes in plasma membrane composition and morphology. Despite an increasing recognition of the P2X7R as a target for drug development, basic information about its localization, signaling, and functions is lacking or controversially discussed. To answer these unresolved issues we generated a P2X7R BAC transgenic mouse model, in which the receptor is fused via a streptag-heptahistidyl-linker to an EGFP reporter protein. This approach permits P2X7R-EGFP expression at near physiological or moderate over-expression levels under its endogenous promoter. Biochemical and immunohistochemical experiments confirmed that the expression pattern of the transgenic P2X7R correlate with the endogenous receptor and that it is correctly transported to the plasma membrane and functional. An update on the progress and recent results will be presented.

НОВЫЙ ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНЫЙ БЛОКАТОР КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ KV1.2 ИЗ ЯДА СКОРПИОНА *MESOBUTHUS EUPEUS*

А.И. Кузьменков[1,2], О.В. Некрасова[1,2], В.М. Табакмахер[1], А.О. Чугунов[1], С. Пеньёр[3], Я. Титгат[3], А.В. Феофанов[1,2], Е.В. Гришин[1], А.А. Василевский[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [3]Лёвенский университет, Лёвен, Бельгия

Калиевые (K^+) каналы – суперсемейство интегральных белков, обеспечивающих пассивный ток ионов K^+ через клеточную мембрану. K^+ каналы вовлечены во множество процессов, поддерживающих гомеостаз в живом организме. У млекопитающих количество изоформ K^+ каналов достигает 80, что свидетельствует о чрезвычайной важности этих мембранных белков. Неудивительно, что K^+ каналы являются мишенью действия различных веществ, которые в свою очередь могут быть использованы в качестве молекулярных инструментов для дальнейшего изучения этих белков, а также в качестве прототипов лекарственных средств. Из яда желтого скорпиона Mesobuthus eupeus с помощью хроматографических методов был выделен новый пептидный токсин, способный блокировать K^+ ток. Токсин был протестирован на различных изоформах потенциал-зависимых K^+ каналов (Kv), в результате чего была показана высокая селективность блокатора к каналам Kv1.2. Данная изоформа широко распространена в нервной системе, а нарушение ее работы ассоциировано с такими заболеваниями, как эпилепсия, спонтанные судороги и атаксия. Анализ всего известного многообразия лигандов Kv позволяет утверждать, что в настоящее время полученный нами токсин является самым высокоаффинным и селективным блокатором Kv1.2. *Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 17-34-80125) и стипендией Президента РФ (СП-2634.2016.4).*

LYNX1 – ВАЖНЫЙ РЕГУЛЯТОР КОГНИТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В МОЗГЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Е.Н. Люкманова, Н.А. Васильева, М.Л. Бычков, М.А. Шулепко, М. Томсен, Д.А. Долгих, П.М. Балабан, М.П. Кирпичников
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Lynx1 является эндогенным нейромодулятором никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) нервной системы млекопитающих. Белок Lynx1 прикреплен к мембране нейрона вблизи рецептора с помощью GPI-якоря. В настоящее время Lynx1 рассматривается как один из факторов, регулирующих нейрональную пластичность. У грызунов показано участие Lynx1 в таких когнитивных процессах, как память и обучение. Механизмы, лежащие в основе нейромодуляторной активности Lynx1, в настоящее время остаются мало изученными. В этой работе, используя рекомбинантный водорастворимый аналог белка, мы показали, что Lynx1 активирует α7-nAChR в головном мозге крысы. Обнаружено, что Lynx1 конкурирует с растворимыми олигомерами β-амилоидного пептида Aβ(1-42) за связывание с субъединицами нескольких подтипов nAChR, выделенными из мозга. Следует отметить, что олигомеры Aβ(1-42) рассматриваются как токсичная форма β-амилоидного пептида, связанная с когнитивными нарушениями при болезни Альцгеймера (AD). Aβ(1-42) взаимодействует и регулирует функцию различных подтипов nAChR. Обнаружено, что Lynx1 отменяет индуцированную Aβ(1-42) цитотоксичность на корковых нейронах мыши. Было изучено влияние Lynx1 на длительную потенциацию (LTP) в гиппокампе, которая лежит в основе процессов обучения и памяти. Предварительная инкубация срезов гиппокампа с 10 мкМ Lynx1 в течение одного часа вызвала

значительное увеличение амплитуды LTP (~ 70%) в области CA1. Напротив, инкубация с 200 нМ Aβ(1-42) ингибировала LTP. Совместная инкубация Aβ(1-42) с Lynx1 полностью отменяла блокаду LTP, вызванную Aβ(1-42). Показано, что обработка корковых нейронов мыши Aβ(1-42) приводит к уменьшению экспрессии гена Lynx1. Это согласуется с наблюдаемым уменьшением уровня экспрессии Lynx1 в коре головного мозга трансгенных мышей, моделирующих патологию AD (3xTg-AD). Полученные данные указывают на Lynx1 как на важный регулятор когнитивных процессов, который может активировать α7-nAChR в головном мозге и предотвращать блокаду длительной потенциации, вызванную β-амилоидным пептидом. Это может иметь функциональное и патофизиологическое значение при болезни Альцгеймера. *Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 16-14-00102) и грантом Президента РФ НШ-8384.2016.4.*

БЕЛКОВАЯ ТОПОГРАФИЯ: УВЕЛИЧЕНИЕ СЕЛЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ «ДИЗАЙНЕРСКОГО» БЛОКАТОРА КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

А.О. Чугунов[1,2], А.Ф. Лихоносова[2], А.А. Беркут[1], П.Б. Опарин[1], К.С. Минеев[1], Р.Г. Ефремов[1,2], А.А. Василевский[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

В предыдущих исследованиях мы предложили использовать α-гарпининовый фолд — две антипараллельные α-спирали, скрепленные двумя дисульфидными мостами, — как основу для белкового дизайна. Первым примером стал пептид Tk-hefu, полученный «пересадкой» функционально важных остатков из токсина яда скорпиона в защитный пептид растений, имеющий структуру α-гарпинина. Tk-hefu приобрел новый тип активности — блокирование потенциал-чувствительных калиевых каналов (Kv), что было не свойственно исходному пептиду, но являлось природной функцией токсина из яда скорпиона [1]. В этой работе мы определили пространственную структуру Tk-hefu методом ЯМР-спектроскопии, а также методами молекулярного моделирования установили возможную структуру комплекса этого блокатора со своей мишенью — каналом Kv1.3. Применение разработанной нами методики «белковой топографии» [2] позволило проанализировать характеристики этого комплекса и предложить аминокислотную замену, которая должна увеличить сродство к Kv1.3. «Дизайнерский» α-гарпинин — Tk-hefu-2 – был синтезирован, и его активность по отношению к Kv1.3 возросла в 20 раз. В этой работе мы показываем, как совместное применение арсенала биохимических, структурных и компьютерных методов позволяет эффективно решать задачу белкового дизайна, получая новые молекулы с потенциально уникальными фармакологическими свойствами. *Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», а также гранта президента РФ НШ-7676.2016.4.*

Литература

1. Berkut, A. A., Usmanova, D. R., Peigneur, S., Oparin, P. B., Mineev, K. S., Odintsova, T. I., ... & Vassilevski, A. A. (2014). Structural similarity between defense peptide from wheat and scorpion neurotoxin permits rational functional design. J. Biol. Chem. 289, 14331-14340.
2. Koromyslova, A. D., Chugunov, A. O., & Efremov, R. G. (2014). Deciphering fine molecular details of proteins' structure and function with a Protein Surface Topography (PST) method. J. Chem. Inf. Model. 54, 1189-1199.

СЕССИЯ «БИОИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ»

THE SMALL VARIATIONS IN EDITING SITE STRUCTURE OF PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC aaRSs MAY GENERATE HERBICIDE RESISTANT PLANTS

Mark Safro
Department of Structural Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot 761000, Israel

The aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) demonstrate a significant degree of natural plasticity in the active site. Considering that chemical structures of various amino acids closely resemble each other, it is difficult to discriminate between them, and amino acid (aa) binding pocket accommodates not only the cognate aa, but also the non-protein aa (NPAA) and their various derivatives. Editing activity has been evolved by certain aaRSs to resolve the problem. Both prokaryotic and eukaryotic cytoplasmic enzymes have been shown to activate non-cognate aa and NPAA, but usually not attach them stably to tRNA due to existence of additional hydrolytic activity at the additional editing site.

Of the thousands of known NPAA, about 500 occur in plants, and some of NPAA have been shown to be toxic to organisms lacking an editing function in aaRSs. One of them is naturally occurring NPAA meta-Tyrosine (m-Tyr) implicated in plant allelopathy. Originating from plants, m-Tyr turned out to be phytotoxic to a broad spectrum of species. A perennial species, fescue produces one of the stronger novel herbicides the NPAA m-Tyr, which acts as a powerful growth inhibitor on many plant species.

We have developed a method for introducing into plants the artificial resistance toward herbicide aa. The method is based on incorporation into the plant's organelles (mitochondria and chloroplast) bacterial aaRS possessing editing activity toward a given toxic aa. It was created genetically modified *Arabidopsis thaliana* capable of growing in the presence of exogenous herbicidal m-Tyr at concentrations that have a deleterious effect on unmodified plant. However, the method is not limited to *Arabidopsis thaliana* or to m-Tyr amino acid only.

ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННЫЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ СОРТА СРЕДНЕВОЛОКНИСТОГО ХЛОПЧАТНИКА С ВОЛОКНОМ ПРЕВОСХОДНОГО КАЧЕСТВА И УЛУЧШЕННЫМИ АГРОНОМИЧЕСКИМИ ПРИЗНАКАМИ

И.Ю. Абдурахмонов[1], З.Т, Буриев[1], Ш.Э., Шерматов[1], Ш.И. Салихов[2], А. Абдукаримов[1]
[1]Центр геномики и биоинформатики АН РУз; [2]Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

Сохраняющаяся более низкая цена на синтетическое волокно по сравнению с натуральным хлопковым волокном и снижение качества текстильных изделий побуждает исследователей разрабатывать новые инновации в производстве волокна высокого качества. Исходя из этого, мы впервые клонировали и характеризовали семейство генов фитохромов хлопчатника и обнаружили тесную связь гена *PHYA1* с длиной и прочностью волокна. Далее мы создали бинарную РНК-интерферирующую (РНКи) генетическую конструкцию и провели стоматическую трансформацию у эмбриогенного хлопчатника *G. hirsutum* L.

cv. Coker 312. У полученных новых растений $T_{0\text{-}10}$ поколения с РНКи гена *PHYA1* наблюдалось более длинное (38-40 мм против 30-32 мм) и прочное (31.2 против 29.7 г/текс) волокно, улучшенный микронейр (3.9-4.2), скороспелость (на 5-10 дней раньше), высокая урожайность (на 10–18% выше), развитая корневая система (в 2 раза), а также устойчивость к засухе, засолению и жаре. Технология показала огромный потенциал для создания превосходных сортов средневолокнистого хлопчатника за короткое время без отрицательного воздействия на урожайность и созревание. Это повзоляет производить более длинное и прочное волокно средневолокнистого хлопчатника, а также пряжу и текстиль высокого качества. Полученные линии хлопчатника со сниженной на 70% экспрессией *PHYA1* показали высокий уровень транскриптов генов *PHYA2*, *PHYB*, *PHYC* и *PHYE*, что является проявлением компенсаторной регуляторной сети фитохромов в хлопчатнике. Это указывает на то, что фитохромная регуляторная сеть хлопчатника может иметь принципиально иную динамическую архитектуру, чем у модельного растения арабидопсиса, у которого мутации с потерей функции *phyA* не вызывали увеличения экспрессии других фитохромов. Анализ транскриптома и микроРНК позволил расшифровать сложную сеть ключевых путей генетической регуляции и профилей экспрессии микроРНК в РНКи-растениях. По сравнению с обычным хлопчатником РНКи-генотипы показали дифференциальную экспрессию большого числа генов, аллельных вариаций, множественных случаев альтернативного сплайсинга и ключевых эпигеномных изменений на фоне РНКи *PHYA1*. Это подчеркивает преимущества РНКи «ключевых» регуляторных генов развития растений, таких как фитохромы, по сравнению с существующими или новыми инструментами для редактирования генома.

ПРОТЕОМНЫЙ ПОДХОД В ИССЛЕДОВАНИИ МЕХАНИЗМА СТАРЕНИЯ РАСТЕНИЙ, ОСНОВАННЫЙ НА МОДЕЛИРОВАНИИ ГЛИКИРОВАНИЯ *IN VITRO*

Е.М. Лукашева[1], Н.Г. Шиляев[1], Н.В.Фролова[2], А. Ким[3,4], Т.В.Мамонтова[1], М.В.Вихнина[1], Т.В.Гришина[1], Г.У. Балке[3], К. Биркемайер[2], Т.Е.Билова[5], У.М. Герфурт[2], А.А. Фролов[1,4]

[1]Кафедра биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; [2]Факультет химии и минералогии, Университет Лейпцига, Германия; [3]Департамент клеточной и метаболической биологии, Институт биохимии растений им. Лейбница, Халле/Саале, Германия; [4]Департамент биоорганической химии, Институт биохимии растений им. Лейбница, Халле/Саале, Германия; [5]Кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

Гликирование представляет собой группу неэнзиматических посттрансляционных модификаций белков в присутствии карбонильных соединений. Формирующиеся на первом этапе ранние продукты гликирования (соединения Амадори и Хайнса) легко вовлекаются в последующую трасформацию с образованием конечных продуктов глубокого гликирования (КПГГ). У млекопитающих их накопление связано с развитием сахарного диабета и старением. Недавно КПГГ были обнаружены в растительных организмах [1]. Недавно нами было проведено глубокое исследования гликированного протеома растений [2] и показано усиление гликирования в условиях абиотического стресса [2]. Несмотря на это, механизмы и ключевые интермедиаты гликирования белков растений до сих пор не известны. Очевидно, что для их идентификации, необходимо оценить реактивность и гликирующий потенциал индивидуальных сахаров в контексте паттернов гликирования протеома. Ответ на эти вопросы был получен в ходе икубации синтетических модельных пептидов с эквимолярными количествами индивидуальных сахаров при 22°C в течение 42 дней, что соответствует длительности вегетативной фазы развития многих культурных растений. Анализ пептидных и карбонильных интермедиатов и продуктов основывался на RP-UHPLC-QqTOF-MS и GC-EI-Q-MS, соответственно. Результаты анализировались в контексте данных, полученных методами bottom up протеомики различных органов растений с помощью nanoRP-UPLC-Q-Exactive- и LTQ-Orbitrap-MS, а также метаболомики (GC-Q-EI-MS).

Анализ пептидных продуктов показал, что глюкозо-6-фосфат, глицеральдегид-3-фосфат, дигидроксиацетон фосфат и рибулоза проявляют наибольшую реактивность в отношении модельных пептидов. В то же время, дигидроксиацетон фосфат, глицеральдегид-3-фосфат, рибулоза, эритроза и сахароза являются наиболее вероятными предшественниками КПГГ у растений. Такие продукты глубокого гликирования как N^{6}-(карбоксиметил)лизин, гидроимидазолоны, образованные глиоксалем и метилглиоксалем, а также амидные КПГГ наиболее широко представлены в гликированном протеоме. Интенсивное образование глиоксаля и метилглиоксаля в модельных реакциях позволяет рассматривать аутоокисление углеводов в качестве основного пути гликирования в физиологических условиях. Протеомный анализ показал значительное доминирование КПГГ, тогда как продукты раннего гликирования присутствовали в гораздо меньшем количестве. Также не было обнаружено соответствия паттернов продуктов конечного и раннего гликирования, что подтверждает предположение о ведущей роли аутоокисления сахаров в гликировании растительных белков. Не менее важным является факт увеличения уровня гликирования в течение жизни растения, что указывает на его возможный вклад в процессы старения. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-16-01042).*

Литература

3. Bechtold U, Rabbani N, Mullineaux P.M., Thornalley P.J.Quantitative measurement of specific biomarkers for protein oxidation, nitration and glycation in Arabidopsis leaves // Plant J., 2009. V. 59(4):661-71.
4. Bilova T, Lukasheva E, Brauch D, Greifenhagen U, Paudel G, Tarakhovskaya E, Frolova N, Mittasch J, Balcke GU, Tissier A, Osmolovskaya N, Vogt T, Wessjohann LA, Birkemeyer C, Milkowski C, Frolov A. A Snapshot of the Plant Glycated Proteome: Structural, Functional and Mechanistic Aspects // J. Biol. Chem., 2016. V. 291(14). P. 7621-36.
5. Paudel G., Bilova T., Schmidt R., Greifenhagen U., Berger R., Tarakhovskaya E., Stöckhardt S., Balcke G.U., Humbeck K., Brandt W., Sinz A., Vogt T., Birkemeyer C., Wessjohann L., Frolov A. Osmotic stress is accompanied by protein glycation in *Arabidopsis thaliana* // J. Exp. Bot., 2016. V. 67 (22). P. 6283-6295.

ПОИСК И ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ ПРИРОДНЫХ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ. ПЕПТИДОМИКА. ПРОТЕОМИКА

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

ФАЗОВАЯ ПЕРЕСТРОЙКА ПРОТЕОМА – МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ БАКТЕРИИ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* К КЛЕТКЕ-ХОЗЯИНУ

Д.С. Матюшкина, И.О. Бутенко, О.В. Побегуц, Д.В. Евсютина, В.Г. Ладыгина, Г.Ю. Фисунов, В.М. Говорун
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Представителями рода Mycoplasma (класс Mollicutes) являются Грамположительные бактерии без клеточной стенки. Обусловленная паразитическим образом жизни значительная редукция генома (0,58–2,20 Mb) и, соответственно, редукция всех молекулярных систем клетки, но сохраненная способность микоплазм расти на искусственной питательной среде, делает эти организмы очень удобным модельным объектом для исследований в области системной биологии. Несмотря на значительную редукцию генома, и как следствие – потерю многих метаболических генов и их продуктов, адаптивные способности микоплазм остаются достаточными, чтобы в условиях *in vivo* и *in vitro* приспосабливаться к воздействию антибиотиков, теплового и осмотического стрессов, уклоняться от действия иммунной системы хозяина. Однако механизмы патогенности и адаптации этих бактерий очень плохо изучены. В данной работе впервые было проведено исследование внутриклеточной инфекции *Mycoplasma gallisepticum* на примере заражения трех клеточных культур, принадлежащим к разным хозяевам, а именно куриных эритробластов (линия HD3), мышиных эмбриональных стволовых mES клеток и клеток HeLa (линия раковой опухоли шейки матки человека). С помощью методов двумерного дифференциального электрофореза и MRM (Multiple Reaction Monitoring) подхода обнаружено явление протеомного «фазового перехода», которое претерпевает *M. gallisepticum* при инвазии в эукариотические клетки и которое остается стабильным при последующей изоляции бактерии из клеток-хозяев и длительном культивировании на питательной среде в лабораторных условиях, что может свидетельствовать о наличии бактериальной клеточной памяти. Найдены узловые регуляторы (YebC/PmpR и SpxA) фазовых состояний. Обнаружено, что изменения протеома *M. gallisepticum* являются универсальными для всех исследуемых клеточных линий, несмотря на различия в структуре и организации клеток-хозяев. Идентифицированы основные группы белков, представленность которых меняется в результате внутриклеточной инфекции. На моделях острой и хронической инфекции показано, что паттерн белковых изменений в большой степени зависит от длительности взаимодействия *M. gallisepticum* с эукариотической клеткой.
Работа поддержана грантом РНФ № 14-24-00159 «Системное исследование минимальной клетки на модели Mycoplasma gallisepticum».

ОСОБЕННОСТИ СОВОКУПНОСТИ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ

А.А. Замятнин *Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; Departamento de Informatica, Universidad Tecnica Federico Santa Maria, Valparaiso, Chile*

В живых организмах идентифицируются как эндогенные, так и экзогенные регуляторные олигопептиды. Эндогенные структуры образуются из специализированных предшественников или выщепляются из белков самого организма, а экзогенные заносятся другим организмом (например, токсины) или поступают извне в виде фрагментов пищевых белков [1]. К настоящему времени описано около 15000 различных природных олигопептидов (база данных EROP-Moscow [2], http://erop.inbi.ras.ru/), обнаруженных у более чем 2200 видов живых организмов. Для большинства из них определены (в том числе *in vivo*) функциональные свойства. Значительно меньше изучаются функции экзогенных фрагментов пищевых белков. Эти исследования, как правило, проводятся *in vitro* и для довольно ограниченного числа белков. В то же время число возможных фрагментов лишь одного белка, содержащего около 200 аминокислотных остатков (например, одного из четырех казеинов быка), составляет величину большую, чем число всех известных на сегодняшний день структур эндогенных олигопептидов [3], т.е. они могут представлять собой огромный дополнительный пул регуляторных молекул. Их образование осуществляется в результате действия многочисленных ферментов желудочно-кишечного тракта, в том числе пепсина. Действие этого неспецифического фермента приводит к расщеплению большей части из 400 возможных пептидных связей [4] и к образованию огромного количества разнообразных фрагментов. Первичные структуры и функции многих малых фрагментов (особенно ди- и трипептидов) пищевых белков совпадают с аминокислотными последовательностями уже известных олигопептидов, полученных из других источников. Таким образом наши знания об их функциях могут пополняться без проведения дополнительных экспериментов. Использование всей этой информации позволяет провести сравнительный анализ функциональных свойств эндогенных и экзогенных олигопептидов и их роль в функционировании нервной, эндокринной и иммунной систем, а также во многих других регуляторных процессах [5].

Литература

1. Zamyatnin A.A., Voronina O.L. Biochemistry (Moscow), 77, 502-510, 2012.
2. Zamyatnin A.A., et al. Nucleic Acids Res., 34, D261-D266, 2006.
3. Zamyatnin A.A. Biochemistry (Moscow), 77, 1575-1585, 2009.
4. Palashoff M.H. Chemistry Master's Theses, Paper 1, 2008.
5. Zamyatnin A.A. Neurochem. J., 10, 249-257, 2016.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ СТРЕССОВЫХ ГОРМОНОВ НА ПЕПТИДОМ КЛЕТОК МХА *PHYSCOMITRELLA PATENS*

Р.А. Азаркина, И.А. Фесенко, М.А. Пашкова, И.В. Киров, В.Г. Згода, В.Т. Иванов, В.М. Говорун
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Пептиды являются важнейшим классом низкомолекулярных биорегуляторов. В последние годы был идентифицирован целый ряд регуляторных пептидов растений, образующихся при деградации функциональных белков-предшественников.

Особый интерес представляет изучение действия стрессовых гормонов на пептидом клеток растений, поскольку это поможет идентифицировать регуляторные пептиды, участвующие в ответах на неблагоприятные факторы внешней среды. Для поиска таких пептидов, в нашей работе был использован модельный объект – мох *P. patens*, которому свойственен широкий диапазон биохимической и физиологической пластичности. Используя масс-спектрометрический анализ, мы проанализировали пулы нативных пептидов, выделенных из клеток *P. patens* после обработки такими стрессовыми гормонами как салициловая и метил-жасмоновая кислоты. Было установлено, что обработка клеток мха метилжасмонатом приводит к существенному изменению пептидного пула. Так, при концентрациях метилжасмоновой кислоты 400 мкМ, в тканях мха было идентифицировано 1767 нативных пептидов, являющихся фрагментами 561 белка. При этом, в контроле мы идентифицировали 1282 нативных пептидов, являющихся фрагментами 483 белков. При концентрациях салициловой кислоты 200 и 400 мкл было идентифицировано 2131 нативных пептидов, являющихся фрагментами 672 белков и 2004 нативных пептидов, являющихся фрагментами 632 белков, соответственно. В контроле было идентифицировано 1642 нативных пептидов от 577 белков-прекурсоров. Используя *in silico* анализ идентифицированных пептидов-фрагментов функционально активных белков при обработке MeJa было предсказано 307 пептидов с антибактериальной активностью в клетках мха. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ БИОМОЛЕКУЛЯРНАЯ АНАЛИТИКА В РАСТВОРЕ / QUANTITATIVE BIOMOLECULAR ANALYTICS IN SOLUTION

Piotr Wardega *NanoTemper Technologies*

At NanoTemper Technologies, we are passionate about achieving excellence in everything we do. This has made us the partner of choice for thousands of researchers worldwide in pharmaceutical and biotechnology industries as well as in academic research institutes. Our company consists of dedicated team of experts operates globally to offer scientists worldwide individual application support and to ensure supreme instrument capability.

The foundation of NanoTemper Technologies is microscale thermophoresis (MST), a powerful technique to quantify biomolecular interactions. It is based on thermophoresis, the directed movement of molecules in a temperature gradient, which strongly depends on a variety of molecular properties such as size, charge, hydration shell or conformation. Thus, this technique is highly sensitive to virtually any change in molecular properties, allowing for a precise quantification of molecular events independent of the size or nature of the investigated specimen. Along, MST with it's unique cabalitities enables researchers to work with unpurified proteins, directly in their close to native conditions, such as cell or tissue lysate and membrane fraction as well.

The second technology which we successfully introduced to the research community is nanoDSF, an advanced differential scanning fluorimetry technology of ours, which provides ultra-high data density and unique resolution. It detects smallest changes in the fluorescence of tryptophan and/or tyrosine which are present in virtually all proteins. The fluorescence of tryptophans in a protein is strongly dependent on its close surroundings. By following changes in fluorescence, chemical and thermal stability can be assessed in a truly label-free fashion, regardless of the nature of the solution in which the protein of interest is present. The dual-UV technology by NanoTemper allows for rapid fluorescence detection, providing an unmatched scanning speed and data point density. This yields an ultra-high resolution unfolding curves which allow for detection of even minute unfolding signals. To discuss your specific research interest we invite you to visit our company booth during the meeting.

РОЛЬ ФЕРМЕНТА ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МЕЖКЛЕТОЧНОМ ПЕРЕНОСЕ ПАТОГЕННЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

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

Болезнь Хантингтона — наследственное заболевание, обусловлена наличием мутации в гене белка хантингтина (Htt). Данная мутация приводит к появлению аномально длинной полиглутаминовой последовательности (polyQ). При наличии polyQ последовательности свыше 35 остатков образуются цитотоксические агрегаты, которые вовлекают в своё образование нативные клеточные белки. Очаг болезни Хантингтона – шипиковые нейроны стриатума, но по мере прогрессирования заболевания агрегаты патогенных белков появляются в других регионах мозга. В наших предыдущих работах мы показали, что глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), фермент гликолиза, усиливает процесс формирования агрегатов мутатного Htt, что ускоряет гибель клеток. В последние годы обнаружено явление горизонтального переноса патологии, которое заключается в миграции мутантных белков между клетками мозга. Целью данной работы было выяснить роль ГАФД в межклеточном переносе мутантного Htt. Мы показали, что в клетках феохромоцитомы крысы PC-12HttQ103, несущих ген 1го экзона Htt с аномально длинным полиглутаминовым повтором (Q103), формирование агрегатов вызывает гибель клеток, а агрегаты мутантного Htt в комплексе с ГАФД оказываются в клеточной среде. Кондиционированная среда, содержащая агрегаты, цитотоксична для нативных клеток, а после удаления агрегатов — утрачивает эти свойства. При инкубации клеток нейробластомы человека SK-N-SH с чистыми белками Q58 и ГАФД, в комплексе и по отдельности мы обнаружили, что ГАФД значительно усиливает токсичность Q58. Также ГАФД ускоряет проникновение Q58 в клетки нейробластомы, используя клатрин-зависимый транспорт, и способствует агрегации polyQ нормальной длины (Q25). Полученные данные позволяют предположить, что ГАФД значительно повышает цитотоксичность агрегатов мутантного Htt, транспортирует его в клетки и способствует агрегации нормальных клеточных белков клетки-акцептора.

ИЗОФОРМЫ ЛЮЦИФЕРАЗЫ ИЗ КОПЕПОДЫ *METRIDIA LONGA*: ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ

М.Д. Ларионова[1,2], С.В. Маркова[1,2], Е.С. Высоцкий[1,2]
[1]Институт биофизики, ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»; [2]Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Сибирский федеральный университет; Красноярск, Россия

В настоящее время копеподные люциферазы являются эффективным инструментом визуализации при проведении медико-диагностических *in vitro* и *in vivo* исследований благодаря высокой биолюминесцентной активности, а также широкому диапазону детекции. Для люциферазы морских копепод *Metridia longa* MLuc было идентифицировано несколько высокоак-

тивных изоформ. Данные люциферазы – естественно секретируемые ферменты, катализирующие реакцию окисления субстрата целентеразина с испусканием голубого света (L_{max}=485 нм). Изоформы являются гомологичными белками небольшой молекулярной массы (16.5 – 23 кДа), аминокислотная структура которых представлена вариабельным N-концом с сигнальным пептидом, и высоко консервативным С-концом, включающим 10 цистеиновых остатков. Показано, что правильно сформированные дисульфидные связи необходимы для биологической активности люциферазы *M. longa*.

В рамках исследования были оптимизированы условия получения белков новых изоформ люциферазы *M. longa* с помощью бакуловирусной системы экспрессии. В результате были получены препараты белков в природной форме. В ходе исследований удалось установить биохимические свойства копеподных люцифераз, как потенциальных биолюминесцентных репортеров – определены кинетические параметры, оптимальные условия работы ферментов, исследован динамический линейный диапазон детекции, а также проанализированы спектральные свойства. Для оценки потенциального применения люциферазных изоформ в качестве биолюминесцентных *in vitro* репортеров были сконструированы биоспецифические химерные белки на основе изоформы MLuc7 и вариабельной части антитела, специфичного к белку Е вируса клещевого энцефалита. Пригодность новых белков как биолюминесцентных репортеров в *in vivo* анализе была также оценена при транзиентной трансфекции клеток млекопитающих HEK293. Проведенная работа позволила охарактеризовать перспективные биолюминесцентные ферменты, обладающие уникальными свойствами, расширив арсенал существующих репортерных молекул, применимых для решения различных исследовательских задач. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Красноярского края в рамках научного проекта №16-44-242099.*

«ВАМПИРОМ»: ТРАНСКРИПТОМНЫЙ И ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

В.В. Бабенко[1], В.А. Манувера[1], А.С. Курдюмов[1], О.В. Подгорный[1], Е.Н. Графская[1], Т.Е. Фарафонова[2], Д.А.Широков[1], Н.Ф. Полина[1], Д.Д. Харлампиева[1], А.М Белова[1], П.А. Бобровский[1], Д.А. Корнилов[1], В.К. Димитриев[1], А.И. Манолов[1], О.В. Побегуц[1], И.О. Бутенко[1], С.И. Ковальчук[1], Н.А. Аниканов[1], Д.С. Матюшкина[1], Д.В. Ракитина[1], Д.В. Виноградов[3], А.С. Касьянов[3], Е.С. Кострюкова[1], М.С. Гельфанд[3], В.Г. Згода[2], И.П. Баскова[4], <u>В.Н. Лазарев</u>[1]

[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; [3]Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН; [4]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

На протяжении нескольких тысяч лет человечество использует кровососущих пиявок для лечения различных заболеваний. Компоненты слюны пиявки уменьшают воспаление, обладают обезболивающим, антикоагуляционным, тромболитическим действием, а также антимикробной активностью. Несомненно, медицинскую пиявку можно назвать природной фармакопеей, написанной в ходе эволюции. Несмотря на огромный интерес к исследованию компонентного состава слюны медицинской пиявки, данные по транскриптомике клеток слюнных желез и протеомике слюны пиявки в настоящее время малочисленны и фрагментарны. Мы провели полное транскриптомное профилирование клеток слюнных желез, глубокий протеомный и пептидомный анализ слюны трех видов медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis*, *H. verbana*, *H. orientalis*). Нами был разработан протокол лазерной микродиссекции клеток слюнных желез пиявки. После выделения суммарной РНК из клеток слюнных желез и мышечных клеток в качестве референсного образца от пиявок, голодающих в течение четырех месяцев, были сконструированы нормализованные к ДНК библиотеки. С использованием платформы Ion Torrent PGM для каждой библиотеки было получено более 1 млн. прочтений и проведен биоинформационный анализ. Далее мы проанализировали протеом и пептидом слюны медицинских пиявок трех видов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с тандемной масс-спектрометрией. Таким образом, нами впервые выполнено полное транскриптомное профилирование клеток слюнных желез, а также протеомный и пептидомный анализ слюны медицинских пиявок трех видов. В результате анализа были идентифицированы новые пептиды и белки, обладающие потенциальным тромболитическим, антикоагуляционным и антимикробным действием.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ, СВЯЗАННЫЕ С ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ

<u>Б.Н. Соболев</u>, Д.А. Карасев, Д.А. Веселова, А.В. Веселовский, А.И. Арчаков

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

Данные фосфопротеомики необходимы для функциональной аннотации белков. Это связано с тем, что посттрансляционное фосфорилирование белков необходимо при передаче клеточных сигналов, регуляции метаболических реакций, белок-белковых взаимодействиях и др. Для понимания молекулярных механизмов, обуславливающих упомянутые процессы, требуются исследования на уровне трехмерных структур. Полученные результаты позволят улучшить компьютерное распознавание сайтов фосфорилирования, а также выявить функционально значимые структурные изменения. Используя данные по локализации фосфосайтов в аминокислотных последовательностях, извлеченных из доступных информационных источников, мы определили около 1500 сайтов, которые удалось локализовать в трехмерных структурах белков. Мы исследовали вариабельность структур, содержащих одни и те же сайты. Значительное число сайтов характеризовались большими различиями по показателям доступности к молекулам растворителя, вычисленными для разных структур (с сайтами в немодифицированном состоянии). Выявление сайтов, погруженных во всех рассмотренных структурах, могло быть связано с существованием коротко живущих конформаций, в которых эти сайты доступны. Большинство сайтов обнаружены в неупорядоченных участках полипептидной цепи. Тем не менее, значительная доля сайтов локализована в структурно упорядоченных участках (чаще в альфа-спиралях), сохраняющих конформацию во всех рассмотренных структурах. Трехмерное выравнивание структур с одним и тем же сайтами в модифицированном и немодифицированном состоянии показало, что более половины сайтов не изменяют внутримолекулярного положения при фосфорилировании. Остальные фосфосайты претерпевают заметный сдвиг относительно других частей молекулы. Попарное сопоставление структур с немодифицированными сайтами, а также сопоставление структур с модифицированными сайтами показало, что фосфорилирование подвижных участков стабилизирует одну из возможных конформаций. Привлечение данных по локальной структуре сайт-содержащих участков важно для более эффективного предсказания фосфорилирования белков и понимания структурных основ соответствующих регуляторных процессов. *Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг.*

ПРОТЕОМНЫЕ ФАКТОРЫ ВЫЖИВАЕМОСТИ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ МАТРИЧНОГО СИНТЕЗА

И.О. Бутенко, Д.С. Матюшкина, О.В. Побегуц, Г.Ю. Фисунов, В.М. Говорун
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Одним из наиболее интересных и удобных модельных объектов для системных исследований являются бактерии класса Mollicutes, включающего три основных рода: Mycoplasma, Spiroplasma и Acholeplasma. Особенностью молликут является отсутствие клеточной стенки, достаточно сильно редуцированный геном, изменение функции кодона UGA со стоп-кодона на кодирование триптофана. Вследствие паразитизма данных бактерий, у них редуцированы многие метаболические пути. В отличие от большинства представителей класса Mollicutes, бактерий вида *Acholeplasma* spp. относят в основном к сапрофитам и комменсалам. Данные микроорганизмы распространены повсеместно и их удавалось обнаружить в тканях растений, насекомых, млекопитающих, и даже сточных водах. В данной работе, на модели *Acholeplasma laidlawii* был разработан метод протеомного профилирования отдельных колоний, с помощью которого был изучен ответ *A. laidlawii* на обработку ингибиторами матричного синтеза – рифампицином и тетрациклином. С помощью метода мониторинга множественных реакций (MRM) были получены протеомные профили отдельных колоний *A. laidlawii* после обработки бактериальной культуры рифампицином и тетрациклином. Была установлена степень вариабельности ключевых белков *A. laidlawii* в различных колониях, а также определена группа белков, чья представленность не менялась. Кроме того, для профилированных колоний была определена жизнеспособность клеток *A. laidlawii* при дальнейшей культивации в лабораторных условиях, и показана стабильность наблюдаемых протеомных изменений. На основе этих данных были обнаружены качественные и количественные параметры состава протеома, коррелирующие с выживаемостью отдельной бактериальной колонии при дальнейшей культивации, а также получена оценка пределов изменения состава протеома *A. laidlawii*, при которых клон сохраняет способность к пролиферации в лабораторных условиях. *Работа поддержана грантом РНФ № 14-24-00159 «Системное исследование минимальной клетки на модели Mycoplasma gallisepticum».*

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМА ХЛОРОПЛАСТОВ В РЕЗУЛЬТАТЕ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ ИЗ ПРОТОНЕМЫ *PHYSCOMITRELLA PATENS*

И.А. Фесенко[1], А.В. Середина[1], Г.П. Арапиди[1], А.С. Урбан, В.В. Птушенко, А.С. Мамаева[1], В.Т. Иванов[1], В.М. Говорун[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Протопласты – это растительные клетки, лишённые клеточной стенки. Процедура выделения протопластов является типичной в исследованиях физиологии и биохимии растений. С другой стороны, разрушение клеточной стенки несомненно является комплексным стрессом. На сегодняшний день довольно мало известно о молекулярных механизмах, вовлечённых в регуляцию ответа на такие стрессоры. Мы использовали протопласты *Physcomitrella patens* в качестве модели для изучения кратковременного стресса на протеом хлоропластов. Используя метод безметочной количественной протеомики – SWATH-MS, мы детектировали 479 хлоропластных белков. Содержание 219 из которых изменялось более чем в 1,4 раза в связи с разрушением клеточной стенки драйзелазой. Среди 196 белков, содержание которых снижалось после выделения протопластов, обнаружены белки, участвующие в фотосинтезе (16,6%), ответе на биотический стресс (12,1%), фолдинге белков (9,1%), окислельно-восстановительном метаболизме (3,8%) и направлении белков в хлоропласт (3%). Вместе с тем мы обнаружили увеличение содержания 23 белков, 9 из которых вовлечены в регуляцию устойчивости к заражению бактериями. Как известно, основная функция хлоропластов – это фотосинтез. Мы выявили не только снижение содержания многих хлоропластных белков (например, белков фотосистем I и II, светособирающих комплексов, пластоцианина), участвующих в этом процессе, но и снижение квантового выхода флуоресценции фотосистемы II после изоляции протопластов. Таким образом, получение изолированных протопластов – процедура, значительно изменяющая протеом растительной клетки и её физиологическое состояние. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПРОТЕАСОМ

А.С. Цимоха
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

26S протеасома – мультисубъединичный белковый комплекс, отвечающий за избирательную деградацию белков в клетке. Согласно современным представлениям протеасомы находятся не только в клетке, также обнаружены во внеклеточном пространстве. Внеклеточные протеасомы обнаружены в плазме крови, в альвеолярном секрете, спинномозговой жидкости, в среде культивирование клеток. Биологические функции внеклеточных протеасом в настоящее время не ясны, однако, замечено, что у пациентов, страдающих от аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований, сепсиса или травмы, концентрация внеклеточных протеасом в крови повышается, что имеет диагностическое и прогностическое значение. Важным шагом в понимании функции и механизмов транспорта протеасом во внеклеточное пространство является определение особенностей их субъединичного состав. Мы показали, что внеклеточная популяция протеасом представлена в основном свободными каталитически активными 20S протеасомами, что свидетельствует о том, что, во-первых, клеточная гибель не является причиной их появления во внеклеточном пространстве и, во-вторых, функционирование внеклеточных протеасом никак не связано с убиквитин-зависимой системой. Согласно современным представлениям протеасомы не являются классическими секретируемыми белками, и возникает вопрос, каким образом протеасомы выходят во внеклеточное пространство. Мы показали, что протеасомы транспортируются во внеклеточное пространство в составе экзосом. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда (16-14-10343).*

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ СУБПРОТЕОМЫ RPN10-СВЯЗЫВАЮЩИХ И ИЗАТИНСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МОЗГА И ИХ ИЗМЕНЕНИЯ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ НЕЙРОТОКСИНОМ МФТП И НЕЙРОПРОТЕКТОРОМ ИЗАТИНОМ

О.А. Бунеева[1], А.Т. Копылов[1], Л.Н. Неробкова[2], И.Г. Капица[2], В.Г. Згода[1], А.Е. Медведев[1]
[1]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; [2]НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия

Митохондрии (МХ) являются важной мишенью как для нейротоксинов, вызывающих развитие болезни Паркинсона (например, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) и др.), так и для нейропротекторов, к числу которых относится и изатин. Действие последнего реализуется при участии изатинсвязывающих белков, обнаруженных в различных компартментах клетки. Индуцируемое МФТП нарушение функций МХ влияет на работу убиквитин-протеасомной системы (UPS), осуществляющей селективную деградацию поврежденных белков из различных внутриклеточных компартментов, включая МХ. Важным этапом доставки белков, подлежащих протеолитической деградации в протеасомах, является их взаимодействие с субъединицей Rpn10 регуляторной субчастицы 19S, которая служит рецептором убиквитина. В данной работе исследовано влияние однократного введения мышам C57BL/6 нейротоксина МФТП (в дозе 30 мг/кг) и нейропротектора изатина (100 мг/кг) на субпротеомы Rpn10-связывающих и изатинсвязывающих белков МХ мозга. Введение МФТП приводило к появлению характерных двигательных нарушений, а изатин снижал их проявления. В профилях Rpn10-связывающих и изатинсвязывающих белков четко различались два пула: конститутивный пул Rpn10-связывающих и изатинсвязывающих белков, нечувствительный к действию МФТП и изатина, и вариабельный пул, специфически изменяющийся при введении МФТП, изатина или обоих этих веществ. При этом введение нейропротектора изатина существенно уменьшало число Rpn10-связывающих и изатинсвязывающих белков МХ и у контрольных животных, и у животных с индуцированным паркинсонизмом. Поскольку при введении нейропротекторной дозы изатина (100 мг/кг), использованной в данном исследовании, его концентрация в мозге может достигать уровня, вызывающего апоптоз клеток *in vitro*, индуцированное изатином сужение репертуара как изатин-связывающих, так и Rpn10-связывающих белков МХ мозга, по-видимому, способствует переключению механизма целенаправленного удаления отдельных поврежденных белков на более эффективную («глобальную») элиминацию поврежденных органелл и клеток. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 16-04-00173а и 15-04-01545а).*

ПРЯМОЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ФИШИНГ НОВЫХ БЕЛКОВ-ПАРТНЕРОВ ТРОМБОКСАНСИНТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

А.В. Свирид[1], П.В. Ершов[2], Е.О. Яблоков[2], Л.А. Калужский[2], Ю.В. Мезенцев[2], А.В. Флоринская[2], Т.А. Сушко[1,3], Н.В. Струшкевич[1], А.А. Гилеп[1], С.А. Усанов[1], А.Е. Медведев[2], А.С. Иванов[2]
[1]Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь; [2]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия; [3]Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Тромбоксансинтаза (TBXAS1) катализирует реакцию изомеризации простагландина H_2 с образованием тромбоксана A_2 – аутокринного и паракринного фактора многих клеток. Высокая активность и метастабильность этих производных арахидоновой кислоты позволяют предположить существование супрамолекулярных структур, участвующих в регуляции биосинтеза и адресной транслокации тромбоксана к рецептору.

Целью настоящей работы была идентификация белков-партнеров TBXAS1 из лизата ткани печени человека с использованием комплексного подхода, основанного на применении технологии прямого молекулярного фишинга, LC-MS/MS идентификации белков и валидации белок-белкового взаимодействия с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) [1]. В результате проведенных исследований идентифицированы 12 потенциальных белков-партнеров TBXAS1. В их числе компоненты, регулирующие организацию цитоскелета (BBIP1 и ANKMY1); компоненты коагуляционного каскада крови (SERPINA1, SERPINA3, APOH, FGA и FN1); и ферменты метаболизма ксенобиотиков и эндогенных биорегуляторов (CYP2E1 и CYP11B2). SPR валидация на биосенсоре Biacore 3000 подтвердила эффективность взаимодействия TBXAS1 с CYP2E1 (K_d=(4,3±0,4)×10^{-7} М) и CYP11B2 (K_d=(6,9±0,3)×10^{-7} М). Полученные нами результаты позволяют предположить важность взаимодействия данных гемопротеинов в регуляции биосинтеза эйкозаноидов, а также дают основание предполагать наличие у TBXAS1 других функций, таких как участие в функционировании цитоскелета и регуляция биосинтеза биологически активных молекул. *Работа была поддержана грантом РФФИ 16-54-00097 Бел_а.*

Литература

1. Иванов и др. Биоорганическая химия, 2016, 42, 18-27.

ТАРГЕТНАЯ ПРОТЕОМИКА ЛИМФОЦИТАРНОГО ФОСФАТАЗА-АССОЦИИРОВАННОГО ФОСФОПРОТЕИНА (LPAP)

Н.А. Круглова, А.Т. Копылов, Т.Д. Мешкова, А.В. Филатов
ГНЦ "Институт иммунологии" ФМБА России, Москва, Россия

Лимфоцитарный фосфатаза-ассоциированный фосфопротеин LPAP – трансмембранный белок, образующий комплекс с фосфатазой CD45 и способный взаимодействовать с киназой Lck и корецепторами CD4 или CD8. Детали взаимодействия и трехмерная структура белка не установлены. Функция LPAP неизвестна, лишь косвенные данные указывают на то, что он участвует в дифференцировке В-клеток. LPAP – множественно фосфорилированный белок и уровень его фосфорилирования меняется при активации лимфоцитов, однако сайты фосфорилирования LPAP были обнаружены только в полнопротеомных исследованиях. Для того чтобы уточнить сайты фосфорилирования, выяснить их функциональное значение и описать интерактом LPAP, мы провели таргетный протеомный анализ этого белка. Несмотря на небольшой размер LPAP, его масс-спектрометрический анализ связан со значительными трудностями. LPAP не имеет лизинов, поэтому трипсинолиз идет только по немногочисленным аргининам, и в интересующей области с потенциальными сайтами фосфорилирования получаются гомодетные гетеромерные пептиды длиной до 40 а.о. Более приемлемые по длине пептиды были получены при обработке белка пепсином в агрессивной кислой среде. Масс-спектрометрические данные были дополнены результатами, полученными с помощью направленного мутагенеза, фосфоаффинного электрофореза с Phos-tag, двумерного электрофореза, а также фосфоспецифических антител. Методами таргетной протеомики было подтверждено, что LPAP фосфорилирован по трем сайтам: Ser-99, Ser-153 и Ser-163, описанным ранее в панорамных протеомных исследованиях, а также был обнаружен один дополнительный сайт – Ser-172. Было установлено соответствие между наблюдаемыми протеоформами LPAP и фосфорилированием по определенным сайтам, а также рассчитана стехиометрия протеоформ и индивидуальных сайтов фосфори-

лирования. С помощью полученных фосфоспецифических антител нам удалось детектировать фосфорилирование LPAP в первичных лимфоцитах. Для определения белков-партнеров был проведен анализ субпротеома LPAP. С этой целью с помощью моноклональных антител против разных эпитопов белка выделяли LPAP и масс-спектрометрически идентифицировали ко-иммунопреципитированные белки. Полученные данные свидетельствуют о динамическом характере фосфорилирования LPAP и поддерживают нашу гипотезу о том, что LPAP имеет сигнальную функцию.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ Fdx, FprA И FdR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ СПОСОБНОСТИ ВЫСТУПАТЬ В КАЧЕСТВЕ РЕДОКС-ПАРТНЕРОВ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ CYP124 И CYP125

А.А. Ковалевский, Т.С. Варакса, Д.О. Дормешкин, И.П. Грабовец, А.А. Гилеп
Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Геном *Mycobacterium tuberculosis*, основного возбудителя туберкулеза, кодирует 20 цитохромов P450, функция большинства из которых не установлена. Тем не менее, показано участие ряда данных белков в патогенезе туберкулеза. Таким образом, цитохромы P450 *M. tuberculosis* являются перспективными мишенями противотуберкулезной терапии. Изучение цитохромов P450 *M. tuberculosis* ограничено малым количеством информации о редокс-партнерах, и, соответственно, невозможностью полноценной реконструкции ферментативных систем in vitro. Типичные прокариотические цитохромы P450 осуществляют ферментативные реакции с участием двух редокс-партнеров. В большинстве случаев это железосерный белок ферредоксин и ФАД-содержащая ферредоксин редуктаза, получающая электроны от НАД(Ф)Н. В геноме *M. tuberculosis* закодирован ряд ферредоксинов различных семейств. Тем не менее, только для [3Fe4S] ферредоксина Fdx (Rv0763c) показана способность переносить электроны на один из микобактериальных цитохромов P450 – CYP51 – в системах с ферредоксин-редуктазами FprA и FdR (Rv0688). Нами были получены высокоочищенные рекомбинантные белки Fdx и FprA и FdR. При сравнительной оценке способности к восстановлению CYP124 и CYP125 *M. tuberculosis*, полученные белки оказались не способны к поддержанию каталитической активности данных цитохромов в реконструированной системе. Что указывает на использование CYP124 и CYP125 других редок-партнеров либо необходимость в присутствии модуляторов для осуществления переноса электронов.

СРАВНЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ ПЕПТИДОВ ПЛАЗМЫ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Н.В. Захарова, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.Ю. Шорникова, А.С. Кононихин, И.А. Попов, Е.Н. Николаев
[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва; [2]Московский физико-технический институт, Долгопрудный; [3]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва; [4]Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, Москва; [5]Сколковский институт науки и технологии, Москва, Россия

Плазма крови представляется одним из самых подходящих объектов для поиска биомаркеров, поскольку в ней содержится широкий набор белков и пептидов, которые могут обеспечивать важную информацию о многочисленных процессах, протекающих в организме. Разработка универсальных высокоэффективных методов экстракции пептидов плазмы остается очень важной исследовательской задачей. Мы сравнили четыре типа эффективных подходов для экстракции пептидов плазмы с целью выявления универсальных методов, которые могли бы обеспечить выявление широкого набора пептидов: а) ультрафильтрацию (УФ) с последующей гель-фильтрацией плазмы, смешанной с ацетонитрилом (ACN); (б) умеренную катионообменную твердофазную экстракцию (ТФЭ); (в) органическое осаждение (ОО) ACN; и (г) дифференциальную солюбилизацию (ДС) ацетонового осадка в ACN. Полученные низкомолекулярные фракции анализировали ЖХ-МС/МС, которую проводили на системе нано ЖХ Agilent 1100, сопряженной с LTQFT Ultra тандемным масс-спектрометром. Выявленные пептиды идентифицировали, используя программу MascotServer 2.2 и базу данных Swissprot_human. Результаты ЖХ-МС/МС указывают на то, что ДС является самым эффективным методом, который выявил 681пептид, тогда как УФ, ТФЭ и ОО выявили 396, 366 и 261, соответственно. Лишь небольшую часть выявленных пептидов удалось далее идентифицировать при помощи Mascot (12,8%, 8,3%, 38,3% и 32,6%, соответственно). В сумме было идентифицировано 286 пептидов (из 55 белков), из которых 57 пептидов были экстрагированы более, чем одним методом, лишь 3 пептида – тремя методами и ни один из пептидов не экстрагировался всеми четырьмя использованными методами. Это подразумевает, что ни один из использованных методов экстракции не является универсальным. Полученные результаты указывают на то, что применение различных типов методов экстракции пептидов плазмы может существенно увеличивать эффективность выявления новых биомаркеров. Выбор оптимального источника потенциальных биомаркеров (сыворотка или плазма, тип антикоагулянта) также представляется важным для каждой отдельной задачи, поскольку увеличенное количество продуктов деградации преобладающих белков (в случае сыворотки)5,6 может маскировать пептиды в минорных концентрациях. *Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда 16-14-00181.*

СРАВНЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ПРОФИЛЕЙ КЛЕТОК ЛИНИИ NK-92, ИНДУЦИРОВАННЫХ ИНТЕРЛЕЙКИНОМ 1β ИЛИ ФОРБОЛ-12-МИРИСТАТ-13-АЦЕТАТОМ

А.В. Кореневский, А.Д. Щербицкая, Д.О. Баженов, Д.И. Соколов, С.А. Сельков
НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

Одним из подходов для диагностики заболеваний человека является оценка комплекса белков, отвечающих за реализацию той или иной физиологической функции в сравнении с профилем здорового человека. Выявление изменений в содержании отдельных белков под влиянием различных факторов на клетки позволяет обнаружить биологические маркеры патологий и описать происходящие молекулярные процессы. В настоящей работе проведено сравнение белковых профилей интактных клеток линии NK-92, а также этих клеток, активированных форбол-12-миристат-13-ацетатом (PMA) или интерлейкином 1β (IL-1β). Известно, что первый является универсальным индуктором апоптоза, а второй вызывает изменение фено-

типа NK-клеток. Равные количества клеток линии NK-92, NK-92+PMA и NK-92+IL-1β были отмыты от питательной среды и разрушены в гомогенизаторе. Фракции мембран осаждали за счет центрифугирования (16000 g). Белки супернатанта осаждали ледяным ацетоном с последующим центрифугированием (15000g). Осадок высушивали и растворяли в воде. Концентрации белка измеряли по методу Бредфорда, для разделения белков по изоэлектрической точке брали по 17,6 мкг белка. Разделение белков (pH 3–10) проводили на фракционаторе 3100 OFFGEL (Agilent) с последующим электрофорезом фракций на чиповом биоанализаторе 2100 Bioanalyzer (Agilent). Анализ электрофореграмм показал различие белковых профилей фракций клеток линии NK-92 и клеток с индукторами. Мажорной компонентой (84,6% от общего белка) фракции с pH 3,29–3,58 трех проб стали белки с молекулярным весом 13,4 кДа. Наибольшие отличия были обнаружены во фракциях с умеренно-кислым pH. При pH 4,17–4,46 в клетках NK-92 преобладают (30,3%) белки весом 16,8 кДа, в клетках NK-92+PMA мажорными (40,8%) являются белки с молекулярным весом 29,7 кДа, в пробе NK+IL-1β преобладают (55,1%) белки с весом 14 кДа. При pH 4,46–4,75 в клетках NK-92 преобладают (18,4%) белки с молекулярным весом 69,5 кДа, в клетках NK-92+PMA 49,8% общего белка составляют белки с молекулярным весом 83,1 кДа, а в NK-92+IL-1β 21,9% – белки с весом 19,5 кДа. При pH 5,63–5,92 в клетках NK-92 мажорной компонентой (33,4%) являются белки весом 61,8 кДа, тогда как в клетках с индукторами – 74,0 кДа (45,8%). Таким образом, индукторы влияют на изменение белкового профиля клеток линии NK-92. *Поддержано грантом РНФ № 17-15-01230.*

АНАЛИЗ СПЕЦИФИЧНОСТИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ СЕРПИНА КАМЧАТСКОГО КРАБА *PARALITHODES CAMTSCHATICUS*

Н.Н. Костин[1,2], Т.В. Бобик[2], И.В. Смирнов[2], Г.Н. Руденская[1], А.Г. Габибов[1,2]
[1]Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Камчатский краб (КК), лат. *Paralithodes camtschaticus* – коммерчески важное ракообразное, обитающее в Беринговом и Баренцевом морях при экстремально низких температурах, близких к 0°C. Его основной пищеварительный орган, гепатопанкреас, богат психрофильными протеиназами, некоторые из них были ранее описаны, на их основе получен коллагенолитический препарат «Морикраза». Из него же был выделен белковый ингибитор протеиназ, который был отнесен к классу серпинов, суперсемейству белков, обладающих уникальным механизмом необратимого суицидального ингибирования. При помощи данных N-концевого секвенирования и поиска в базах данных из библиотеки кДНК гепатопанкреаса камчатского краба была получена первичная структура, обладающая характерными для представителей этого семейства элементами. Функциональный рекомбинантный белок был получен путём оверэкспрессии в *E. coli* и ренатурации из телец включения с предварительным подбором условий. С целью выяснить его специфичность было проверено его взаимодействие с различными сериновыми и цистеиновыми протеазами, такими как тромбин, протеиназа К, катепсин Б, химотрипсин, трипсин, папаин, субтилизин А, из которых только с трипсином серпин РС взаимодействует по ингибиторному пути, с образованием ковалентного, устойчивого комплекса протеиназа-ингибитор. Это взаимодействие было охарактеризовано кинетически: стехиометрия ингибирования (SI, SI=(k4+k3)/k4) составила 4,7±0,8, k2=0,049±0,019 s-1, Ki=21±10 nM, а общая константа ассоциации второго порядка kass=(2,3±0,7)×10^6 M-$1s^{-1}$. Для того чтобы прояснить роль серпина РС в организме КК было исследовано распределение его транскрипта и зрелого белка по тканям, методами ОТ-ПЦР в реальном времени и Вестерн-блоттинга, соответственно. Было показано, что среди исследованных тканей зрелый белок сосредоточен в основном в мышцах и, немного, в сердце. Наибольший уровень мРНК был обнаружен в гемоцитах и сердце. *Исследование выполнено в рамках проекта РНФ № 16-14-00191*

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПОПЕПТИДОВ С АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *BACILLUS SUBTILIS*

А.М. Марданова, Г.Ф. Хадиева, М.Т. Лутфуллин, И.В. Хиляс, М.Р. Шарипова
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия

В птицеводстве пробиотики на основе бактерий рода Bacillus способствуют ускорению роста и развития цыплят, повышают иммунитет и являются перспективной альтернативой антибиотиков [Novak et al., 2011; Li et al., 2016]. Бактерии рода Bacillus секретируют большое количество метаболитов с антимикробной активностью, что лежит в основе их антимикробной способности. Из ризосферы картофеля и почвы нами выделено 30 штаммов бактерий, идентифицированных как Bacillus subtilis. В геномах этих бактерий с помощью ПЦР амплификации идентифицировали гены, ответственные за синтез липопептидов (итурин, фенгицин, сурфактин и бациллолизин) и дипептидного антибиотика бацилизина. У 30% штаммов обнаружили гены синтеза всех пяти пептидов. Исследуемые штаммы проявляли антагонистическую активность в отношении фитопатогенных микромицетов рода Fusarium и Alternaria, а также патогенных бактерий *Salmonella enterica, Escherichia coli, Klebsiella oxytoca* and *Pseudomonas aeruginosa*. Подобрана среда для оптимального синтеза и накопления в среде липопептидов. Фракция липопептидов выделена из культуральной жидкости активных штаммов при подкислении среды до pH 2,5. Образующийся осадок отделяли центрифугированием и ресуспендировали в смеси метанол-PBS (50/50). Метанол-растворимую фракцию использовали для HPLC хроматографии на обратно-фазной колонке Acclaim® PolarAdvantage II (PA2) C18 (5 μm, 250×4,6 mm) и системе UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Dionex, USA) как описано [Roy et al., 2013]. Фракции отдельных пептидов исследовали на антагонистическую активность в отношении грибов и бактерий дисково-диффузионным методом. Показали, что разные пептидные фракции проявляли антигрибную и антибактериальную активность. Штаммы, активные продуценты липопептидов, могут рассматриваться как перспективные для создания пробиотиков. *Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров, при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-04062).*

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ ВНЕКЛЕТОЧНОГО pH

А.Н. Орса, А.А. Можаев, В.И. Мартынов, И.Е. Деев, А.Г. Петренко, А.А. Пахомов
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Поддержание кислотно-щелочного равновесия имеет критическое значение в жизнедеятельности организма и регуляции метаболизма. Считается, что pH крови и внеклеточной среды организма должен быть близким к значению 7.4, а его отклонения в физиологических условиях минимальными. Однако существуют ряд областей в организме животных, в которых значение pH внеклеточной жидкости может сильно отличатся от pH 7.4. Целью данной работы является получение генетически кодируемых флуоресцентных белков для измерения внеклеточного pH в живом организме. Белок SypHer3 является флуоресцентным GFP-подобным белком. Измерение отношения флюоресценции протонированной формы к свечению анионной формы позволяет использовать его в качестве pH сенсора в области pH от 7.4 до 9.0. Для получения сенсора внеклеточного pH на основе этого белка мы сделали несколько химерных конструкций для экспрессии в эукариотических клетках. В вектор pSeqTag, содержащий последовательность, кодирующую лидерный пептид для внеклеточной экспрессии белков, была клонирована кДНК белка SypHer3, а также последовательность, кодирующая трансмембранный участок человеческого рецептора инсулина. Продуцируемый белок, названный SypHer3-TM, экспрессировался на мембране с внеклеточной стороны, а также содержал myc- и His-таги на С-конце. Аналогично мы получили еще две конструкции с трансмембранными участками от человеческих рецепторов Erbb2 и TrkA. При трансфекции эукариотической клеточной линии HEK293 вышеописанными конструкциями мы показали, что часть белка выходит на поверхность клеток. При титровании клеток буферными системами с различными pH мы показали, что эти белки могут работать в качестве pH сенсоров в диапазоне pH 7.4-9.0, а также построили калибровочные кривые зависимости флюоресценции этих белков от внеклеточного pH. В дальнейшем планируется использовать этих конструкций для получения трансгенных мышей, экспрессирующих белковые флуоресцентные pH сенсоры. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 14-50-00131.*

РАЗЛИЧИЯ В ПРОФИЛЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ МЕЖДУ ВНЕ- И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ

О.Л. Воронина[1], Е.И. Аксенова[1], М.С. Кунда[1], А.Н. Семенов[1], Н.Н. Рыжова[1], Н.Е. Шарапова[1], А.А. Замятнин[2,3], А.Л. Гинцбург[1]
[1]ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия; [2]ФГБУН Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия; [3]Universidad Técnica Federico Santa Maria, Valparaiso, Chile

Заболевание легких может быть вызвано разнообразными возбудителями. Они используют различные пути колонизации организма-хозяина и могут вырабатывать устойчивость к широкому спектру защитных механизмов. Тем не менее, большая часть бактерий, инфицирующих организм-хозяин, как правило, бывает уничтожена. Опубликованные данные описывают эффект убитых бактерий на усиление воспаления в организме-хозяине, мы же обратили внимание на большое количество пептидов, образующихся при протеолизе бактериальных белков. *Achromobacter ruhlandii* (*Aruh*) и *Mycobacterium bovis* (*Mbov*), относящиеся к внеклеточным и факультативным внутриклеточным патогенам, были объектами нашего исследования.

Секвенированные геномы *A. ruhlandii* strain SCCH3:ACH 33-1365 (GenBank Accession Number CP017433.1) and *M. bovis* BCG Russia 368 (CP009243) анализировали с помощью специализированных ресурсов. База данных EROP-Moscow, включающая 14511 записей (http://erop.inbi.ras.ru/), была использована для предсказания последовательностей физиологически активных пептидов. Протеом *Mbov* включал 4287 белков, что в 1.3 раза меньше, чем *Aruh*, однако 67% белков *Mbov* и только 42% белков *Aruh* были источниками пептидов, аналогичных природным с физиологической активностью. Количество пептидов *Mbov* (7761) было в 2 раза больше, чем *Aruh*, а разнообразие пептидов *Mbov* (549 EROP-Moscow Accession Numbers, EROPs) было в 1.7 раза выше. Пептиды относились к большому количеству функциональных групп, число которых было равным для протеомов обеих бактерий. Самыми многочисленными были группы нейропептидов, ингибиторов ферментов и пептидов с неизвестной функцией. Наиболее часто встречался ингибитор ферментов “ALPP” в *Aruh* и пептид “DAGAG” с неизвестной функцией в *Mbov*. 7 наиболее часто встречающихся EROPs *Aruh* также были часто встречающимися в протеоме *Mbov*. Среди них нейропептид “GGGG”, который повторялся 122 раза в протеоме *Aruh* и 326 в *Mbov*. Следует отметить, что самый большой олигопептид из 9 аминокислотных остатков, являющийся иммунорегулятором, встречался в обоих протеомах. Таким образом, образование физиологически активных пептидов – одна их важных характеристик взаимодействия патоген-хозяин, которую следует принимать во внимание при лечении заболевания.

СТРУКТУРНЫЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗЫ ШЕСТОГО САЙТА АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА НЕЙРЕКСИНА

О.В. Серова, Ю.Н. Некрасова, Д.М. Шаяхметова, И.Е. Деев, А Г. Петренко
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Нейрексин – нейрональный пресинаптический белок, мишень токсина из яда паука каракурта. У млекопитающих найдены три высокогомологичных нейрексина, которые кодируются тремя разными генами: NRXN1, 2 и 3. Каждый ген находится под контролем двух отдаленных промоторов, в результате чего образуются длинные формы рецепторов – α-нейрексины 1–3 и короткие – β-нейрексины 1–3. Внеклеточная часть α-нейрексинов состоит из трех модулей, содержащих два LNS домена (Laminin, Neurexin, Sex-hormone binding protein domain, также называемый Laminin G domain), между которыми располагаются три EGF-подобных домена. Внеклеточная часть β-нейрексинов содержит единственный домен LNS. Нейрексины подвергаются обширному альтернативному сплайсингу, в результате чего образуются тысячи различных изоформ. Известны 5 сайтов сплайсинга (SS1-5) в α-нейрексинах, два из которых (SS4 и SS5) встречаются также в β-нейрексинах. Для нейрексинов известны несколько эндогенных лигандов. Специфичность взаимодействия нейрексинов с различными лигандами регулируется альтернативным сплайсингом рецептора. Таким образом, альтернативный сплайсинг регулирует функциональную активность нейрексинов и, предположительно, является фактором, определяющим специфичность взаимодействия нейронов. В настоящей работе был обнаружен новый шестой сайт сплайсинга (SS6) α-нейрексина 1 из мозга крысы, который располагается между пятым LNS и третьим EGF-подобным доменами. Вставка в этой области соответствует 9-членной аминокислотной последовательности VALMKADLQ, консервативной среди организмов животных. Мы провели анализ экспрессии

изоформы α-нейрексина 1, содержащей вставку в обнаруженном шестом сайте сплайсинга, с использованием ПЦР в реальном времени. Из четырех органов крысы, которые мы проанализировали, а именно мозг, печень, почки и поджелудочная железа, только в головном мозге была обнаружена изоформа рецептора, содержащая вставку в сайте SS6, тогда как сплайс-вариант без вставки был обнаружен во всех четырех органах. Таким образом, вставка в сайте SS6 может регулировать специфичность взаимодействия нейрексина 1 с лигандами в разных тканях. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-50-00131) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМА МИТОХОНДРИЙ МОЗГА МОЛОДЫХ И СТАРЕЮЩИХ КРЫС

А.В. Иванчик, М. Травкина, М.А. Шапиро, Л.И. Надольник, С.А. Усанов, А.В. Янцевич
Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Введение. Стресс – неспецифическая реакция организма на внешнее воздействие, приводящая к изменениям процессов свободно-радикального окисления, нарушению гомеостаза ионов и энергетического метаболизма, что может являться причиной возникновения ряда патологических состояний. Особенно чувствительны к воздействию стресса клетки нервной ткани. Поскольку энергетическая потребность последних высока, они содержат значительное количество митохондрий; и нарушение их функций, обусловленное воздействием стресса, приводит к ряду заболеваний и преждевременному старению. На данный момент молекулярные механизмы действия психоэмоционального стресса на энергетическую систему клетки мало изучены. Целью данной работы являлось установление закономерностей изменений протеома митохондрий мозга (крыс), вызванных стрессом, для оценки возможных негативных эффектов и способов их предотвращения. Методы исследования. Для выделения суммарного белка митохондрий использовали хлороформ-метанольный метод. Для анализа протеома использовали панорамный анализ с использованием тандемного масс-спектрометрического детектора Q-TOF 6550 и программный пакет Spectrum Mill. Результаты и обсуждение. В ходе исследования установлено, что под действием психоэмоционального стресса изменяется белковый состав всех структурных компонентов митохондрий мозга: матрикса, внутренней и внешней мембраны. Для молодых животных подвергнутых стрессу выявлено 17 белков (матрикс – 10, внутренняя мембрана – 4, внешняя мембрана митохондрий – 3), по которым наблюдаются отличия по сравнению с контролем. Для стареющих животных – 14 белков (матрикс – 9, внутренняя мембрана – 5). Стресс приводит к экспрессии белков катаболизма валина (3-гидрокси-изобутирил КоА гидролаза)), биосинтеза нейромедиаторов (CYP2D4), ассоциации гексокиназы-2 с внешней мембраной митохондрий и целому ряду других изменений. Эти изменения связаны с изменением режима работы энергетической системы нейронов. Отличия наблюдаемые для молодых и стареющих животных указывают на различные адаптационные механизмы этих возрастных групп. Таким образом, полученные данные об изменении протеома позволяют оценить энергетические и биохимические последствия психоэмоционального стресса.

ДЕНДРИМЕРЫ И ИМИНОПЕПТИДЫ НА ОСНОВЕ ФОРМАМИДА

Л.Ю. Скляров, И.В. Назимов *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Кором белков и пептидов можно считать гетероциклические, ароматические соединения – порфирины, корины, пиридины, фенолы и ряд других конденсированных соединений осуществляющих жизненно важные функции. Кором для синтеза первых мультиплетных пептидов послужили полифункциональные производные и гетероциклы полученные на основе реакции формамида и фумаронитрила. Необычно физико-химические свойства образующихся полифункциональных гетероциклов – сильная флуоресценция и высокая реакционная способность боковых групп, были использованы как для синтеза порфиразиинов и их дендримеров, так и для разработки аналитических методов. Широкий спектр флуоресценции мультиплетных производных порфиразина (400–900 nm) позволил наблюдать связывание этих соединений с раковыми клеточными линиями методом проточной цитофлуориметрии. Показана возможность связывания полученных соединений с ионами щелочно-земельных, тяжелых, платиновых металлов и способностью образовывать суспензию нано частиц с узким распределением по размерам. Высокая реакционная способность нитрильных групп в гетероциклах позволяет рассматривать их как перспективные би- и полифункциональные флуоресцентные реагенты и обратимые метки. Получены аналоги известных противомикробных и нейроактивных препаратов. Показана возможность включения флуоресцентных аналогов аминокислот в раковые клеточные линии с последующим разделением на сортере. Показана возможность гидролиза и образования иминопептидов из полученных гетероциклов, что позволило разработать вариант сиквиенса с использованием масс-спектрометрии. Рассматривается возможный механизм ретро реакции с образованием реакционного аддукта, способного к ряду превращений, в том числе и в производные пептидов, пиррола, дендримеров. Модельные реакции динитрильных производных с аминами аминокислотами, гидроксиламином и гидразином привели к образованию моно и дизамещенных имидов. Диамны способны образовывать макроциклы и полимеры. Наличие дополнительного протона в пике молекулярной массы позволяет уточнять строения и свойства получаемых соединений. Управление режимом распада модифицированных ароматическими, заряженными или гидроксильными группами пептидов, позволяет управлять механизмом распада, что значительно облегчает масс-спектрометрический сиквиенс.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ДЕФЕНЗИНА СЕМЯН СЕДАНЫ *NIGELLA SATIVA* L.

Ш. Турдикулова[1], Ю. Ощепкова[1], В. Цой[1], А. Йили[2], Ш.И. Салихов[1] *[1]Институт биоорганической химии им. А.С. Садыкова АН РУз, Ташкент, Узбекистан; [2]Синьзяньский физико-химический институт, Китай*

Широкое применение антибиотиков в качестве лечебных препаратов вызывает появление устойчивых форм микроорганизмов, у которых клинически существенная резистентность возникает за период от нескольких месяцев до нескольких лет. Принципиально новым классом природных антибиотиков, которые будут введены в клиническую практику, являются так называемые антимикробные пептиды. Путем комбинации различных методов жидкостной хроматографии (аффинной, ионообменной, эксклюзионной и высокоэффективной обращенно-фазовой) из семян чернушки посевной *Nigella sativa* выделены антимикробные пептиды, для которых были определены молекулярные массы методом MALDI масс-спектрометрии и N-концевые аминокислотные последовательности автоматическим секвенированием по Эдману. Установлено, что данные со-

единения являются гомологами D-дефензинов, ранее выделенных и описанных исключительно для растений семейства Капустные (Brassicaceae) и обладающих очень высокой антифунгальной и антибактериальной активностью. На основе аминокислотной последовательности пептида, была синтезирована нуклеотидная последовательность гена, кодирующего Ns-D2 дефензин, оптимизированная для экспрессии в клетках *E. coli*. Получена рекомбинантная ДНК вектор-конструкция pRSET_A с клонированным геном дефензина *Ns-D2* под регулируемым промотором, гистидиновой меткой и энтерокиназным сайтом. Впервые получен рекомбинантный пептид дефензина *Ns-D2* в клетках *E. coli* штамма C-43, наличие рекомбинантного пептида подтверждено методами PAGE гель электрофореза и Вестерн Блот анализа His-tag антителами. Очистка рекомбинантного пептида осуществлялась методом металл-аффинной хроматографии на Ni-сефарозе с последующей обработкой ферментом энтерокиназой. Чистую фракцию рекомбинантного *Ns-D2* дефензина получали методом высокожидкостной хроматографией. Полученная форма рекомбинантного пептида по результатам масс-спектрометрического анализа соответствовала природной форме *Ns-D2* дефензина семян чернушки посевной *Nigella sativa*.

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ФОРМА РЕНАЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА ЛИШЕНА СТРУКТУРНОГО КОМПОНЕНТА, НЕОБХОДИМОГО ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ FAD

В.И. Федченко, А.Т. Копылов, Н.В. Пятакова, О.А. Бунеева, В.Г. Згода, А.Е. Медведев
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Реналаза – секреторный белок, играющий важную роль в регуляции артериального давления. Считается, что основным источником секретируемой в кровь реналазы являются почки. По данным нашей и других лабораторий синтезируемый в клетках полноразмерный белок реналазы является флавопротеином и содержит N-концевой сигнальный пептид (1-17 аминокислотных остатков (а.о.)), который отвечает за секрецию реналазы из клеток и который перекрывается с т.н. укладкой Россмана (2-32 а.о.), необходимой для размещения кофактора FAD. Последний необходим для выполнения каталитических функций внутри клетки. До сих пор окончательно не выяснено, в каком виде реналаза циркулирует в крови, т.к. все применяемые на сегодняшний день методы основываются на иммуноферментной детекции этого белка. Для выяснения вопроса, содержит ли внеклеточная реналаза N-концевой сигнальный пептид, нами был использован оптимизированный масс-спектрометрический метод детекции «диагностических» пептидов реналазы, включая N-концевую сигнальную последовательность. При экспрессии рекомбинантной реналазы человека в клетках HEK293T этот белок обнаруживался как внутри клеток, так и во внеклеточной (культуральной) среде. Однако в отличие от внутриклеточного белка (и рекомбинантной реналазы, экспрессированной в клетках *E. coli*, и использованной в качестве препарата сравнения) внеклеточная реналаза не содержала N-концевого сигнального пептида. Сравнительный протеомный анализ триптических пептидов выделенной реналазы мочи человека также выявил не этого пептида. Полученные результаты свидетельствуют о том, что внеклеточная форма реналазы человека лишена структурного компонента, необходимого для связывания FAD, и, следовательно, возможный антигипертензивный эффект циркулирующей реналазы не связан с FAD-зависимыми механизмами. Очевидно, что внутриклеточная и внеклеточная реналазы – два белка, выполняющие различные функции в организме. *Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы поддержана грантом РФФИ № 17-04-00484 (2017-2019).*

ОСНОВНЫЕ ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА 5-OXO-PRO-ARG-PRO В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И КРОВИ КРЫС ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ И ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ

К.В. Шевченко, И.Ю. Нагаев, В.П. Шевченко, Л.А. Андреева, С.И. Шрам
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Синтезирован меченный тритием аналог тиролиберина 5-oxo-Pro-Arg-Pro (5-oxo-PRP). Исследована степень проникновения этого пептида в кровь и головной мозг крыс. Изучены основные пути его метаболизма при внутривенном и интраназальном способах введения. Показано, что 5-oxo-PRP и его метаболиты обнаруживаются в мозге крыс уже через 5 мин после его внутривенного или интраназального введения. Зависимость содержания радиоактивных компонентов в крови и мозге от времени при интраназальном введении имела выраженный максимум, при внутривенном введении имела убывающей характер. При внутривенном введении максимальное содержание 5-oxo-PRP в крови и мозге обнаруживалось через 5 мин и равнялось около 4360 и 90 нКи/г соответственно. В течение исследуемого периода времени (5–120 мин) содержание 5-oxo-PRP в крови и мозге снижалось примерно в 52 и 44 раза соответственно. Процентное содержание 5-oxo-PRP монотонно снижалось за этот период времени с 78 до 11% в крови и с 33 до 2% – в мозге. При интраназальном введении 5-oxo-PRP уровень исходного трипептида и всех анализируемых метаболитов был существенно ниже, чем при внутривенном введении. В крови максимум концентрации 5-oxo-PRP достигался через 30 мин (около 300 нКи/г), а в мозге – через 10 мин (около 22 нКи/г). Процентное содержание 5-oxo-PRP, в течение исследуемого периода времени (5–120 мин), снижалось с 87 до 45% в крови и с 34 до 5% в мозге. Установлено, что при интраназальном введении около 45% 5-oxo-PRP поступает в мозг путем прямого транспорта, а около 55% – опосредованно через кровь. Значительные различия между концентрациями 5-oxo-PRP в крови и мозге при внутривенном введении трипептида указывают на его слабую проницаемость через ГЭБ. При интраназальном введении различия в концентрациях 5-oxo-PRP в крови и мозге не столь велики. *Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий".*

ГЕН-ЦЕНТРИРОВАННАЯ ЭКСПЕРТНАЯ СИСТЕМА МОДЕЛИРОВАНИЯ, АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ОМИКСНЫХ ДАННЫХ ЧЕЛОВЕКА

А.Г. Шлихт, Н.В. Краморенко
Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Комплексный анализ и интерпретация больших массивов омиксных данных (генома, транскриптома, протеома, метаболома, реактома и др.) представляет собой сложную проблему системной биологии и биоинформатики. Эффективное решение данной проблемы может быть получено путем применении систем искусственного интеллекта. Нами разработана ген-

центрированная экспертная система (ЭС) моделирования, анализа и интерпретации омиксных данных человека, опирающаяся с одной стороны на многочисленные данные всемирных порталов (NCBI, KEGG, UniProt и др.) на базе референсного генома человека, а с другой стороны – на реальные экспериментальные данные секвенирования генома и масс-спектрометрии протеома человека. К сожалению, данные всемирных порталов не могут быть непосредственно применены в автоматическом режиме к интерпретации данных эксперимента, поскольку они представлены, как правило, в виде слабоструктурированных текстовых файловых систем, доступ к которым осуществляется в интерактивном режиме с визуальным анализом данных на экране. Поэтому в разработанной ЭС данные файловых систем порталов предварительно были импортированы и реструктурированы в интеллектуальный формат баз данных и знаний, созданы соответствующие хранилища омиксных данных. Это позволило перейти от традиционного интерактивного доступа к внешним серверам и использования процедурных языков (R, Python и др.) на основе текстовых строк к автономному автоматическому режиму работы с омикными данными с использованием высокоуровневых декларативных языков баз данных (T-SQL) и знаний для обработки реструктурированных интеллектуальных данных и знаний на локальных серверах (MS SQL Server 2008). Дополнительно интеллектуализация данных позволяет более эффективно обеспечивать полноту и непротиворечивость данных. Такой переход обеспечил возможность проведения комплексного высокопроизводительного автоматического анализа, моделирования и интерпретации омиксных данных: мутаций в генах, транскриптах, протеинах; поиска мотивов по всему геному, протеому; создания интегрированных диагностических систем; решению задач функциональной геномики и протеомики; решению задач генотип – фенотип. В ЭС отслеживаются обновления омиксных данных порталов и проводится соответствующая актуализация данных ЭС.

КОНКУРС МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37RV

Ю.А. Беспятых[1], Е.А. Шитиков[1], В.Г. Згода[2], А.В. Смоляков[1], М.З. Догонадзе[3], В.Ю. Журавлев[3], Е.Н. Ильина[1]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; [3]Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

На сегодняшний день протеомика стала неотъемлемым инструментом системной биологии и используется для функционального анализа информации, реализуемой геномом микроорганизма. При этом для ряда бактерий показано, что условия культивирования и состав среды могут сильно влиять на их физиологию, а соответственно и на протеомный профиль. Целью настоящего исследования было сравнительное протеомное профилирование штамма *M. tuberculosis* H37Rv, культивированного на двух разных питательных средах: Левенштейна-Йенсена (Л-Й) и Middlebrook 7H11. Безметочное протеомное профилирование *M. tuberculosis* H37Rv осуществляли с использованием Q-Exactive HF в режиме IDA. Для идентификации и квантификации белков были использованы программные пакеты Mascot v 2.5.1 и MaxQuant v 1.3.0.5, соответственно. Согласно полученным данным было идентифицировано 2230 белков штамма H37Rv. В ходе сравнительного анализа была обнаружена группа белков (n=34), которые встречалась исключительно в культуре *M. tuberculosis* H37Rv, культивируемой на среде Л-Й. Среди них выявлена фосфотидилтрансфераза (Rv1822), участвующая в синтезе фосфатидилинозитола из глицерина, содержание которого значительно выше в среде Л-Й. Фосфатидилинозитол является важным компонентом цитоплазматической мембраны микобактерий и задействован в Sec-зависимом транспорте веществ. При этом обнаружено всего 4 белка, которые встречаются только в культуре, выросшей на среде Middlebrook 7H11. В ходе количественного протеомного анализа выявлены достоверные различия в представленности фумаратредуктазы FrdB (Rv1553). Представленность фермента была выше в клетках микобактерий, культивированных на среде Л-Й. Фумаратредуктаза является одним из ферментов цикла трикарбоновых кислот и осуществляет обратимое восстановление фумарата до сукцината. В результате чего, можно сделать предположение, что на среде Л-Й микобактерии нуждаются в большей энергии, что обеспечивается за счет увеличенного синтеза данного фермента. Таким образом, в ходе проведенного исследования зафиксированы изменения в метаболизме микобактерий, которые могут свидетельствовать в пользу того, что среда Middlebrook 7H11 является более сбалансированной и оптимальной для роста *M. tuberculosis*. *Работа поддержана Российским научным фондом грант № 17-15-01412.*

ВКЛАД ПЕПТИДОВ *ACHROMOBACTER RUHLANDII* В ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС В ЛЕГКИХ

О.Л. Воронина[1], Е.И. Аксенова[1], М.С. Кунда[1], А.Н. Семенов[1], Н.Н. Рыжова[1], Н.Е. Шарапова[1], А.А. Замятнин[2,3], А.Л. Гинцбург[1]
ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи; [2]Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия; [3]Universidad Técnica Federico Santa María, Chile

Achromobacter ruhlandii ST36 – один из наиболее опасных микроорганизмов для больных муковисцидозом (МВ). Эти бактерии быстро адаптируются в респираторном отделе дыхательной системы с поврежденным МВТР: размножаются, формируют биопленки и начинают доминировать в микробном сообществе легких. Секретируемые белки, а также полипептиды, выходящие из лизированных или подвергнутых апоптозу клеток становятся мишенью для протеаз в альвеолах в условиях гипервоспаления. Целью нашего исследования была оценка разнообразия и функций потенциальных олигопептидов. Секвенированный геном штамма *A. ruhlandii* SCCH3:ACH 33-1365 (CP017433.1) был аннотирован посредством RAST. Сервер EROP-Moscow, база данных которого содержит 14511 природных олигопептидов (http://erop.inbi.ras.ru/), использован для предсказания физиологически активных пептидов в последовательности белков. 5727 белков было аннотировано в геноме штамма. 3798 последовательностей, идентичных природным олигопептидам (с 4, 5, 6, 7 и 9 аминокислотными остатками) было выявлено в 2408 белках. Олигопептиды были отнесены к 10 функциональным группам. Группы нейропептидов и ингибиторов ферментов были наиболее представительными. Наибольший интерес вызывали 47 белков различной локализации, каждый из которых был потенциальным источником 5 и более олигопептидов. Агглютинин RTX, секретируемый T1SS, продуцировал максимальное количество олигопептидов (13). Внеклеточные белки бактерии были источником 70, а периплазматические – 144 олигопептидов. 17 и 46 из них относились к ингибиторам ферментов, которые оказывали влияние на активность 2-х белков: дипептидил-аминопептидазы VI и ангиотензинпревращающего фермента. Оба белка локализованы на внешней поверхности клеток эндотелия, эпителия, нейроэпителиальных и клеток иммунной системы в респираторном отделе и участвуют в регуляции давления (АПФ) и влиянии на большие количество сигнальных молекул (ДППIV). Нейропепти-

ды, продуцируемые протеомом *A. ruhlandii*, могут служить существенной добавкой к многочисленным нейрорегуляторам, оказывающим влияние на гладкомышечные клетки и сосуды в легких. Таким образом, большое количество олигопептидов, предсказанных в протеоме *A. ruhlandii*, в малом объеме альвеол может создавать высокую концентрацию регуляторов, усиливающих воспаление в легких.

НОВЫЙ uORF-ЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛИРУЕТ ТРАНСЛЯЦИЮ мРНК eIF2D И MDM2 ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

К.А. Акулич[1,2,3], П.Г. Синицин[1,2], Д.Е. Андреев[2], И.М. Теренин[2,3], И.Н. Шатский[2], С.Е. Дмитриев[2,3,4]
[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики и [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; [4]Кафедра биохимии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Короткие рамки считывания (uORF), расположенные в 5'-нетранслируемых областях мРНК, обнаруживаются почти в половине человеческих транскриптов. Во многих случаях они значительно влияют на трансляцию основной кодирующей части и выступают в роли регуляторных элементов в условиях клеточных стрессов. Для объяснения их функций было предложено два молекулярных механизма: «отложенная реинициация» (описанная на примерах мРНК GCN4 дрожжей и ATF4 млекопитающих) и «торможение сканирующей рибосомы» (обнаруженная в случае мышиной мРНК DDIT3). Оба эти механизма обеспечивают преимущественную трансляцию соответствующих мРНК в условиях, когда инициаторный фактор eIF2 частично инактивирован фосфорилированием. Мы обнаружили новый uORF-зависимый регуляторный механизм, представленный в случае как минимум двух мРНК человека, которые кодируют трансляционный фактор eIF2D и убиквитин-лигазу MDM2. Описанные регуляторные элементы специфично уменьшают эффективность трансляции основной рамки считывания в условиях мягкого гиперосмотического стресса. Этот механизм также основан на изменении частоты реинициации, но при этом не обеспечивает устойчивость к фосфорилированию eIF2. Эксперименты в бесклеточной системе трансляции показали, что снижение частоты реинициации вызвано не повышением концентрации соли самой по себе. На основании полученных данных мы предполагаем существование в клетках млекопитающих особого сигнального пути, индуцируемого повышением осмотической силы, который приводит к uORF-зависимым изменениям трансляции отдельных мРНК.

ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ-МАРКЕРОВ ПРЕЭКЛАМПСИИ В МОЧЕ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

В.В. Байбакова[1,3], А.Е. Бугрова[2,4], К.Т. Муминова[2], В.А. Сергеева[1,3], Н.В. Захарова[1,4], М.И. Индейкина[3,4], Н.Л. Стародубцева[2], А.С. Кононихин[2], И.А. Попов[1,3], С. Ходжаева[2], В.Е. Франкевич[2], Е.Н. Николаев[1,3,4,5], Г.Т. Сухих[2]
[1]Московский физико-технический институт; [2]Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова; [3]Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН; [4]Институт биохимической физики им. Эмануэля РАН; [5]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Поиск биомаркеров преэклампсии (ПЭ) осуществляется с применением множества современных подходов, включая протеомику, представляющую собой комплексный анализ тысяч белков и пептидов. Моча – удобный биоматериал, легко доступный для рутинных исследований. Ранее при исследовании пептидома мочи беременных женщин было показано, что пептидами, специфичными для ПЭ, являются фрагменты альфа-1-антитрипсина (SERPINA1), альфа-цепи коллагена типов I и III, уромодулина и сывороточного альбумина (ALBU) [1,2]. Целью данной работы было выявить панель специфичных для ПЭ пептидов с помощью анализа ВЭЖХ-МС/МС и верифицировать наиболее значимые потенциальные маркеры с помощью технологии Western Blot. 100 образцов мочи трех разных групп пациенток (здоровые, умеренная и тяжелая ПЭ) были получены в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии им В.И. Кулакова. Все участвовавшие в исследовании пациентки предоставили письменное согласие об информированности, одобренное Комиссией по биомедицинской этике. Пептиды были выделены с помощью ультрафильтрации и размер-эксклюзионной хроматографии (SEC). ВЭЖХ-МС/МС анализ был проведен для всех выделенных образцов пептидов. Для пептидов были сравнены различные методики ПААГ электрофореза и в качестве наилучшего был выбран 4–20% градиентный Трис-трициновый-ПААГ электрофорез. Белки и пептиды переносились на мембрану и окрашивались антителами, специфичными к потенциальным маркерам ПЭ (Олигомер A11, ALBU и два поликлональных антитела к эпитопам SERPINA1). Нам удалось подтвердить некоторые предыдущие масс-спектрометрические результаты интересующих фрагментов с помощью Western Blot и описать наличие потенциальных пептидов-маркеров в образцах пациенток с разной степенью преэклампсии. *Работа по выделению пептидов выполнена при поддержке грантов РФФИ по. 17-08-01537 А, по. 16-54-21011_SNF_a, исследования пептидов с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения проведены при поддержке гранта РНФ по. 14-24-00114.*

Литература

1. I.A. Buhimshi et al. Sci. Transl. Med. 6, 245ra92 (2014)
2. А.С. Кононихин и др. J.Proteomics. 2016; 149: 38-43. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.04.024

ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ПЛАЗМЫ И МОЧИ КОСМОНАВТОВ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНЫХ КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТОВ

А.Г. Бржозовский[1], А.С. Кононихин[1,2], М.И. Индейкина[3,4], И.А. Попов[2,4], Л.Х. Пастушкова[1], Е.Н. Николаев[3,4,5], И.М. Ларина[1]
[1]Институт медико-биологических проблем РАН; [2]Московский физико-технический институт; [3]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля; [4]Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе; [5]Сколковский институт науки и технологии, Москва, Россия

Введение: Целью данной работы является проведение сравнительного полуколичественного анализа образцов крови и мочи космонавтов, до и после продолжительных космической полетов. Методы: Для проведения протеомного анализа использовался метод пробоподготовки «в жидкости». Идентификация полученной пептидной смеси проводилась методом тандемной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МСМС). Для полуколичественного анализа по методу label-free использовался программный пакет MaxQuant. Результаты: Для проведения исследования у космонавтов собирались образцы за полгода до полета, а также на 1 и 7 сутки после приземления. В результате в образцах мочи было выявлено 256 белков, имеющих один

или более уникальных пептидов. Характерными для <70% выборки являются 50 белков. Полуколичественного анализа по методу label-free позволил выявить 20 достоверно изменяющихся белков на +1 и +7 сутки относительно фона. В образах плазмы крови было выявлено 175 белков, имеющих один или более уникальных пептидов. Характерными для <70% выборки являются 54 уникальных пептидов. Полуколичественного анализа по методу label-free позволил выявить 9 достоверно изменяющихся на +1 сутки белков относительно фона. Большинство достоверно изменяющихся белков участвуют в регуляции биологических процессов, в иммунных процессах и в межклеточном взаимодействии, кроме того некоторые из этих белков являются стресс – белками и принимают участие в ответе на стимул. Анализ протеомных изменений у одних и тех же людей, совершающих несколько космических полетов, выявляет изменения белковой композиции между полетами. Выводы: Изменения уровня белков после длительных космических полетов, могут быть связанны с заключительным этапом полета (посадкой спускаемого аппарата) или быть результатом процесса адаптации к земным условиям. Также было выявлено, что в среднем значения белковых концентраций сходны на 1 сутки после полета, но все же они коррелируют с общим числом полетов. *Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда 14-24-00114.*

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЛЕКТИНА ИЗ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *GLYCYMERIS YESSOENSIS* В ОТВЕТ НА АНТРОПОГЕННОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ

Т.О. Мизгина[1,2], И.В. Чикаловец[1,2], В.И. Молчанова[2], О.В. Черников[2]
[1]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток; [2]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Двустворчатые моллюски, являясь придонными фильтраторами, оказываются адекватными биоиндикаторами загрязнения. Неслучайно мидии выбраны в качестве объекта для мониторинга прибрежных вод. Существование огромного числа и разнообразия моллюсков свидетельствует о наличии у них эффективных систем защиты собственного организма. Важную роль в их неспецифических иммунных реакциях, таких как агглютинация, фагоцитоз и лизис, играют углевод-связывающие белки – лектины. Методом гемагглютинации (ГА), который является стандартным тестом определения лектинов, были проанализированы гемолимфа и экстракты, полученные из органов двустворчатых моллюсков, обитающих в прибрежных водах б. Троица Японского моря. Высокий титр гемагглютинирующей активности был обнаружен в гемолимфе моллюска *Glycymeris yessoensis* – широко распространенного тихоокеанского вида. Последовательными методами аффинной и гель-проникающей хроматографии из гемолимфы моллюска был выделен лектин (GYL) с молекулярной массой 18118,5 Да по данным MALDI TOF масс-спектрометрии. Методом ГА установлено, что GYL является $Ca2^{+}$-зависимым, Gal/GalNAc – специфичным лектином, который проявляет активность в интервале pH 4–10 и полностью инактивируется при нагревании до 45°C в течение 30 минут. При всем многообразии работ, посвященных строению и филогении различных лектинов, данные о динамике их концентраций в ходе ответа на действие антропогенных загрязнителей очень ограничены. Методом иммуноферментного анализа было изучено изменение уровня лектина в зависимости от времени экспозиции животных с загрязняющими веществами. Обнаружено, что содержание GYL возрастает в 2,8 раза через 3 часа после внесения аликвоты дизельного топлива в аквариум с моллюсками. После этого концентрация его резко падает, что связано с быстрым расходованием лектина в ответ на борьбу с загрязнением и через сутки снижается практически до нуля. А через 48 часов увеличивается в 4 раза по сравнению с исходным уровнем, это связано, вероятно, с активацией процесса его синтеза. Таким образом, определение уровня лектинов двустворчатых моллюсков может быть использовано как для оценки биологического состояния беспозвоночных при их адаптации к различным экологическим и антропогенным воздействиям, так и являться одним из показателей загрязненности морской акватории.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО ИНТЕРАКТОМА СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА ТРОМБОКСАНОВ МЕТОДАМИ АФФИННОГО ОБОГАЩЕНИЯ И SHOTGUN-ПРОТЕОМИКИ

А.В. Свирид, М.А. Шапиро, А.А. Гилеп
Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Процесс формирования тромбоцитов и их активации зависит от множества факторов и синхронизированной работы ряда регуляторных каскадов. Несмотря на значительный объем исследований и важность для фармацевтики, на сегодняшний день отсутствует достаточная информация по взаимодействию активаторов и ингибиторов активации тромбоцитов (зачастую метастабильных соединений) и вызываемых ими изменениями в клетке. Все это затрудняет понимание цельной картины происходящего при созревании и активации тромбоцита. Целью данной работы было разработка подхода к определению интерактома ключевых ферментов-антагонистов, участвующих в регуляции этого процесса – CYP5A1 (тромбоксан синтаза) и CYP8A1 (простациклин синтаза). Получение аффинного сорбента заключалось в иммобилизации на CNBr-сефарозе 4B стрептавидина с последующей инкубацией в растворе сайт-специфически биотинилированных мишеней. Аффинное обогащение происходило за счет нанесение на сорбенты осветленного лизата тромбоцитарной массы (тромбоцитов не менее 1×10^{10}, конечная концентрация белка до 2 мг/мл). Элюция белков, образующих комплексы с мишенями, осуществлялась буфером с высокой ионной силой и детергентом (1% CHAPS). Элюаты подвергались обработке трипсином и полученные пептиды разделяли и детектировали с помощью Agilent 6550 Q-TOF LC/MS. Валидация и анализ данных осуществлялся в программном пакете Agilent Spectrum Mill MS Proteomics Workbench. Применение сайт-специфичного биотинилирования и добавление подвижной линкерной последовательности позволило произвести направленную иммобилизацию с сохранением нативной конформации белков – что выгодно отличает этот подход от традиционной прямой иммобилизации по ε-аминогруппам поверхностных лизинов. С помощью метода аффинного обогащения в сочетании с методами shotgun-протеомики (AP-MS) в растворимой фракции лизата тромбоцитов был определен ряд белков (в том числе, участвующих в регуляции процессов пролиферации процессов пролиферации и трансдукции внеклеточных сигналов), связывающиеся с CYP5A1 и CYP8A1, и предположительно участвующих в белок-белковых взаимодействиях с данными ферментами внутри клетки, что поможет пролить свет на механизмы регуляции системы биосинтеза важнейших метастабильных метаболитов, ответственных за созревание и активацию тромбоцитов.

ИЗУЧЕНИЕ АМИЛОИДО-ПОДОБНЫХ СТРУКТУР С ПОМОЩЬЮ ДИАЗОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ В МОЧЕ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

В.А. Сергеева[1,3], А.Е. Бугрова[1,4], Н.Л. Стародубцева[1,2,3], З.С. Ходжаева[1], К. Муминова[1], А.С. Кононихин[1,2,3], М.И. Индейкина[3,4], И.А. Попов[1,2,3], В.Е. Франкевич[1], Е.Н. Николаев[1,3,4,5], Г.Т. Сухих[1]

[1]Московский физико-технический институт; [2]Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова; [3]Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН; [4]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; [5]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Конго Красный точечный (Congo Red Dot, CRD) тест является новым многообещающим методом диагностики преэклампсии (ПЭ). Если удастся добиться достаточной чувствительности и специфичности, этот тест успешно решит проблему диагностики и предотвращения тяжёлых форм ПЭ. Образцы мочи беременных женщин, страдающих от ПЭ и других гипертензивных патологий были собраны в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, с информированного согласия пациенток. Тест был выполнен согласно протоколу, предложенному И.Бухимши и др.[1], с использованием двух диазовых красителей: Конго Красный и Эванс Синий (Evans Blue, EB). Наличие специфичных фрагментов белков подтверждено жидкостной хроматографией с масс-спектрометрией. Кратко, образец мочи окрашивается, инкубируется и наносится на нитроцеллюлозную мембрану. После высыхания мембраны отмываются в спирте. Результаты теста изначально оценивались качественно (да/нет), потом количественно по отношению интенсивностей пятен до и после отмывки. Качественный CRD-тест показал 60% чувствительность и 95% специфичность. Количественно EBD- и CRD-тесты с порогом отсечения, равным 15%, показали чувствительность 70% и 80% и специфичность 85% и 80% соответственно. CRD-тест статистически значим, однако он требует усовершенствования для применения у пациенток европеоидной расы. *Благодарности: гранты РФФИ по. 17-08- 01537 А, по.16-54- 21011_SNF_a (подготовка ПЭ образцов) и РНФ грант по. 14-24-00114(исследования с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения).*

Литература

1. I.A. Buhimshi et al. Sci. Transl. Med. 6, 245ra92 (2014).

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДИМЕРИЗАЦИИ И ОКИСЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ ТРИПТОФАНА И ТИРОЗИНА ПРИ АНАЭРОБНОМ ФОТОЛИЗЕ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОМ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Е.Д. Сормачева[1], П.С. Шерин[1,2], Ю.П. Центалович[1,2]

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

В хрусталике глаза отсутствуют механизмы обновления белков, поэтому за время жизни организма они накапливают значительное количество модификаций. Солнечное излучение, поглощаемое хромофорами хрусталика, может вызывать повреждения полипептидных цепей кристаллинов. Один из хромофоров хрусталика человека, кинуреновая кислота (KNA), в анаэробных условиях под действием УФ излучения способен вступать в реакции с белками хрусталика. Наши исследования показали, что реакции триплетного состояния TKNA с α-кристаллином происходят в результате переноса электрона с остатков триптофана (Trp) и тирозина (Tyr) на TKNA с образованием соответствующих радикалов. Дальнейшие реакции радикалов в настоящее время неизвестны; их итогом является агрегация белка. Цель данной работы: исследовать механизмы реакций, приводящих к модификации белков, с использованием более простой системы, включающей только KNA и аминокислоты Trp и Tyr. Было обнаружено, что основным каналом гибели радикалов KNA˙ и аминокислот является обратный перенос электронов с образованием исходных реагентов. Радикалы, не подвергающиеся рекомбинации, участвуют в реакциях: 1) димеризации с образованием димеров аминокислот; 2) переноса атома кислорода с карбонильной/ карбоксильной группы KNA на аминокислоту с образованием продуктов обескислороженной KNA и окисленного триптофана; 3) окисления аминокислот супероксидом $O_2^{\cdot-}$, образованным путем окисления радикала KNA˙ остаточным O_2; 5) комбинации радикалов с образованием ковалентной связи между KNA и аминокислотой. Основными продуктами реакции между TKNA и аминокислотами являются димеры KNA и аминокислот различных структур. Эксперименты с использованием импульсного источника света показали, что перенос электрона в паре Tyr / KNA происходит эффективнее, чем в случае Trp. Кроме того, заряд на аминогруппе аминокислоты придает большую стабильность молекуле, предотвращая окисление и димеризацию. Аналогичные продукты были обнаружены при KNA-сенсибилизированном фотолизе α-кристаллина. Следовательно, можно предположить, что повреждения белков в хрусталике происходит по установленным механизмам, как при нормальном старении, так и при развитии катаракты. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 16-33-00669) и совета по грантам Президента РФ (МК-1515.2017.3).*

АНАЛИЗ БЕЛКОВОГО И ПЕПТИДНОГО СОСТАВА КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА КАК МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ НОВОРОЖДЕННЫХ

К.Ю. Федорченко[1,2], А.С. Кононихин [1,3], Н.Ю. Котлов[2], С.И. Митрофанов[2], А.Ю. Рындин[3], А.А. Буров[3], О.В. Ионов[3], В.Е. Франкевич[3], Е.Н. Николаев[1,4,5], Г.Т. Сухих[3]

[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова;[3]Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова; [4]Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН; [5]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Инвазивность методов обследования является серьезной проблемой для интенсивной терапии и выхаживания недоношенных детей. Показано, что сбор конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) у маленьких детей и младенцев возможен и является безопасным. КВВ является одним из наиболее привлекательных объектов с точки зрения развития неинвазивных методов мониторинга состояния интубированных новорожденных. В работе мы проанализировали КВВ 24 интубированных новорожденных с врожденной пневмонией и левосторонней врожденной диафрагмальной грыжей (ЛВДГ). Здоровый контроль отсутствовал, поскольку разработанный метод сбора КВВ мог быть применен только к младенцам, находящимся на искусственной вентиляции легких. Данные о пептидном и белковом составе КВВ получали с использованием ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения. Мы сравнили результаты анализа КВВ детей с ранее полученными нами данными о белковом и пептидном составе КВВ 124 взрослых доноров (как здоровых, так и с диагнозами «ХОБЛ», «внебольничная пневмония» и «рак легкого»). Мы показали, что КВВ интубированных новорожденных имеет уникальный

пептидный профиль, который не совпадает с пептидным профилем ни одной из «взрослых» групп. Интересной находкой стала идентификация в пробах КВВ интубированных новорожденных витронектина. При сравнении данных о составе КВВ новорожденных с врожденной пневмонией и ЛДВГ были также выявлены существенные отличия на пептидном и белковом уровне. Для группы с врожденной пневмонией идентифицировали расширенную группу иммуноглобулинов, которые характеризовались более высокой нормализованной суммарной интенсивностью пиков. Уровень нормализованной суммарной интенсивности пиков некоторых других белков (дермцидин, цистатин-А), напротив, оказался понижен по сравнению с таковым в группе ЛВДГ. Примечательно, что, несмотря на существенные различия в пептидных профилях групп, результаты данного исследования совпали с результатами анализа КВВ взрослых пациентов с диагнозом «внебольничная пневмония». *Исследование по сбору КВВ новорожденных и анализу данных выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы (проект № 15-38-70039 «мол_а_мос»). Исследование с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения выполнены при поддержке гранта РНФ грант № 14-24- 00114.*

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ СИДЕРОФОРОВ *RHODOCOCCUS FASCIANS* S11

А.В. Сорокина, Л.Т. Шафигуллина, М.Р. Шарипова, Л.М. Богомольная, И.В. Хиляс
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Проблема резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам и ежегодно увеличивающееся количество смертельных случаев, связанных с антибиотикоустойчивыми бактериальными инфекциями, остается одной из актуальных проблем. Борьба с бактериальной антибиотикоустойчивостью напрямую зависит от поиска новых биологически-активных соединений. Даже не смотря на прогресс в данной области, темпы создания новых препаратов недостаточно интенсивные. На сегодняшний день бактерии рода *Rhodococcus* широко известны как биодеструкторы органических токсикантов, способные использовать в качестве источника углерода и энергии ароматические соединения, нитрилы, углеводороды и стероиды. Однако Rhodococcus также являются продуцентами антибиотиков, сидерофоров, биосурфактантов и других вторичных метаболитов. Целью данной работы явилось выделение и идентификация перспективных бактерий-продуцентов сидерофоров из образцов минерала магнезита, характеризующегося высоким содержанием тяжелых металлов. Селективная среда, содержащая краситель хром азурол S (CAS агар), была использована для отбора и исследования способности выделеннных изолятов продуцировать сидерофоры. Метод Арноу использовали для детекции сидерофоров катехолового типа в процессе роста изолята S11 на жидкой среде M9 с бипиридилом. Максимальная концентрация сидерофоров в среде M9 достигала 60 мкМ на 48ч культивирования. Разнообразие сидерофоров в 48 ч культуральной жидкости изолята S11 исследовали методом ВЭЖХ анализа. Анализ тотальной метанольной фракции показал, что полученная смесь метаболитов изолята S11 содержит 7 мажорных пиков, детектируемых при 220 нм; 5 мажорных пиков, детектируемых при 260 нм. Определение флуоресцирующих соединений в метанольной фракции изолята S11 проводили при 274/304 нм, что позволило идентифицировать 5 новых пиков. Таксономическая принадлежность изолята S11 идентифицирована методом анализа фрагментов гена 16S рРНК. Изолят S11 принадлежит к грамположительным бактериям рода *Rhodococcus* семейства *Nocardiaceae* и обнаружил наибольший уровень сходства, достигающий 99%, с видом *Rhodococcus fascians*. Дальнейшие исследования позволят исследовать возможность применения сидерофоров *R. fascians* S11 для получения новых биологически активных веществ и повышения эффективности антибиотикотерапии во время инфекций.

НАПРАВЛЕННЫЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ КОРОВЬЕГО МОЛОКА: ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ И ВЕРИФИКАЦИЯ БИОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ГИДРОЛИЗАТОВ *IN VITRO*

Т.В. Федорова, М.Ю. Центалович, А.А. Торкова, Е.Ю. Агаркова, К.А. Рязанцева, А.Г. Кручинин
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Ферментативный гидролиз белков может быть направленным и приводить к получению пептидных композиций с заданными характеристиками, в том числе с желаемыми биологическими свойствами. Для белковых гидролизатов, полученных из молочного сырья, в том числе молочной сыворотки, описаны различные типы биологической активности, среди которых антимикробное, антиоксидантное и гипотензивное действие упоминаются в литературе чаще всего. В данной работе был исследован и охарактеризован пептидный профиль и биологические свойства гидролизатов молочных сывороток, полученных при производстве различных сортов сыра: Montasio, Caciotta, Mozzarella, Gorgonzola и Адыгейского сыра. Определен белковый профиль исходного сырья. Опираясь на данные о белковом составе исследуемого сырья и данные о специфичности различных протеаз, для гидролиза сывороток был выполнен рациональный дизайн мультиферментной композиции с использованием in silico анализа, с учетом максимального выхода биологически активных пептидов. Подобраны ферментные композиции для гидролиза белков подсырных сывороток: Thermolysin/Alcalase (2:1) для Адыгейского сыра; Protamex/Alcalase (3:0,5) для остальных сывороток, имеющих сходный белковый профиль. Направленный гидролиз позволил получить гидролизаты с низким содержанием свободных аминокислот (6–11 мг/мл экв. глютаминовой кислоты) и выраженной биологической активностью (антиоксидантная емкость по отношению к пероксильному радикалу 450–550 мкМоль ТЭ/г белка, анти-гипертензивная активность – IC_{50} 500–1300 мг белка/л). В гидролизатах идентифицировано от 83 до 102 пептидов размером от 5 до 26 а.о., в т.ч. содержащих антиоксидантные и гипотензивные фрагменты. В гидролизате подсырной сыворотки Адыгейского сыра обнаружены 20 уникальных для данного образца пептидов, содержащие дескрипторы антиоксидантной активности, и 21 пептид, содержащий анти-гипертензивные дескрипторы, в т. ч. пептид LHLPLP с известной активностью (IC_{50} 2,9 мкМ). *Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00094).*

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ПРОТЕОМНЫМ И ФЕНАЗИНОВЫМ ПРОФИЛЕМ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS

М.А. Шапиро, Е.В. Леончик, А.С. Копоть, Е.Г. Веремеенко, А.В. Янцевич
Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Феназины – это широко распространённые соединения с широким спектром биологических активностей. К синтезу данных вторичных метаболитов способны многие штаммы Pseudomonas, Streptomyces, а также некоторые другие бактерии [1]. Феназины показали противогрибковую, противобактериальную и противораковую активности [2], что делает их крайне интересным объектом для биотехнологических исследований. В результате нашей работы удалось установить связь между изменениями в протеомном профиле штаммов Pseudomonas aeruginosa и феназиновым профилем этих штаммов. Различные штаммы Pseudomonas aeruginosa были получены с помощью спонтанного мутагенеза. По прошествию опрделённого времени инкубирования клточная масса, на разных фазах, роста разрушалась ультразвуком. После чего белковая фракция выделялась хлороформ-метаноьлным методом, в то время, как феназиновая смесь была экстрагирована при помощи твердофазной экстракции на фенил-замещённом силикогеле. Белковая фракция была анализирована с помощью “shotgun” анализа [3], а феназиновая смесь была фракционирована и каждая фракция анализировалась при помощи ВЭЖХ – Agilent 1290 с квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром. Результаты анализа были сопоставлены с библиотекой известных феназиновых соединений, с использованием свободного онлайн ресурса CFM-ID. Полученные феназиновые профили были сопоставлены друг с другом и различия сравнивали с изменениями в протеомном профиле. Результаты работы помогают лучше понять механизм синтеза антибиотиков и открывают возможности для направленых изменений в феназиновом метаболизме с целью получения конкретного вещества.

Литература

1. Hernandez, M.E. Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. / M.E. Hernandez, A. Kappler, D.K. Newman. // Appl Environ Microbiol. – 2004. – Feb. -70(2). – pp. 921-8.
2. Веремеенко, Е.Г. Генетические подходы к конструированию продуцентов феназиновых антибиотиков на основе бактерий Pseudomonas Chlororaphis ssp. Aurantiaca. / Веремеенко Е.Г. и др. // Микробные технологии. Фундаментальные и прикладные аспекты. – 2015. -Т.7 – Миснк – С. 17-33.
3. Kiryushkin, A.A. Chemical ionization mass spectrometry of complex molecules / A.A. Kiryushkin, et al. // Org. Mass Spec. – 1971. – V.5, N1. – p.p. 19–31.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОИСКУ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ NK-92

А.Д. Щербицкая, Ю.П. Милютина, А.А. Жданова, В.А. Семенов, А.В. Кореневский, Д.И. Соколов, С.А. Сельков
Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

Для оценки протеома любых биологических образцов необходимы специальные технологические подходы. В настоящее время применяется ряд методов анализа, включающих в себя масс-спектрометрию, иммуноферментный анализ и иммуноблоттинг, которые используются для количественного и качественного определения множеств белков в составе сложных смесей. В настоящей работе мы остановились на поиске гранзима B в клетках линии NK-92. Первый подход состоял в том, что содержимое цитоплазмы клеток анализировали с помощью 2D-электрофореза (Protean i12 IEF Cell, PowerPac HC; BioRad). Для этого белки пробы распределялись в полоске геля в зависимости от своей изоэлектрической точки, а затем разделялись по молекулярной массе. Далее, после окрашивания полученного геля по Кумасси, белковые пятна вырезали и подвергали масс-спектрометрическому анализу. Данный процесс сопровождался долгим поиском белка интереса и не увенчался успехом, так как окрашивание по Кумасси не визуализировало то пятно, в котором находился гранзим B. Поэтому в следующем эксперименте после 1D-электрофореза белки в геле визуализировали с помощью вестерн-блоттинга. Описанный подход позволит в дальнейшем стандартно вырезать область геля после 2D-электрофореза и проводить масс-спектрометрический анализ образца. Второй подход начинался с разделения содержимого цитоплазмы клеток на фракции в зависимости от изоэлектической точки белков на фракционаторе 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent). Белковые фракции получали в растворе, что позволило провести 1D-электрофорез в геле с последующим вестерн-блоттингом и идентификацией фракции, содержащей наибольшее количество гранзима B. Для сравнения белковых профилей фракций использовали биоанализатор 2100 Bioanalyzer (Agilent). Одно из преимуществ электрофореза в чипе является существенная экономия времени в сравнении с электрофорезом по Лэмли. Также оставшийся объем получаемых фракций позволяет провести масс-спектрометрический анализ или дополнительное разделение белков на микропрепаративном высокоэффективном жидкостном хроматографе с последующей масс-спектрометрической идентификацией. *Поддержано грантом РФФИ №17-04-00679. Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных Modern Methodological Approaches to the Search for Target Proteins in the Cell Line NK-92.*

УЧАСТИЕ БЕЗ ДОКЛАДА

КРИСПАМИД – ИНГИБИТОР α-АМИЛАЗЫ ИЗ АКТИНИИ *HETERACTIS CRISPA*

Р.С. Калина, И.Н. Гладких, М.М. Монастырная, П.С. Дмитренок, Э.П. Козловская
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Владивосток, Россия

Актинии, ядовитые морские кишечнополостные, продуцируют огромное количество токсинов пептидной природы, действующих на широкий спектр молекулярных мишеней: потенциал-зависимые натриевые и калиевые каналы, кислоточувствительные каналы (ASICs), ванилоидные (TRPV1) и анкириновые (TRPA1) рецепторы, а также протеазы различных классов. Недавно из актинии *Stichodactyla helianthus* впервые был выделен пептид, хелиантамид – высокоэффективный ингибитор панкреатической α-амилазы. Он является первым представителем нового структурного класса ингибиторов гликозидаз. Известно, что ингибиторы α-амилазы снижают уровень глюкозы в крови пациентов, страдающих сахарным диабетом. При этом низкомолекулярные ингибиторы (акарбоза и миглитол) вызывают ряд побочных эффектов, которых, вероятно, будут лишены ингибиторы пептидной природы. Из этанольного экстракта тропической актинии *Heteractis crispa* методами гидрофобной, ионобменной, гель-фильтрационной хроматографии и ОФ-ВЭЖХ нами получен новый пептид, криспамид (Mr 4785,5 Да, 44 а.о.), ингибирующий панкреатическую α-амилазу. Аминокислотная последовательность пептида была установ-

лена при помощи автоматического секвенирования по методу Эдмана (41 а.о.) и анализа тандемного масс-спектра положительных ионов в режиме ДАС N- и С-концевых фрагментов пептида (1–27 а.о. и 30–34 а.о.). Данный пептид является вторым представителем нового структурного типа ингибиторов α-амилазы. Криспамид отличается от хелиантамида пятью а.о., но расположение остатков цистеина и мотив YIYH, отвечающий за ингибирующую активность сохраняются. Опираясь на единство пространственной организации пептид может быть включен в семейство β-дефензинов, в которое, помимо хелиантамида, входят антимикробные пептиды и токсины актиний, модулирующие работу катионных каналов.

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ ЦЕСТОДЫ *TRIAENOPHORUS NODULOSUS* НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ГЕЛЬМИНТА

А.А. Кочнева[1], Е.В. Борвинская[2,3], Д.С. Бедулина[2], Б.К. Бадуев[2], Г.А. Федорова[4]
[1]Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск; 2НИИ Биологии иркутского государственного университета; [3]Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск; [4]Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

В данной работе был проведен сравнительный анализ растворимых белков цестод *Triaenophorus nodulosus* на разных стадиях онтогенеза гельминта. Сложный жизненный цикл паразита включает в себя первого промежуточного хозяина – планктоных ракообразных (Copepoda), второго промежуточного хозяина – различные пресноводные рыбы (стадия плероцеркоид, целевой орган – печень), и, наконец, окончательным хозяином является щука (половозрелые особи, целевой орган – просвет кишечника). Белки были выделены у червей на стадии плероцеркоида и половозрелой особи, разделены методом одно- и двумерного электрофореза и идентифицированы с помощью MALDI-TOF и LC-MS/MS. У червей на двух разных стадиях развития было обнаружено 45 белковых пятен, достоверно различающихся по оптической плотности ($p<0,05$). Из них были идентифицированы иммуносупрессорный белок аннексин, фермент метаболизма аргинина и орнитина и синтеза нейромедиаторов – орнитинаминотрансфераза, две формы шаперонов – белков ответа на стресс, два сигнальных пептида (активатор трансляции gcn1 и G-белок), а также ферменты углеводного обмена енолаза, фосфоглицератмутаза, триозофосфатизомераза и фермент метаболизма жирных кислот пропионил CoA карбоксилаза. Помимо этого, было обнаружено 4 белка с неизвестной функцией, специфичных для цестод. Кроме того, было проведено сравнение гельминтов на одной стадии жизненного цикла (плероцеркоид) из разных видов-хозяев (окунь *Perca fluviatilis*, налим *Lota lota*, ёрш *Gymnocephalus cernus*) и обнаружены достоверные различия в оптической плотности для 24 белковых пятен, из которых некоторые были идентифицированы. Плероцеркоиды из всех трех видов хозяев различались по содержанию тубулина, также личинки из окуня и налима имели разное содержание фосфоглицерат мутазы, триозофосфатизомеразы, G-белка и двух белков с неизвестной функцией с трансмембранным доменом. Таким образом, нами впервые была описана электрофоретическая подвижность белков гельминта T. nodulosus и найдены белковые пятна, уникальные для плероцеркоидов и половозрелых особей гельминта, а также для плероцеркоидов из различных промежуточных хозяев. Показано существование специфических белков, которые могут быть вовлечены в молекулярные механизмы адаптации паразита (включая различные стадии развития) по отношению к конкретной «среде» хозяев.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ, У ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*P. SATIVUM* L.)

О.А. Кулаева[1], А.М. Афонин[1], М.С. Клюкова[1], А.И. Жернаков[1], И.А. Тихонович[1,2], В.А. Жуков[1]
[1]ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

На протяжении всей жизни растительные организмы испытывают влияние различных факторов абиотической и биотической природы, вызывающих у растений активацию различных ответных реакций, включающих, в том числе синтез антимикробных пептидов (АМП). У растений цистеин-богатые АМП представлены множеством семейств, различающихся по количеству образуемых дисульфидных связей и спектру активности данных веществ. Общей чертой цистеин-богатых АМП является высокая вариабельность их последовательностей, что приводит к необходимости использования специальных алгоритмов для выявления генов, кодирующих такие пептиды, в геномах и/или транскриптомах растений. С использованием алгоритма SPADA (Small Peptide Alignment Discovery Application), работа которого заключается в создании скрытой марковской модели (Hidden-Markov Model) для поиска белков и пептидов, был проведен поиск последовательностей, кодирующих АМП, в сборках транскриптома гороха, созданных на основе секвенирования различных органов растений (Zhukov et al., 2015; Alves-Carvalho et al., 2015). В качестве основы для создания моделей использовалась информация об известных последовательностях пептидов, представленная в базах данных NCBI и PhytAMP (http://phytamp.hammamilab.org/statistics.php). В результате анализа было выявлено 412 последовательностей, кодирующих NCR-пептиды, 41 – дефензины, 23 – снакины, 5 – гевеин-подобные пептиды, 64 – липид-переносящие белки. С использованием экспрессионного атласа гороха (http://bios.dijon.inra.fr/FATAL/cgi/pscam.cgi) был подтверждён клубенёк-специфичный характер экспрессии NCR-пептидов, а также выявлено значительное усиление экспрессии некоторых представителей липид-переносящих белков и снакинов в семенах. Таким образом, был идентифицирован ряд генов, кодирующих пептиды гороха посевного, относящиеся к нескольким семействам цистеин-богатых АМП. Данный подход имеет большое фундаментальное и прикладное значение, поскольку позволяет проводить качественную аннотацию транскриптов и выявлять гены, кодирующие АМП, у широкого спектра организмов. *Данная работа была финансово поддержана РФФИ (16-34-60132) и грантом Президента РФ (НШ-6759.2016.4).*

СИНТЕЗ ИММУНОКОНЬЮГАТА ИНТЕГРИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ПЕПТИДА И ФУРАНО-АЛЛОКОЛХИЦИНОИДА, СОЕДИНЕННЫХ ЛИНКЕРОМ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

К.С. Подкорытова[1], С. Ш. Гапизов[2,3], Ю.А. Грачёва[4], А.Ю. Федоров[4], Е.В. Свирщевская[2]
[1]Московский технологический университет, Институт тонких химических технологий; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [3]МГУ им. М.М. Ломоносова, Москва; [4]Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

Системы доставки препаратов позволяют увеличить время циркуляции лекарства в крови, защитить его от ферментных систем организма, включить молекулы, обеспечивающие целевую доставку, что потенциально приведет к созданию лекарств нового поколения. Целью работы являлось получение конъюгатов на основе производных хитозана с фурано-аллоколхициноидом (АК) и векторным пептидом PRGDWNEG (JCL), клонированным в каркасе 10 домена фибронектина 3

типа человека. АК является производным колхицина и содержит карбоксильную группу. JCL связывается с интегрином avb3, который экспрессирован на опухолевых клетках и воспаленном эндотелии. Сукцинил хитозан, различающийся по степени деацетилирования и ММ, и катионный кватернизированный хитозан использовали в качестве линкера АК и JCL. Для визуализации связывания in vitro и анализа биораспределения конъюгатов *in vivo* конъюгатов использовали флуоресцентные аналоги АК–родамин B и JCL- JCLmCh, являющегося слитой молекулой JCL и белка mCherry. При синтезе конъюгатов с векторным пептидом и АК использовали карбодиимидный метод. Показано, что основная цитотоксическая активность опосредуется действием антимитотического препарата АК и сохраняется во всех полученных конъюгатах. При этом сам хитозан и конъюгаты с JCL нетоксичны. Функциональная активность АК и векторной молекулы JCL была показана на клеточных линиях мышиной меланомы B16 методом конфокальной микроскопии. Таким образом, была получена панель иммуноконъюгатов для последующего тестирования *in vivo*. *Работа поддержана грантом РНФ №16-13-10248.*

ЖХ-МС/МС АНАЛИЗ ПРОТЕОМА КЛЕТОК HaCaT ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТРИТОНА X-100

А.Л. Русанов[1], К.В.Находд[2], Е.В.Поверенная[2], Н.А.Петушкова[2], Н.Г.Лузгина[2]
[1]ООО НПО «Перспектива», Новосибирск; НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

В научных исследованиях и сертификационных испытаниях всё чаще применяются альтернативные методы оценки токсического действия химических веществ, предполагающие использование тестов *in vitro* на клеточных культурах взамен экспериментам на животных. Изучение влияния веществ на клетки методами протеомики позволяет выявить молекулярные механизмы реализации их токсического действия. Цель исследования – анализ протеомного профиля иммортализованных кератиноцитов человека линии HaCaT при воздействии различных концентраций цитотоксического вещества тритон X-100. Изменения в протеоме клеток HaCaT при воздействии тритона X-100 (в течение 48 ч) исследованы методом жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) и охарактеризованы в результате протеомного профилирования и полуколичественного анализа с использованием ПО Progenesis LC-MS. С помощью веб-сервиса Gorilla получены аннотации согласно Gene Ontology, характеризующие роль белка в биологических процессах клетки. В контроле и в клетках, подвергшихся действию тритона X-100 (12,5 и 25 мкг/мл) было идентифицировано сопоставимое число белков (531, 539 и 538, соответственно). Воздействие тритона X-100 привело к появлению новых белков (118 и 172 для концентраций 12,5 и 25 мкг/мл, соответственно). Из них 82 белка обнаружены для обеих концентраций, что может отражать универсальную реакцию клеток линии HaCaT на действие тритона X-100. Наличие уникальных белков (36 и 90 для концентраций 12,5 и 25 мкг/мл, соответственно) свидетельствует о дозозависимом характере ответа клеток HaCaT. Белки, обнаруженные в клетках линии HaCaT в ответ на воздействие тритона X-100, участвуют в регуляции митоза посредством положительной или отрицательной убиквитин-протеин лигазной активности, обеспечивают стабильность РНК, реализацию катаболических процессов и представлены меланосомными, цитозольными белками, а также белками протеосомного комплекса. Полученные данные демонстрируют, что при воздействии тритона X-100 в клетках линии HaCaT в наибольшей степени изменяется содержание белков, участвующих в дифференцировке кератиноцитов и энергетическом обмене клеток. Данные белки можно рассматривать в качестве наиболее информативных биомаркеров цитотоксического повреждения кератиноцитов инициированного воздействием тритона X-100. *Работа выполнена в рамках Соглашения о предоставлении субсидии № 14.607.21.0129 (RFMEFI60715X0129).*

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА СЕРИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ БАЦИЛЛ В ДРОЖЖЕВУЮ СИСТЕМУ ЭКСПРЕССИИ *PICHIA PASTORIS*

А.А. Тойменцева, Д.С. Баранова, М.Р. Шарипова *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Ферментные добавки (ксиланазы, глюканазы, целлюлазы, протеиназы) способны увеличивать качество и ценность кормовых рационов, используемых для сельскохозяйственных животных (птицы, свиней, крупного рогатого скота). Ферменты увеличивают доступность питательных веществ в кормах – белка, крахмала, жира. Экзогенные протеазы (гидролизуют белки с высвобождением пептидов и аминокислот) становятся необходимым компонентом в рационах с низким содержанием белка. Более того, протеиназы способны проявлять фунгицидную активностью (расщепление клеточных стенок грибов и дрожжей), что позволит продлить хранение кормов. Для получения рекомбинантных протеиназ с высокой активностью часто используют бактериальные системы экспрессии, особенно штаммы бацилл. Однако выход ферментов в бактериальных системах на несколько порядков ниже (мг) по сравнению с дрожжевыми системами (г). Тем не менее, для корректной экспрессии рекомбинантных бактериальных ферментов в клетках эукариот необходимо оптимизировать кодоны нуклеотидной последовательности отдельного гена и заменять регуляторные области (промотор, терминатор и области, отвечающие за секрецию белка). Целью настоящей работы было клонирование гена сериновой субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* для секреции в дрожжах *Pichia pastoris.* Кодон-оптимизация гена фермента (AY754946.2) выполнена в компании Genscript (США). Оптимизированный ген клонировали в интегративные дрожжевые вектора pPINK-HC (высококопийный) и pPINK-LC (низкокопийный) под контролем индуцибельного промотора AOX1. Для секреции фермента также клонировали последовательности сигнальных пептидов гена α-амилазы *Aspergillus niger* и инулиназы *Kluyveromyces maxianus*. Полученные генетические конструкции трансформировали в беспротеазный штамм дрожжей *Pichia pastoris*. Анализ экспрессии и секреции сериновой протеиназы будет проведен в культуральной жидкости всех полученных клонов. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-08-00583а.*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

ВОЗМОЖНОСТЬ ДИВЕРГЕНЦИИ ФУНКЦИЙ БЕЛКОВ НА ПРИМЕРЕ НЕЙРОТРОФИНОВ

Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин
НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия

Нейротрофины NGF и BDNF, перспективные для лечения нейродегенеративных заболеваний, обладают рядом побочных эффектов, которые препятствуют их применению в клинике. Свои эффекты нейротрофины осуществляют через два основных киназных каскада- PI3K/AKT и MAPK/ERK. При этом первый путь преимущественно связан с нейропротекцией, а второй – с дифференцировочной активностью и гиперальгезией в случае NGF. Оба каскада активируются при связывании нейротрофинов с их специфическими тирозинкиназными рецепторами Trk. Мы предлагаем способ селективной активации пострецепторных тирозинкиназных путей, основываясь на структуре белков. Нейротрофины представляют собой симметричные гомодимеры, мономерные единицы которых содержат 7 бета-тяжей, связанных 4 шпилькообразными петлями, три из которых экспонированы наружу (петли 1, 2, 4) и, тем самым, наиболее важны для распознавания рецептором. Мы высказали гипотезу, что разные петли нейротрофинов активируют разные пострецепторные сигнальные пути. В рамках этой гипотезы на основе структур бета-изгибов петель NGF и BDNF получены их гомодимерные дипептидные миметики. Они сконструированы по одному плану – сохранялся центральный дипептидный участок бета-изгиба, предшествующий а.о. заменялся на его биоизостер, димеризацию проводили по С-концам с помощью гексаметилендиамина. Методом Вестерн-блот-анализа показано, что миметики NGF активируют TrkA, а миметики BDNF – TrkB. Миметик 4-й петли NGF (ГК-2) и миметик 1-й петли BDNF (ГСБ-214) селективно активировали AKT, а миметик 2-й петли BDNF (ГТС-201) – ERK. Миметики 1-й петли NGF (ГК-6) и 4 -й петли BDNF (ГСБ-106) активировали оба пути. Миметики, активирующие оба каскада, по своим эффектам были близки соответствующим прародительским белкам. ГК-6 обладал как нейропротективной, так и дифференцировочной активностью и снижал порог болевой чувствительности у крыс. Для ГСБ-106 была выявлена антидепрессивная активность, характерная для BDNF. С другой стороны, ГК-2, обладая выраженной нейропротективной активностью, не влиял на дифференцировку и не вызывал гиперальгезии, а ГСБ-214 и ГТС-201 проявляли нейропротективную, но не антидепрессивную активность. Ни один из миметиков не вызывал потерю веса. Таким образом, показана возможность дивергенции функций нейротрофинов с помощью миметиков отдельных петель.

ЕДИНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ПЕПТИДАМИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И СИНТЕЗА БЕЛКОВ В ЖИВОЙ ПРИРОДЕ

В.Х. Хавинсон[1,2], Б.Ф. Ванюшин[3]
[1]Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург; [2]Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург; [3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Вследствие воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды биологический резерв продолжительности жизни организмов не реализуется полностью. Применение пептидных биорегуляторов является научно обоснованным методом увеличения продолжительности жизни. Анализ результатов 40-летних научных исследований на различных видах организмов позволил сделать вывод о едином механизме пептидной регуляции экспрессии генов и синтеза белков в живой природе. Целью работы явилось изучение влияния пептидов на растения, бактерии, насекомых, птиц, грызунов, приматов, человека. Установлено, что пептиды регулируют экспрессию генов роста, развития и дифференцировки каллусной культуры *Nicotiana tabacum* (табак). Пептид EDG подавлял рост изолятов *Helicobacter pylori*, полученных от пациентов. У мутантной линии дрозофилы agnts3 пептид EDR нормализовал локомоторное поведение и память, регулируя экспрессию генов limk1, rok и park, мутации в которых приводят к развитию болезни Паркинсона. Добавление пептидов AEDG и KE в эмбриональные культуры клеток сетчатки цыплят способствовало индукции дифференцировки различных типов нейронов сетчатки и пигментного эпителия. Максимальное увеличение продолжительности жизни на 42,3% было отмечено при введении пептида AEDG мышам. С использованием ДНК-микрочиповой технологии исследовано влияние пептидов KE, EW, AEDG, AEDP на экспрессию 15247 генов сердца и головного мозга мышей. Установлено, что каждый пептид специфически регулирует экспрессию определенной группы генов. У старых обезьян (*Macaca mulatta*) наблюдалось восстановление до нормы молодых животных уровня мелатонина в крови после инъекций пептида эпифиза. Применение лекарственных полипептидных препаратов (эпиталамина и тималина) у людей пожилого и старческого возраста с патологией сердечно-сосудистой системы привело к достоверному снижению темпа старения организма и смертности. Таким образом, применение пептидов способствовало изменению экспрессии генов и нормализации синтеза белков, что сопровождалось улучшением функций различных органов и систем, в том числе снижением частоты возникновения опухолей и увеличением продолжительности жизни. Пептидный механизм регуляции жизнедеятельности един для различных видов организмов, и, вероятно, является одним из древнейших в эволюции.

МОДУЛИРОВАНИЕ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО АМИЛОИДОГЕНЕЗА ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

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

Болезнь Альцгеймера (БА) тесно связана со старением. Согласно “амилоидной гипотезе” ключевым молекулярным событием БА является структурный переход β-амилоида (Aβ) из физиологически нормального мономерного состояния в растворимые нейротоксические олигомеры, которые в конце концов накапливаются в виде нерастворимых внеклеточных агрегатов (амилоидных бляшек) в тканях мозга. Известно, что ионы цинка, а также «постаревшие» изоформы Aβ, присутствую-

щие в бляшках, играют ключевую роль в инициировании патологической конверсии эндогенного Aβ. Изомеризация Asp7 является наиболее распространенной спонтанной неферментативной модификацией Aβ, которая ассоциирована с процессами "белкового старения". *In silico, in vitro* и *in vivo* показано, что Aβ с изомеризованным Asp7 (isoAsp7-Aβ) значительно отличается по своим свойствам от здоровых (немодифицированных) молекул Aβ. Мы обнаружили, что isoAsp7-Aβ может инициировать образование нейротоксичных цинк-зависимых олигомеров Aβ, тем самым индуцируя развитие церебрального амилоидогенеза и других патологических процессов, характерных для БА. При этом была показана роль металл-связывающего домена Aβ (N-концевой области 1-16) в качестве минимальной необходимой и достаточной патогенной части isoAsp7-Aβ. На основании молекулярного механизма цинк-зависимой олигмеризации изоформ Aβ был установлен потенциальный сайт цинк-опосредованных взаимодействий таких олигомеров с ацетилхолиновыми рецепторами. Внутривенные инъекции синтетического аналога этого сайта привели к резкому замедлению церебрального амилоидогенеза в животной модели болезни Альцгеймера. В совокупности, наши данные свидетельствуют о том, что в модулировании церебрального амилоидогенеза при болезни Альцгеймера принципиальную роль играют взаимодействия между isoAsp7-Aβ и ацетилхолиновыми рецепторами. Соответственно, подавление таких взаимодействий представляет собой перспективную стратегию терапии болезни Альцгеймера.

Поддержано Российским научным фондом (грант № 14-24-00100).

ТРИПЕПТИДЫ ВОССТАНАВЛИВАЮТ КОЛИЧЕСТВО ШИПИКОВ НЕЙРОНОВ В МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ХАНТИНГТОНА *IN VITRO*

Н.С. Линькова[1,2], Е.О. Куканова[2], Н.А. Красковская[1], В.Х. Хавинсон[2,3]
[1]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; [2]Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии; [3]Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Нарушения в синаптической передаче и потеря синаптических контактов являются ранним признаком дисфункции нейронов гиппокампа и стриатума, наблюдаемых при болезни Альцгеймера (БА) и болезни Хантингтона (БХ). Эти нарушения морфологически проявляются в уменьшении количества дендритных шипиков. Представляется целесообразным поиск веществ, способных оказывать нейропротекторный эффект за счет восстановления синаптических контактов, потеря которых наблюдается на ранних этапах развития БА и БХ. Цель работы – изучить влияние пептидов EDR, KED на морфологию грибовидных шипиков нейронов гиппокампа в условиях амилоидной синаптотоксичности (модель БА) и на формирование шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре нейронов мышей с БХ (модель БХ). Для оценки нейропротекторного эффекта пептиды добавляли в культуру нейрональных клеток за 16 ч до фиксации в концентрациях 20 нг/мл и 200 нг/мл. Анализ морфологии дендритных шипиков производили в программе Neuron Studio software package. Пептиды EDR и KED повышали число грибовидных шипиков в культурах нейронов в модели болезни БА на 20-71%. Добавление пептида EDR увеличивало число шипиков в культурах нейронов в модели болезни БХ на 34%. Пептиды EDR и KED оказывают нейропротекторный эффект в моделях БА и БХ *in vitro*, что коррелирует с выявленными ранее вазопротекторными и нейропротекторными эффектами этих пептидов. Полученные данные подтверждают и дополняют результаты проведенных ранее исследований, показавших нейропротекторную активность пептида EDR. В клиническом исследовании у 72 пациентов с последствиями черепно-мозговой травмы и церебрастенией применение пептида EDR в дополнение к стандартной терапии приводило к улучшению памяти, снижению длительности и интенсивности головных болей, появлению эмоциональной уравновешенности, повышению работоспособности. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-25-00024-П (раздел работы соответствующий пептиду EDR), Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания №17.991.2017/ПЧ (раздел работы соответствующий пептиду KED)*

"BIASED AGONISM" – НОВАЯ КОНЦЕПЦИЯ РАЗНОНАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ АКТИВИРОВАННОГО ПРОТЕИНА С И ТРОМБИНА НА КЛЕТКИ

Л.Р. Горбачева, С.М. Струкова
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Ключевые сериновые протеазы гемостаза: тромбин и активированный протеин С (АПС) – сигнальные молекулы, контролирующие свертывание крови и процессы воспаления, регенерации тканей, нейродегенерации и др. Эти ферменты, взаимодействуя с рецепторами, активируемыми протеазами (ПАР), индуцируют множество сигнальных путей и ответов клеток. АПС и тромбин – агонисты ПАР1, одного из четырех классов ПАР, но обладающие разнонаправленным действием. Отличительная особенность эффектов АПС обеспечивается разными путями: как ограниченным протеолизом ПАР1, локализованного в кавеолах мембраны с корецептором – эндотелиальным рецептором протеина С (ЭРПС), так и спецификой приложения его протеолитической активности – участка экзодомена рецептора, отличающимся от расщепляемого тромбином. При этом образуется новый неканонический привязанный лиганд – пептид-агонист ПАР1 (аП-ПАР1). В настоящей работе демонстрируется реализация смещенного агонизма (biased agonism) в действии АПС и аП-ПАР1 на ПАР1 клеток, участвующих в воспалении и сопряженных процессах. Представлены новые доказательства участия смещенного агонизма в активации ПАР1 и индукции противовоспалительных и цитопротекторных ответов клеток при экспериментальном воспалении и эксайтотоксичности. Очевидно, что действие протеаз, опосредованное ПАР1 может приводить к разным результатам. Это определяется сложной многофакторной системой, в которую включены особенности локализации рецептора, тип агониста, активирующего рецептор, сайт расщепления внеклеточного N-конца ПАР1, тип G-белка, включение во внутриклеточную передачу адапторного белка β-аррестина и др. Действие АПС на клетки может быть имитировано синтетическими аналогами «привязанных лигандов», которые образуются при расщеплении ПАР1 по 46 аминокислотному остатку, в частности, пептидом АП9 в нейронах и тучных клетках, повторяющим структуру остатка ПАР1 47-55. Особый теоретический и практический интерес представляет собой исследование возможности избирательного ингибирования провоспалительных и апоптотических ПАР1-опосредованных эффектов при сохранении его протекторных свойств. Не вызывает сомнений актуальность и клиническая значимость глубокого изучения механизмов «смещенного агонизма» при сигнализации, вызванной агонистами ПАР и разработки пептидов-агонистов этих рецепторов.

УЧАСТИЕ АКТИВИРОВАННОГО ПРОТЕИНА С И НОВОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА – АГОНИСТА ПАР1 (АП9) В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ *IN VITRO*

И.И. Бабкина[1,2], С.М.Струкова[1], М.В. Сидорова[3], Л.Р. Горбачева[1,2]
[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; [2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; [3]Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва, Россия

Цель: Исследовать участие активированного протеина С (АПС) и его функционального аналога – нового синтетического пептида 9 (АП9) – аналога привязанного лиганда, высвобождаемого из ПАР1 под действием АПС в модели нейровоспаления *in vitro*. Методы: Для создания модели нейровоспаления in vitro были использованы тучные клетки (ТК) и гиппокампальные нейроны. Токсическое воздействие активированных ТК на нейроны оценено с помощью морфологического анализа выживаемости с использованием флуоресцентных красителей: Hoechst 33342, SYTO-13. Изменение цитоскелета в присутствии агонистов ПАР1 было проведено с помощью иммуноцитохимического окрашивания F-актина. Результаты: Ранее в нашей лаборатории было показано, что предобработка активированных ТК АПС и АП9 приводит к уменьшению их токсического воздействия на нейроны при их совместном инкубировании и к снижению доли апоптотических клеток. В настоящем исследовании при кокультивировании гиппокампальных нейронов с ТК было продемонстрировано, что блокада специфическим антагонистом (SCH79797) ПАР1 как на ТК, так и на нейронах отменяет протекторное действие и АПС, и АП9. Полученные данные свидетельствуют о ПАР1- опосредованном протекторном действии АП9, подобным таковому АПС. Основными участниками воспалительной реакции являются ТК; морфологические изменения которых являются критериями их активации и выраженности воспалительного процесса. Нами показано, что активация клеток тромбином в высоких концентрациях (50 нМ) приводит к дезорганизации и перераспределению актинового цитокелета, однако, прединкубация RBL-2H3 с новым пептидом АП9 и АПС способствуют упорядочиванию актина, подобно контрольным группам. По-видимому, протекторное действие АП9 и АПС определяется их способностью упорядочивать подмембранный актин и стабилизировать мембраны клеток, что приводит к уменьшению уровня секреции. Выводы: Новый синтетический пептид (АП9), освобождаемый АПС из ПАР1, оказывает антивоспалительное и цитопротекторное действие, подобное АПС, через ПАР1-зависимый механизм в модели нейровоспаления *in vitro*.

ИНГИБИТОРЫ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ШАПЕРОНОВ: ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ПОИСКА И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ

В.Ф. Лазарев, Д.В. Сверчинский, С.А. Нисканен, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Терапевтические стратегии, принятые в современной онкологической практике, включают в себя применение комбинаций нескольких препаратов, направленных на разные мишени в опухолевой клетке. Одной из таких мишеней может быть шаперонный механизм, основанный на белке Hsp70. Данный белок способен защищать клетки от действия огромного числа цитотоксических факторов, в частности противоопухолевых лекарств широкого спектра действия. Надо отметить, что уровень белка в большинстве раковых клеток необычайно высок. Целью данной работы была разработка ингибиторов Hsp70 и их применение для сенсибилизации опухоли к традиционным онкологическим препаратам. Для поиска ингибиторов были разработаны 4 тест-системы с помощью которых можно определить субстрат-связывающую и восстановительную (рефолдинг) активности белка. В скрининге использовали коллекцию химических соединений компании InterBioscreen (Черноголовка Моск. обл.) и библиотеку пептидов, перекрывающих последовательность белка Hsp70 (HSPA1A). Несколько соединений и пептидов ингибируют активность шаперона Hsp70 в указанных тестах, и способны входить в живую клетку. С помощью трех различных методов нам удалось показать, что данные соединения связывают Hsp70, и видимо за счет этого подавляют активность шаперона. При исследовании противоопухолевой активности выбранных соединений мы обнаружили, что они способны усиливать токсический и апоптогенный эффект доксорубицина, известного онкологического препарата. Такое сочетанное действие ингибитора шаперона и цитостатика было продемонстрировано на клеточных и животных моделях глиобластомы крысы С6, меланомы мыши В16 и карциномы человека А431. В заключение, методы скрининга ингибиторов шаперона Hsp70 могут стать полезным инструментом поиска ко-факторов для комбинационной терапии высокорезистентных форм опухолей. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда №14-50-00068.*

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ У ХОЛОДНОВОДНЫХ МОРСКИХ ГУБОК

Ю.В. Люпина[1], О.И. Кравчук[1], П.А. Ерохов[1], Н.Г. Горностаев[1], А.И. Лавров[2], А.А. Георгиев[2], Н.П. Шарова[1], В.С. Михайлов[1]
[1]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва; [2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Молекулярные механизмы адаптации изучали у холодноводных морских беспозвоночных приливно-отливной зоны Белого моря, губок *Halichondria panicea* (кл. Porifera). Исследована химотрипсинподобная (ХПА) активность протеасом в клетках, агрегатах и тканях *H. panicea* по уровню гидролиза флуорогенных олигопептидов Suc-LLVY-AMC. Уровень гидролиза олигопептидов определяли при 10°С и 37°С. Специфичность реакции была установлена в опытах с ингибитором протеасом бортезомибом. Методом Вестерн-блоттинга определяли содержание субъединиц протеасом и белка HSP/HSC70. В суспензии диссоциированных клеток *H. panicea* и их агрегатах выявлены два типа клеток, различающихся по уровню содержания белков HSP/HSC70 и бета 5 субъединиц протеасом, а также по изменению ХПА протеасом в зависимости от температуры. Из обоих типов клеток *H. panicea* была выделена ДНК с помощью TRI Reagent (MRC). Полученная ДНК использовалась в качестве ПЦР матрицы с праймерами к 16S рРНК: 27F (5’ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3’) и 519 rev (5’ ATTACCGCGGCGGCTGG 3’). Отсеквенированые клоны клеток обоих типов были проанализированы с помощью BLAST анализа, а также сравнивались с последовательностями в нуклеотидной базе данных GenBank. Бактерии рода *Pseudoalteromonas* были определены в 58,3% клонов для клеток с высокой экспрессией белков HSP/HSC70, тогда как для клеток с низким содержанием белков HSP/HSC70 бактерии рода *Pseudoalteromonas* были обнаружены только в 8,3% клонов. ХПА протеасом клеток с пониженной экспрессией белков HSP/HSC70 и бета 5 субъединиц протеасом оказалась чувствительна к действию высокой температуры. Проведен анализ структуры протеасом клеток и тканей *H. panicea* методом нативного электрофореза. В тканях и клетках губок не выявлялись 26S протеасомы. В диссоциированных клетках губок увеличи-

вается электрофоретическая подвижность 20S форм протеасом. В процессе формирования агрегатов относительное содержание белков шаперонов HSP/HSC70 и альфа-субъединиц протеасом значительно меняется только в период интенсивных перестроек и/или дифференцировок/дедифференцировок клеток. Полученные результаты позволяют рассматривать индукцию белков HSP/HSC70 и изменение в структуре 20S протеасом в клетках в качестве ключевых механизмов в адаптации у холодноводных морских губок. *Работа поддержана РФФИ 16-04-00454.*

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ШАПЕРОНОВ И ПРОТЕАСОМ В КЛЕТКАХ НАСЕКОМЫХ, ИНФИЦИРОВАННЫХ БАКУЛОВИРУСАМИ

Ю.В. Люпина, О.И. Кравчук, П.А. Ерохов, С.Б. Абатурова, О.С. Соколова, С.Н. Белжеларская, О.В. Орлова, О.Г. Зацепина, В.С. Михайлов

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва; Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва; Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Бакуловирусы являются большими ДНК-содержащими вирусами, которые инфицируют клетки насекомых и используются в биотехнологии для продукции белков и вакцин, а в сельском хозяйстве для борьбы с насекомыми-вредителями. На клетках кукурузной *совки Spodoptera frugiperda* (Sf9) изучали изменения в клеточном протеоме при инфицировании вирусом ядерного полиэдроза AcMNPV и роль шаперонов и убиквитин-протеасомной системы в регуляции клеточного гомеостаза. Показано, что вирусная инфекция вызывает в клетках протеотоксичный стресс, который проявляется в накоплении убиквитинированных белков и формировании в цитоплазме агресом – комплексов модифицированных белков и шаперонов. В инфицированных клетках наблюдается защитная реакция, подобная реакции на тепловой стресс, которая сопровождается индукцией шаперонов семейства HSP/HSC70. Индуцибильные и конститутивные белки HSP/HSC70 клеток Sf9 были идентифицированы методами протеомного анализа. Индукция вирусом белка GRP78 свидетельствует об активации протеолиза, связанного с эндоплазматическим ретикулумом. Активность протеасом в ходе инфекции снижается и наблюдается модификация ряда субъединиц коровой 20S протеасомы. В очищенных 26S протеасомах с помощью протеомного анализа идентифицированы субъединицы 19S регуляторной частицы и коровой 20S протеасомы. С использованием электронной микроскопии построены 3D-модели открытой и закрытой форм 20S протеасомы. Функционирование шаперонов HSP/HSC70 и протеасом в инфицированных клетках необходимо для репродукции вируса. Ингибирование активности шаперонов и протеасом приводит к подавлению репликации вирусного генома и продукции зрелых вирионов. Репродукция вирусов зависит также от активности белка VCP/p97, который участвует в транспорте убиквитинированных белков на протеасомы. При этом сборка вирусных частиц и их выход из инфицированной клетки происходят без участия шаперонов HSP/HSC70. Полученные результаты раскрывают закономерности взаимодействия вирусов и систем контроля клеточного протеома, шаперонов и убиквитин-протеасомной системы, у насекомых. *Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ (15-04-01990, 16-04-00454, 17-04-01187).*

МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSPB6 С БЕЛКАМИ СЕМЕЙСТВА 14-3-3

Н.Н. Случанко[1,2], С. Белен[3], И.С. Черник[4], Н.А. Чеботарева[1], А.А. Куликова [5], С.Д. Уикс[3], М.В. Судницына[4], А.С. Сеит-Неби [4,6], А.А. Антсон[7], Н.Б. Гусев[4], С.В. Стрелков[3]

[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва; [2]Кафедра биофизики, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [3]Лаборатория биокристаллографии, Католический университет Лёвен, Бельгия; [4]Кафедра биохимии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [5]Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта, Москва, Россия; [6]Компания «GenWay Biotech», Сан-Диего, Калифорния, США; [7]Йоркская структурная лаборатория, Университет, Йорк, Великобритания

Малые белки теплового шока (sHSP) препятствуют агрегации частично денатурированных и неправильно свернутых белков-субстратов. Помимо такой шапероно-подобной функции, sHSP участвуют в передаче сигнала и взаимодействуют с целым рядом белков-партнеров, находящихся в нативной конформации. Примерами важнейших белков-партнеров sHSP являются универсальные регуляторные белки семейства 14-3-3, узнающие различные фосфопартнеры. Так, более 10 лет назад было показано, что белок HSPB6 (HSP20) образует комплекс с 14-3-3 в ответ на фосфорилирование HSPB6 под действием циклонуклеотид-зависимых протеинкиназ, что коррелирует с расслаблением гладких мышц и некоторых немышечных клеток. За последние 10 лет нами было детально охарактеризовано взаимодействие различных форм 14-3-3 и HSPB6. Основной формой 14-3-3 являются димеры, в то время как HSPB6, представленный димерами в разбавленных растворах, проявляет значительную склонность к самоассоциации в присутствии краудинг-агентов (ТМАО, ПЭГ), имитирующих условия внутри клетки. Фосфорилирование HSPB6 по остатку Ser16, расположенному в разупорядоченном N-конце белка, нарушает способность pHSPB6 к самоассоциации в условиях краудинга и необходимо для образования комплекса с 14-3-3 в стехиометрии 2:2, что может служить механизмом выведения HSPB6 из состава крупных ассоциатов, которые могут являться формой хранения sHSP. Связывание pHSPB6 происходит кооперативно, при последовательном присоединении обоих фосфорилированных участков HSPB6. Ионы фосфата и глицерофосфата, но не пирофосфата, в физиологических концентрациях (мМ) концентрационно-зависимо ингибируют взаимодействие с разными изоформами 14-3-3, предположительно, вследствие конкуренции за фосфопептид-связывающий участок. Интересно, что мономеризация 14-3-3, которая может происходить в клетке при фосфорилировании области интерфейса в димере и считается способом инактивации 14-3-3, не отменяет его способности специфически взаимодействовать с pHSPB6. Кристаллизация комплекса 14-3-3/pHSPB6 позволила определить его молекулярную структуру с разрешением 4.2Å, создав важные предпосылки для разработки низкомолекулярных модуляторов этого взаимодействия. *Работа частично поддержана грантом РФФИ 16-04-00560-а.*

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ ФЛАГЕЛЛИНОВ ПОЛЯРНЫХ ЖГУТИКОВ БАКТЕРИЙ РОДОВ *AZOSPIRILLUM* И *NIVEISPIRILLUM*

Г.Л. Бурыгин[1], Ю.В. Красова[1], Л.А. Давыдова[2], Е.Н. Сигида[1], Р.Ф. Губаев[3], К.Ю. Каргаполова[4], В.Ю. Горшков[3], Н.М. Санина[2], В.Л. Шныров[5], Л.Ю. Матора[1]

[1]Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов; [2]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток; [3]Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань; [4]Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия; [5]Университет Саламанки, Саламанка, Испания

Бактериальные флагеллины (основные белки жгутиков) играют важную роль во взаимодействии бактерий с клетками животных и растений. Ранее нами было выявлено О-гликозилирование флагеллина полярного жгутика (FlaA) *Azospirillum brasilense* Sp7 полисахаридными цепями идентичными по строению с О-антигенами этих бактерий, что является уникальным феноменом среди флагеллинов. В данной работе изучено влияние гликозилирования FlaA штаммов *A. brasilense* Sp7 и *Niveispirillum irakense* KBC1 на их физико-химические свойства и биологическую активность. Сопоставление результатов ДСН-ПААГ-электрофореза и биоинформационного анализа изучаемых белков позволило оценить массовую долю небелковых компонентов как 37% для FlaASp7 и 28% для FlaAKBC1. Вестерн-блот выявил взаимодействие обоих флагеллинов с антителами к липополисахаридам этих штаммов, а в FlaAKBC1 методом ГЖХ ацетатов полиолов выявлены те же моносахариды, что и в О-антигене этих бактерий. Таким образом, гликозилирование флагеллинов обоих штаммов осуществляется полисахаридами, сходными по строению О-антигенам. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии было показано, что термоденатурация FlaASp7 и FlaAKBC1 при pH 6,0 является необратимым, кинетически контролируемым процессом. Полученные параметры уравнения Аррениуса позволили оценить стабильность белков по времени их полупревращения (t1/2), рассчитанного на основании одностадийной модели. Установлено, что t1/2 FlaAKBC1 было больше, чем t1/2 FlaASp7. Следовательно, более высокая степень гликозилирования препятствует образованию более стабильной компактной пространственной структуры флагеллинов. Присутствие во флагеллинах большой углеводной части сказывается на снижении ингибирующего эффекта этих молекул на рост растений, описанного для флагеллинов других бактерий. Добавление флагеллинов штаммов Sp7 и KBC1 в среду культивирования микрорастений картофеля не повлияло на морфометрические показатели растений даже при концентрации 10 мкг/мл. Методом rtPCR была выявлена слабая активация экспрессии генов-маркеров ряда гормональных систем, координирующих иммунные ответы растений, что может быть использовано в биотехнологии для повышения устойчивости растений к фитопатогенам. *Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 16-04-01444 и Минобрнауки РФ (госзадание 6.5736.2017/6.7).*

РОЛЬ БЕЛКА PIWIL2 В ОБРАЗОВАНИИ ГЕРМИНОГЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

И.В. Гайнетдинов, Ю.В. Скворцова, С.А. Кондратьева, О.С. Быченко, Т.Л. Ажикина

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

Эволюционно высоко консервативные белки семейства PIWI (PIWIL у человека) участвуют как в поддержании стволовых герминальных клеток, так и в их дифференцировке. Функционирование этих белков осуществляется в комплексе с короткими некодирующими РНК (piRNA), которые определяют стабильность геномов, препятствуя экспрессии и возможным перемещениям мобильных элементов. Экспрессия PIWIL наблюдается в разных типах рака, показано их участие во многих клеточных процессах, сопровождающих канцерогенез. Нами обнаружены новые короткие изоформы белка PIWIL2, специфически экспрессирующиеся в различных опухолях человека и клеточных линиях, в отличие от полноразмерного PIWIL2, преимущественно экспрессирующегося в герминальных клетках. Целью данной работы было изучение участия коротких изоформ белка PIWIL2 в процессах, приводящих к образованию и прогрессии опухолей. Мы показали, что в герминогенных опухолях яичка (ГОЯ) экспрессируется короткая изоформа PL2L60A, при этом ее экспрессия повышена в семиномах и существенно снижается в несеминомных ГОЯ. Анализ данных глубокого секвенирования библиотек коротких РНК, полученных из образцов ГОЯ и прилегающих к ним тканей яичка (предраковая стадия), показал отсутствие биогенеза piRNA. Однако проведенные эксперименты на модельных клеточных линиях показали, что изоформа PL2L60A репрессирует экспрессию транспозонов посттранскрипционно. Пролиферация изогенных клеточных линий, экспрессирующих короткие изоформы PIWIL2, характерные для опухолевых клеток, выше, чем у клеток, экспрессирующих полноразмерный белок PIWIL2. Таким образом, роль короткой изоформы PIWIL2 при образовании герминогенных опухолей может быть связана как с регуляцией экспрессии активных ретроэлементов, так и с пролиферативным эффектом. *Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ РЕЦЕПТОРА ЩЕЛОЧИ ИРР

А.Г. Петренко *Институт биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Регуляция кислотно-щелочного равновесия в организме на системном уровне осуществляется преимущественно за счет функции почек и легких. В почках эту функцию осуществляют вставочные клетки двух типов, альфа-клетки экскретируют избыточные кислоты, а бета–клетки – избыточные основания в виде бикарбоната. В результате функционального анализа рецепторной тирозинкиназы ИРР, обогащенной в бета-вставочных клетках, нами была выявлена ее способность активироваться в результате внеклеточной обработки слабощелочной средой. ИРР является близким гомологом рецепторов инсулина и инсулин-подобного ростового фактора, однаком не взаимодействует с их агонистами, а гомологи ИРР не реагируют на изменения pH среды. Активация ИРР щелочью является типичным лиганд-рецепторным взаимодействием, поскольку оно дозозависимо с насыщением, специфично по отношению к другим рецепторам, определено структурными особенностями внеклеточной части ИРР и характеризуется его конформационными изменениями. Свойство ИРР реагировать на повышение pH внеклеточной среды сохранено в его эволюции от амфибий до млекопитающих. Полученные данные позволяют заключить, что ИРР является клеточным сенсором pH. Для анализа системной функции ИРР нами использовалась линия нокаутных мышей с генетически инактивированным рецептором. Данные мыши жизнеспособны в нормальных условиях, однако при экспериментально индуцированном алкалозенокаутные мыши не способны экскретировать избыточный бикарбонат почками. Тем не менее увеличение концентрации бикарбоната в крови постепенно компенсируется накоплением углекислоты, что позволяет сохранять pH крови в рамках физиологических величин. Нами был проведен сравнительный анализ тран-

скриптомов почек нормальных и ИРР нокаутных мышей глубоким сиквенированием и выявлены белки, изменение экспрессии которых вследствие выключения гена ИРР являются статистически значимыми, в их числе мембранные транспортеры ионов. Также обнаружена ИРР-зависимая активация фосфолипазы С гамма 2. Мутагенез ИРР показал, что в pH-зависимой активации ИРР участвуют два синергических центра, анализ структуры эктодомена ИРР при помощи МУРР выявил его подковообразную форму, изменяющуюся при повышении pH среды. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект #14-50-00131).*

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ПРОТЕАСОМНЫХ ГЕНОВ У ДРОЖЖЕЙ КЛАССА SACCHAROMYCETES

Д.С. Карпов, Д.С. Спасская, Е.Н. Гринева, Н.И. Надолинская, В.В. Тютяева, В.Л. Карпов
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Протеасома – это АТФ-зависимый мультисубъединичный самокомпартментализованный протеазный комплекс. Субстратами протеасомы служат регуляторные белки, ферменты, факторы транскрипции, компоненты путей передачи сигнала и т.д., а также белки с нарушенной структурой. Таким образом, протеасома участвует в контроле всех основных клеточных процессов и необходима в клеточном ответе на стрессовые условия, связанные с повреждением белков. Содержание протеасом у эукариот контролируется по принципу отрицательной обратной связи с участием факторов транскрипции, которые служат субстратами протеасомы. Наиболее детально нами исследована система координированной регуляции протеасомных генов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. На основании биоинформатического поиска в секвенированных геномах организмов предположено, что подобной системой обладают только дрожжи класса Saccharomycetes. Это предположение подтверждено нами экспериментально у различных представителей этого класса, имеющих значение в медицине, пищевой промышленности и в биотехнологии.

РОЛЬ ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА Cys 244 И Cys 458-459 В РЕГУЛЯЦИИ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ И СИГНАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ Na,K-АТФазы ПРИ ГИПОКСИИ

И.Ю. Петрушанко[1], В.А. Митькевич[1], В.А. Лакунина[1], А.А. Анашкина[1], П.В. Спирин[1], П.М. Рубцов[1], В.С. Прасолов[1], Н.Б. Богданов[2], П. Ханги[2], В. Фуллер[3], А. Богданова[2], А.А. Макаров[1]
[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия; [2]Институт ветеринарной физиологии, Ветеринарный факультет и Цюрихский центр по интегративной физиологии человека, Университет Цюриха, Цюрих, Швейцария; [3]Сердечно-сосудистая и диабетическая медицина, Университет Данди, Данди, Великобритания

Na,K-АТФаза – трансмембранный фермент, создающий градиент ионов Na и K, необходимый для жизнеспособности всех клеток животных. Кроме транспортной функции Na,K-АТФаза также осуществляет сигнальную функцию, являясь единственным известным рецептором к кардиотоническим стероидам. В условиях гипоксии в клетках происходит ингибирование Na,K-АТФазы. Ранее нами было обнаружено, что причиной ингибирования Na,K-АТФазы при гипоксии является глутатионилирование остатков цистеина каталитической альфа субъединицы, что ведет к неспособности фермента связывать АТФ. На очищенном препарате белка было показано, что обработка окисленным глутатионом (GSSG), приводящая к инактивации Na,K-АТФазы, сопровождается возрастанием глутатионилирования остатков цистеина Cys 244, Cys 454, 458, 459. Были созданы мутанты мышиной альфа1 субъединицы Na,K-АТФазы, в которых данные остатки цистеина заменены на аланин. Полученные мутанты экспрессировали в человеческих клетках HEK293. Благодаря тому, что мышиная альфа1 и человеческая альфа1 субъединицы различаются по чувствительности к специфическому ингибитору Na,K-АТФазы кардиотоническому стероиду уабаину почти в 1000 раз, в этой системе было возможно определять активность фермента, содержащего мышиную альфа субъединицу. Было обнаружено, что замена Cys244Ala предотвращает снижение активности фермента в условиях гипоксии или при обработке GSSG. В то же время, замена остатков Cys454-458-459Ala оказалась критичной для сигнальной функции Na,K-АТФазы. Было установлено, что в клетках, экспрессирующих данный мутант в отличие от клеток, несущих дикий тип белка, не наблюдается активации Src киназы ни под действием уабаина, ни в условиях гипоксии. Согласно данным моделирования глутатионилирование остатков Cys 458 и Cys 459 приводит к нарушению взаимодействия Na,K-АТФазы с Src –киназой. Таким образом, активация Src киназы при гипоксии может быть связана с индукцией глутатионилирования Na,K-АТФазы, приводящей к высвобождению ее из комплекса с Na,K-АТФазой. Клетки, экспрессирующие мутант Cys244-454-458-459Ala, сильнее повреждались в условиях гипоксии, чем клетки, экспрессирующие дикий тип белка, что подтверждает важную роль данных остатков в адаптации клеток к условиям гипоксии. *Работа поддержана Российским научным фондом (грант №14-14-11052).*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВКЛАДА МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ В ВОЗНИКНОВЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ К ХИМИОПРЕПАРАТАМ

В.О. Шендер[1,2], П.В. Шнайдер[1,3], К.С. Ануфриева[1], Г.П. Арапиди[1], М.С. Павлюков[1], Г.А. Степанов[4], Е.С. Журавлев[4], О.С. Лебедева[2], В.А. Рихтер[4], М.А. Лагарькова [2], В.М. Говорун[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва; [3]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва; [4]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Опухоли легко развивают резистентность как к отдельным препаратам, так и к их комбинациям. Причина этого заключается в том, что небольшое количество выживших после курсов химиотерапии опухолевых клеток формируют новую опухоль, которая более не поддаётся действию препаратов, использованных ранее. Это явление хорошо описано в медицинской практике, однако почти не изучено на молекулярном уровне. Имеются данные, что погибающие в ходе терапии клетки могут секретировать сигнальные молекулы во внеклеточную среду, чтобы способствовать выживанию соседних клеток. Мы провели комплексный анализ того, как меняется секретом клеток рака яичника под действием терапии *in vitro* и *in vivo* и исследовали влияние секретируемых молекул на опухолевые клетки, а также на культуру нормальных фибробластов в качестве контроля.

С применением высокопроизводительных протеомных подходов и количественной ОТ-ПЦР мы обнаружили, что раковые клетки после воздействия химиотерапии секретируют во внеклеточное пространство белковые компоненты сплайсосом

и ряд мяРНК. Это явление наблюдалось, как в системе *in vitro* (культуральные среды раковых клеточных линий), так и *in vivo* (раковые асциты до и после химиотерапии). Сплайсинговые факторы, обнаруженные в секретомах после химиотерапии, способны приводить к эпителиально-мезенхимальному переходу. Поэтому на следующем этапе было выяснено, что индуцированные химиотерапией секретомы раковых клеток способствовали приобретению реципиентными раковыми, но не нормальными клетками более агрессивного фенотипа *de novo*, который заключался в повышенной устойчивости к последующей химиотерапии, в увеличении подвижности клеток, а также в смене поверхностных маркеров с эпителиальных (E-кадгерин) на мезенхимальные (N-кадгерин). Мы предполагаем, что компоненты сплайсосомы могут играть важную роль в изменении фенотипа опухолевых клеток под действием химиотерапии, и обмен этими белками может являться одним из механизмов возникновения резистентности. *Работа поддержана грантами РНФ 14-50-00131, РНФ 17-75-20205 и РФФИ 16-04-01414.*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВЫХ ФАКТОРОВ RPA И XPA С ДНК-ИНТЕРМЕДИАТАМИ ПОЗДНИХ СТАДИЙ ПРОЦЕССА ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ

Ю.С. Красикова, Н.И. Речкунова, О.И. Лаврик
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Генетическая стабильность организмов обеспечивается широким спектром механизмов репарации, среди которых важное место занимает эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН). Этот путь является основным в клетках млекопитающих для удаления повреждений ДНК, образующихся под воздействием УФ-излучения, а также объемных ДНК-аддуктов, возникающих под действием химических канцерогенов либо в результате применения химиотерапевтических средств. Процесс ЭРН является многостадийным и требует координированного действия более 30 полипептидов. Репликативный белок А (RPA) и фактор пигментной ксеродермы А (XPA) абсолютно необходимы для прохождения ЭРН. Гетеротримерный белок RPA участвует практически на всем протяжении процесса – от сборки предрасщепляющего комплекса и до лигирования восстановленной цепи. Предполагается, что XPA играет роль «шарнира» в комплексе ЭРН, удерживая его вместе и обеспечивая правильную работу системы, однако данные о его участии в поздних этапах процесса отсутствуют. Мы исследовали взаимодействие RPA и XPA с ДНК-структурами, моделирующими интермедиаты поздних стадий ЭРН. ДНК содержали бреши различного размера и флэп с флуоресцеин-замещённым аналогом dUMP в качестве объёмного повреждения. Методами фотоаффинной модификации и задержки в геле было выявлено, что RPA преимущественно связывается с оцДНК в бреши, а не с оцДНК флэпа. Наличие флэпа негативно сказывается на сродстве RPA к ДНК, содержащей брешь. XPA демонстрирует большее сродство к ДНК, содержащей «пузырь» размером 15 н.о., чем к ДНК, содержащей флэп и брешь или только брешь. Эксперименты по титрованию ДНК исследуемыми белками при их различном соотношении выявили, что формирование комплекса RPA-XPA-ДНК зависит от соотношения концентраций белков, и они могут действовать как в тандеме, так и как отдельные участники процесса. С помощью флуоресцентно-меченого RPA напрямую показано и охарактеризовано формирование комплекса RPA-XPA. Полученные данные указывают на то, что XPA вовлечен в поздние стадии ЭРН в комплексе с RPA. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда, №14-24-00038.*

G4 ДНК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ В ГЕНОМНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Г.Е. Позмогова, В.Б. Цветков, А.М. Варижук *ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия*

G-квадруплексы (G4) – неканонические структуры, способные формироваться в G-богатых фрагментах полинуклеотидов. Литературные данные свидетельствуют об участие G4 в регуляции ключевых процессов биогенеза. Образование геномных G4 связывают также с эпигенетическими нарушениями (аберрации гистонового кода) и хромосомными перестройками – основой широкого круга онкологических, нейродегенеративных и иммунных заболеваний. Одно из существенных препятствий при изучении механизмов G4-геномной регуляции состоит в недостаточности данных о G4-белковых взаимодействиях. Для изучения G4-интерактома мы выполнили профилирование G4-олигонуклеотидов по protoarray-чипам. Анализировали связывание флуоресцентно меченых олигонуклеотидов, формирующих различные типы G4-структур, с иммобилизованными на чипах белками человека (около 9000 белков). Результаты профилирования верифицировали независимыми методами (оптическими и электрофоретическими) на примере нескольких белков и дополнили данными pull-down экспериментов с ядерным экстрактом клеток HeLa. Мы подтвердили высокое сродство гетерогенных рибонуклеопротеинов к G4; избирательность нескольких факторов транскрипции и сплайсинга к G4 была показана впервые. Неожиданным результатом стало обнаружение аффинности к G4 ряда факторов ремоделинга хроматина. Лидерные квадруплекс-распознающие белки включают PAD4 (пептидиларгинин деиминаза – осуществляет кальций-зависимое цитруллинирование гистонов), SPT16 (субъединица комплекса FACT – катализирует перестройки нуклеосомной частицы при транскрипции) и BRD3 (представитель семейства бромодомен-содержащих белков – катализирует нуклеосомные перестройки при транскрипции ацетилированных участков хроматина). Методами молекулярного моделирования определены возможные сайты связывания G4-ДНК на поверхности PAD4 и SPT16. Классические представления о механизмах ремоделинга хроматина не предусматривают непосредственного взаимодействия гистоновых шаперонов с ДНК-структурами. Полученные данные говорят в пользу более сложных механизмов перестроек хроматина с участием G-богатых участков ДНК, способных формировать пространственно затрудненные структуры. *Работа поддержана грантом РНФ 14-25-00013.*

СУМОИЛИРОВАНИЕ ИЗМЕНЯЕТ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКА KAISO

С. Женило[1], И. Деев[2], Е.Литвинова[3], Н. Жигалова[1], Д. Каплун[1], А.Соколов[1], А. Мазур[1], Е. Прохорчук[1]
[1]Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва; [3]ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

BTB/POZ белок Kaiso является транскрипционным фактором, вовлеченным во множество процессов: опухолеобразование, сигнальный путь WNT, миграция клеток, арест клеточного цикла и апоптоз. Kaiso играет роль репрессора транскрипции, связываясь с ДНК и привлекая различные корепрессионные комплексы: N-CoR, SMRT или MTG16. Помимо участия в подавлении транскрипции Kaiso может быть вовлечен и в активацию проапоптотических генов. В этом случае Kaiso не взаимодействует напрямую с ДНК, а связывается с комплексом p53-p300 и оказывает влияние на ацетилирование p53. В данной

работе нам удалось показать, что белок Kaiso может быть модифицирован SUMO. Сайт сумоилирования был найден внутри BTB/POZ домена (42 лизин), отвечающего за белок-белковые взаимодействия и димеризацию. Сумоилирование приводит к изменению свойств Kaiso, он становится активатором транскрипции. Раннее опубликованные данные ChIP-seq анализа участков связывания Kaiso в геноме выявили положительную корреляцию между связыванием Kaiso и уровнем транскрипции. Полученные нами данные могут объяснить эту корреляцию между связыванием Kaiso и активностью генов. Для определения роли несумоилированной формы Kaiso мы провели анализ транскриптом клеток с мутантным K42R Kaiso, который выявил кластеры с изменённой экспрессией генов, вовлеченных в воспалительный ответ, ионный транспорт и регуляция кровяного давления. Обработка клеток различными стрессовыми условиями показало, что при гиперосмотических условиях происходит десумоилирование Kaiso. На физиологическом уровне нам удалось подтвердить наблюдаемый феномен: у мышей нокаутных по Kaiso детектировали повышенное давление на высокосолевой диете по сравнению с мышами дикого типа. Среди транскриптов с пониженной экспрессией был найден ген TRIM25, вовлеченный в p53/MDM2 регулирование. Анализ промотора TRIM25 показал, что в клетках с мутантным Kaiso наблюдается его гиперметилирование. Исследование уровня апоптоза подтвердило, что снижение экспрессии TRIM25 в K42R мутантных клетках делает клетки более чувствительными к гиперосмотическим условиям. Таким образом, изменение модификации белка Kaiso связано с изменением его транскрипционной активности. с одной стороны Kaiso может регулировать экспрессию. *Работа поддержана РНФ 14-14-01202.*

РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК ES1 ЧЕЛОВЕКА ВОВЛЕКАЕТСЯ В ПРОЦЕССИНГ U11 ПРЕ-SNРНК И СПЛАЙСИНГ МИНОРНОГО ТИПА

А.А. Малыгин[1,2], А.В. Гопаненко[1,2], А.Е. Тупикин[1], П.П. Лактионов[1], М.Р. Кабилов[1], Г.Г. Карпова[1,2] *[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Рибосомный белок (rp) eS1 человека участвует в трансляции, будучи компонентом рибосомы; однако о его вовлечении в клеточные процессы вне рибосомы известно мало. Применяя метод, основанный на химическом сшивании в присутствии фотоактивируемого аналога рибонуклеозида и иммунопреципитации сшивок, к клеткам HEK293, индуцибельно продуцирующим rp eS1, мы определили РНК, взаимодействующие с этим белком. Высокопроизводительное секвенирование кДНК, полученной на основе фрагментов РНК, сшитых с rp eS1, выявило продукты генов *RNU5A-1* и *RNU11* как основные партнёры этого белка, помимо рРНК. Картирование сайтов сшивок на структурах snРНК, кодируемых этими генами, позволило определить специфические элементы РНК, участвующие в связывании rp eS1. Ими оказались U-богатые последовательности, соответствующие участку в U11 snРНК, содержащему Sm-сайт, и шпильке I в U5 snРНК. Иммунопреципитация с использованием антител против rp eS1 показала, что данный белок ассоциирован с U11 пре-snРНК в клеточном ядре и цитоплазме и с U11/U12 di-snРНП в ядре. Опыты *in vitro* с рекомбинантным rp eS1 и РНК-транскриптами, соответствующими U11 snРНК и её форме без 3′-фрагмента, содержащего Sm-сайт, а также эффект олиго(U) на связывание rp eS1 с U11 snРНК, показали значительный вклад U-богатого участка, несущего Sm-сайт, в это связывание. С помощью химического футпринтинга U11 snРНК в комплексе с rp eS1 обнаружены перестройки в сахарофосфатном остове Sm-сайт-содержащей последовательности и выявлены регионы РНК, защищаемые от модификации, что дало возможность установить сходство в организации сайтов связывания rp eS1 на U11 snРНК и 18S рРНК. Наконец, клетки HEK293 со сниженным уровнем rp eS1 обладали повышенным содержанием U11 пре-snРНК с непроцессированным 3′-концом и пониженной эффективностью сплайсинга интронов минорного типа. Таким образом, наши данные впервые свидетельствуют о вовлечении свободного rp eS1 в клеточные события, связанные с процессингом и функционированием U11 snРНК, и указывают на то, что rp eS1, связанный с U11 snРНК, взаимодействует с U5 snРНК в минорной пре-каталитической сплайсосоме. *Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00528 и частично ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (базовый проект № VI.57.1.2, 0309-2016-0001) и комплексной программой СО РАН (проект № II.2П/VI.57-3 (0309-2015-0024).*

БЕЛКИ MUTS И MUTL: ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ РЕПАРАЦИИ «МИСМАТЧЕЙ» В ДНК МЕТОДОМ «КРОССЛИНКИНГА»

М.В. Монахова[1], П. Фридхофф[2], Т.С. Орецкая[1], Е.А. Кубарева[1] *[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [2]Институт биохимии, Университет им. Ю. Либиха, Гиссен, Германия*

Репарация неканонических пар нуклеотидов или «мисматчей» (MMR) – процесс, в ходе которого исправляются ошибки, возникающие в ДНК при репликации в результате неточной работы ДНК-полимераз. MutS и MutL – ключевые белки MMR, ответственные за узнавание «мисматча» и инициацию гидролиза «дочерней» цепи ДНК. Интерпретация результатов, полученных при изучении начальных этапов MMR с участием этих белков, все еще противоречива. Исследования взаимодействия MutS и MutL друг с другом и с ДНК затруднены из-за динамического характера структуры этих белков, принимающих множество различных конформаций. Предложен метод ковалентной фиксации MutS и MutL из *E. coli* на ДНК, позволяющий проводить структурно-функциональные исследования системы MMR. Сконструированы ДНК, содержащие дисульфидную группировку (для «кросслинкинга» мутантных форм MutS или MutL с единственным остатком Cys в заданной позиции), и в ряде случаев флуорофоры (для проведения исследований методом FRET). Известно, что при образовании «окончательного» узнающего комплекса MutS с «мисматч»-содержащей ДНК происходит изменение структуры дуплекса, характеризующейся отсутствием изгиба двойной спирали. Нами показано, что скорость «выпрямления» ДНК возрастает с увеличением концентрации АТФ в реакционной смеси. Изучена кинетика образования комплекса флуоресцентно меченного белка MutL, находящегося в «открытой» или «закрытой» конформации, с различными конъюгатами MutS-ДНК. Установлено, что с наибольшей скоростью с конъюгатом MutS-ДНК взаимодействует «закрытая» форма MutL, формирующаяся при высоких концентрациях АТФ (1 мМ). В этом случае дуплекс зафиксирован в ДНК-связывающей области MutS. Впервые с высоким выходом получены ковалентно связанные комплексы MutL с ДНК. Показано, что аминокислотные остатки MutL в позициях 218 и 251 наиболее сближены с ДНК-лигандом. Присутствие белка MutS увеличивает выход и скорость образования конъюгатов мутантных форм MutL с модифицированной ДНК. Ковалентная фиксация MutS в области «мисматча» позволила установить, что перемещение комплекса MutS-MutL по ДНК не является обязательным условием для активации эндонуклеазы MutH, вносящей разрыв в ДНК. *Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ (№ 16-04-00575).*

РОЛЬ ФАКТОРА ЭКСПОРТА мРНК ЧЕЛОВЕКА Gle1 В ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Т.В. Михайлова[1], А.В. Шувалов[1], Е.А. Чеснокова[2], Б.Д. Елисеев[3], П.М. Колосов[2], Christiane Schaffitzel[3,4], Е.З. Алкалаева[1]
[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; [2]Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия; [3]European Molecular Biology Laboratory, Grenoble Outstation, Grenoble, France; [4]School of Biochemistry, University of Bristol, UK

Белок Gle1 является важным компонентом аппарата экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Взаимодействуя с хеликазой Dbp5 у дрожжей на ядерной поре, он активирует гидролиз АТФ и способствует обмену РНК. Ранее было показано, что Gle1 дрожжей принимает участие в терминации трансляции, но механизм его действия оставался неизвестен. Мы обнаружили, что гомолог Dbp5 в клетках человека – белок DDX19 принимает участие в терминации трансляции, следовательно Gle1 человека тоже может быть вовлечен в этот процесс. В клетках человека в результате альтернативного сплайсинга образуется две изоформы белка Gle1 – Gle1.1 и Gle1.2. Изоформа Gle1.1 является основной, а Gle1.2 присутствует в клетках в соотношении 1:100. Для Gle1.2 было показано, что она вовлечена в образование стресс-гранул. Мы выяснили, что Gle1.1 активирует терминацию трансляции как на стадии распознавания стоп кодонов, так и на стадии гидролиза пептидил-тРНК, а Gle1.2 не вызывает активацию терминации трансляции, но при этом эффективно связывается с претерминационными комплексами. Таким образом, нами обнаружена дополнительная функция белка Gle1 человека в клетке и описан новый механизм регуляции терминации трансляции млекопитающих. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-14-00487.*

БЕЛКИ ORAI НЕ УЧАСТВУЮТ В ФОРМИРОВАНИИ ПОРЫ ЭНДОГЕННЫХ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ TRPC1

А.В. Шалыгин, Д.О. Колесников, А.Ю. Скопин, Л.Н. Глушанкова, Е.В. Казначеева
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Кальций – это универсальный внутриклеточный посредник. Нарушения внутриклеточного кальциевого гомеостаза приводят к разнообразным патологиям. Важнейшим путем поступления кальция в клетку являются депо-управляемые каналы, которые активируются кальциевыми сенсорами STIM при опустошении внутриклеточных кальциевых депо. Хорошо изучены депо-управляемые каналы ORAI, которые могут напрямую активироваться белками STIM, однако во многих типах клеток при опустошении депо активируются и другие каналы, в том числе белки семейства TRPC. Механизмы взаимодействия белков TRPC с белками ORAI и STIM остаются малоизученными. Целью этой работы было изучение роли белков ORAI1 в формировании поры и регуляции эндогенных каналов TRPC1. Исследование было построено на сравнении известных электрофизиологических свойств каналов ORAI и характеристик описанных нами эндогенных каналов, включающих в свой состав белки TRPC1, в клетках линии HEK293. В работе использовали метод локальной фиксации потенциала, позволяющий разделять токи через разные каналы. В отличие от каналов ORAI оверэкспрессия доминантно-негативного непроводящего мутанта ORAI1 E106Q не меняла проводимость эндогенных каналов TRPC1, селективность каналов TRPC1 не зависела от уровня экспрессии белков STIM. Оверэкспрессии белков TRPC1 было достаточно для увеличения числа каналов. Следовательно, можно предположить, что в состав поры эндогенных депо-управляемых каналов TRPC1 не входит белок ORAI. Регуляция каналов ORAI и эндогенных TRPC1 при опустошении депо имела ряд схожих характеристик: гомологи STIM1 и STIM2 активировали каналы, причем STIM2 с задержкой, активность каналов одинаково зависела от потенциала на мембране в растворах кальция и бария. Белок ORAI был необходим для чувствительности каналов TRPC1 к опустошению депо. В совокупности эти факты позволяют сделать вывод, что эндогенные каналы, состоящие из белков TRPC1, при опустошении депо активируются вслед за входом кальция через каналы ORAI. *Работа была поддержана грантами РНФ 14-14-00720 (Е.В.К., Д.О.К.) и РФФИ 16-04-01792 (А.В.Ш., А.Ю.С., Л.Н.Г.).*

КОМПЛЕКС ЦИТОХРОМА *С* С КАРДИОЛИПИНОМ: БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ИНГИБИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТАМИ

Л.А. Ромодин[1,2], Е.Н. Зарудная[1], Ю.А. Владимиров[2]
[1]Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина; [2] МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Одной из функций цитохрома *с* является катализ реакции перекисного окисления липидов, приводящей к выходу цитохрома *С* из митохондрий и запуску апоптоза. Этот катализ осуществляют не растворенные молекулы цитохрома *С*, и не молекулы, связанные с белковыми комплексами III и IV ЦПЭ, а комплекс цитохрома *С* с кардиолипином внутренней митохондриальной мембраны [1]. Изучение функций комплекса цитохрома *с* с кардиолипином проводилось методом активированной хемиллюминесценции (ХЛ). Было установлено, что ХЛ системы комплекс цитохрома *С* с кардиолипином –перекись водорода обусловлена именно липоксигеназной и липопероксидазной функцией комплекса цитохрома *С* с кардиолипином, а не свободными ионами Fe^{2+} в системе, также впервые установлена липопероксидазная активность митоходрий печени крысы (*Rattus norvegicus* линии *Wistar*), что подтверждает адекватность метода ХЛ в изучении комплекса цитохрома *с* с кардиолипином. Антиоксиданты, подавляя пероксидазную активность этого комплекса, способны остановить запуск апоптоза. Методом активированной кумарином С-334 ХЛ было показано угнетение липопероксидазной активности комплекса цитохрома *С* с кардиолипином под влиянием дигидрокверцетина (концентрация половинного угнетения 0,51 мкМ) и временное её подавление тролоксом (появление латентного периода) как естественного и синтетического антиоксидантов соответственно.

Таким образом, экспериментально установленная нами липопероксидазная активность интактных митохондрий означает правильность выводов предыдущих исследований in vitro касательно роли комплекса цитохрома *с* с кардиолипином в живой системе [1, 2]. Подавление его липопероксидазной активности антиоксидантами позволяет рекомендовать их использование для лечения заболеваний, связанных с патологическим апоптозом.

Литература

1. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Алексеев А.В. Молекулярные механизмы апоптоза. Структура комплекса цитохрома с с кардиолипином. Обзор//Биохимия/78, 10, 2013. с.: 1391 – 404.
2. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А., Осипов А.Н., Каган В.Е. Механизм активации пероксидазной активности цитохрома с кардиолипином//Биохимия/91, 9, 2006. с.: 1215-24.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ КРУПНЫХ ФРАГМЕНТОВ КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ МЕТОДАМИ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

К.С. Минеев, С.А. Гончарук, К.Д. Надеждин, М.В. Гончарук, Е.В. Новикова, В.А. Лушпа, Э.Ф. Кот, А.С. Арсеньев
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Мембранные белки I типа или битопные белки включают в себя множество клеточных рецепторов, которые регулируют клеточный цикл и иммунный ответ, а также принимают участие в развитии многих тяжелых заболеваний, таких как рак и неиродегенерация. У таких белков обычно наличествуют большие внемембранные домены и всего лишь одна трансмембранная (ТМ) спираль. Подобная архитектура препятствует кристаллизации битопных белков, а повышенная подвижность затрудняет их изучение при помощи крио-электронной микроскопии в высоком разрешении. Пространственная структура битопных белков обычно исследуется с применением подхода «разделяй и влавствуй», когда белок разделяется на домены, определяется их пространственная структура и строится модель полноразмерного рецептора. Это приводит к потере информации о взаимном расположении доменов белка и их взаимодействии. Мы предлагаем изучать связки доменов битопных белков, чтобы восстановить реальную структуру полноразмерных рецепторов. В настоящей работе мы применили подобный подход к рецептору TLR4, рецептору неиротрофина p75NTR, а также к полноразмерному битопному белку NRADD. Была изучена структура p75NTR с делецией внеклеточного домена в различных мембраноподобных средах, в димерном и мономерном состояниях. Параметры ЯМР-релаксации белка показали, что внутриклеточный и мембранные домены p75NTR движутся независимо, что противоречит предложенному ранее механизму активации рецептора. Была определена пространственная структура полноразмерного белка NRADD в бицеллах. Оказалось, что белок имеет схожую с p75NTR архитектуру с неструктурированными внеклеточным доменом и примембранными регионами. Наконец, исследование структуры ТМ домена TLR4 с цитоплазматическими примембранными регионами показало, что ТМ домен был аннотирован некорректно и все толл-подобные рецепторы имеют длинные ТМ спирали, что может объяснить особенности локализации рецепторов в микродоменах клеточной мембраны. В целом, перечисленные результаты проясняют структурные основы механизмов активации и сигнализации клеточных рецепторов – битопных белков. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-14-00573.*

РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ НОВОГО ТИЕНОПИРИМИДИНОВОГО ПРОИЗВОДНОГО С АКТИВНОСТЬЮ АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА СТЕРОИДОГЕНЕЗ И УРОВЕНЬ ТЕСТОСТЕРОНА У САМЦОВ КРЫС

А.А. Бахтюков, К.В. Деркач, Д.В. Дарьин, Т.С. Шарова, Ю.Р. Рыжов, А.О. Шпаков *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург; Санкт-Петербургский государственный университет, Россия*

Важнейшим регулятором репродуктивных функций является лютеинизирующий гормон (ЛГ) и его гомолог – хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Однако препараты гонадотропинов характеризуются побочными эффектами. Альтернативой им являются низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ – тиенопиримидины (ТП), которые, в отличие от гонадотропинов, проникают внутрь трансмембранного канала и связываются там с аллостерическим сайтом рецептора. Целью работы было изучить влияние однократного и длительного (3 и 5 сут) введения самцам крыс нового ТП – 5-амино-N-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамида (ТР03) на уровень тестостерона (Т) и экспрессию генов рецептора ЛГ и ферментов стероидогенеза в семенниках. ТР03 вводили в/б, в дозе 15 мг/кг/сут, взятый для сравнения ХГЧ – п/к, в дозе 100 МЕ/крысу/сут. Уровень Т повышался через 1 ч после введения ТР03 и оставался повышенным на протяжении 5 ч с максимумом через 3 ч. Значение AUC для кривой «уровень Т/время» у крыс, обработанных ТР03, было на 121 % выше, чем в контроле, но в 3 раза уступало AUC для ХГЧ. Эти данные свидетельствуют о стимулирующем продукцию Т эффекте ТР03, но менее выраженном в сравнении с ХГЧ. При длительном введении ТР03 отмечали повышение уровня Т (1-3 сут), затем его снижение (4-е сут) и повышение на 5-е сут. В случае ХГЧ отмечали выраженный пик на 1-е сут, снижение и полное отсутствие эффекта на 3-е сут и повышение уровня Т на 4-5 сут. Одной их причин этого является резистентность к ХГЧ у крыс, обработанных гонадотропином, т.к. на 3-е сут экспрессия рецептора ЛГ составила менее 10% от контрольного уровня. В случае ТР03 на 3-е сут экспрессия гена Lhr снижалась на 38%, а на 5-е сут возрастала. Введение ХГЧ повышало экспрессию гена Star (1-5 сут), транспортирующего холестерин в митохондрии, а на 3-е и 5-е сут – повышало экспрессию генов цитохрома P450scc, 3β-гидроксистероиддегидрогеназы, цитохрома P450-17α. Введение ТР03 почти не влияло на экспрессию гена Star и приводило в основном к снижению экспрессии генов стероидогенных ферментов, несмотря на повышенный уровень Т. При обработке ТР03 сохраняется функциональная активность рецептора ЛГ, что не требует компенсаторного повышения экспрессии Star и ферментов стероидогенеза. *Работа поддержана РФФИ (проект № 16-04-00126).*

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ НЕОПИОИДНОГО ДЕЙСТВИЯ БЕТА-ЭНДОРФИНА

Е.В. Наволоцкая *Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московская область, Россия*

Синтезирован пептид октарфин (TPLVTLFK), соответствующий фрагменту 12-19 бета-эндорфина. Установлено, что он является селективным агонистом неопиоидного (не чувствительного к опиоидному антагонисту налоксону) рецептора бета-эндорфина. С помощью меченного тритием октарфина изучено распределение рецептора в организме. Установлено, что он имеется на клетках иммунной (перитонеальные макрофаги, Т- и В-лимфоциты селезенки и крови), эндокринной (кора надпочечников, гипоталамус), сердечно-сосудистой (кардиомиоциты) систем. Характеристика специфичности связывания показала, что только немеченый бета-эндорфин способен вытеснять меченый октарфин из комплекса с рецептором, протестированные параллельно альфа-эндорфин, гамма-эндорфин, энкефалины и целый ряд пептидных гормонов были неактивны. Исследование действия октарфина на клетки-мишени показало, что он увеличивает индуцированную митогеном пролиферацию Т- и В-лимфоцитов человека мыши *in vitro*, активирует перитонеальные макрофаги мыши in *vitro* и *in vivo*, стимулирует рост человеческих Т-лимфобластных клеточных линий Jurkat и МТ-4, ингибирует активность аденилатциклазы мембран коры надпочечников крысы и подавляет секрецию глюкокортикоидов из надпочечников в кровь. Установлено, что в

диапазоне концентраций 1-1000 нМ пептид увеличивает активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS), растворимой гуанилатциклазы (sGC), а также содержание NO и cGMP в активированных липополисахаридом перитонеальных макрофагах мыши, крысы и морской свинки. Активность октарфина зависела от его дозы и была максимальной при концентрации 100 нМ. Полученные результаты позволяют заключить, что активирующий эффект октарфина и бета-эндорфина на макрофаги, опосредованный через неопиоидный рецептор, реализуется следующим путем: увеличение экспрессии iNOS → возрастание продукции NO → увеличение активности sGC → возрастание внутриклеточного уровня cGMP.

ПЕПТИД ИЗ МОРСКОЙ АНЕМОНЫ *URTICINA EQUES* ОБЛАДАЕТ АНТИМИКРОБНОЙ И АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Ю.А. Логашина[1,2,#], Р.Г. Солстад[3,#], Ю.В. Королькова[1], И.В. Мошарова[1], С.А. Козлов[1], К. Стенсвог[3], Т. Хауг[3], Я.А. Андреев[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия; [3]Norwegian College of Fishery Science, Faculty of Biosciences, Fisheries and Economics, UiT – The Arctic University of Norway, Tromsø, Norway

Рецептор TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1) играет важную роль в инициации и развитии нейрогенного воспаления и ишемической нейродегенерации. Агонисты TRPA1 активируют чувствительные нейроны, вызывая острую боль, термическую и механическую гипералгезию, а также нейрогенное воспаление. Таким образом, рецептор TRPA1 является потенциальной мишенью для новых противовоспалительных и обезболивающих препаратов. Пептид Ueq 12-1, выделенный из морской анемоны *Urticina eques*, обладает новой биологической активностью: ингибирует рост грам-положительных бактерий *Corynebacterium glutamicum* и потенциирует TRPA1 рецептор. Пептид Ueq 12-1 характеризуется необычным распределением цистеинов в аминокислотной последовательности и необычной стабилизированной дисульфидами пространственной структурой, которая частично похожа на укладку дефензин-подобных пептидов. В CHO клетках, стабильно экспрессирующих TRPA1, Ueq 12-1 потенциирует активацию рецептора селективным агонистом AITC. Пептид не активирует рецептор в экспрессирующих TRPA1 *Xenopus laevis* ооцитах, но значительно увеличивает токи, индуцируемые неселективным агонистом рецептора, диклофенаком, и AITC. Кроме того, при концентрации 750 μM Ueq 12-1 не наблюдается стандартный ответ на действие агониста, что, скорее всего, является результатом потери рецептором своей функциональности в присутствии пептида. Введение Ueq 12-1 в лапу мышам не вызывало боль, отёчность или термическую гипералгезию. Наоборот, пептид значительно снижал болевой эффект от действия AITC, а также гипералгезию и воспаление, вызываемые введением CFA. Селективный антагонист TRPA1, A-967079, полностью блокирует эффект Ueq 12-1 у мышей в модели воспаления. Следовательно, активация TRPA1 является обязательным условием анальгетического эффекта пептида. Скорее всего, действие Ueq 12-1 заключается в потенциировании и «выключении» рецептора в чувствительных нейронах или десенситизации самих нейронов. Благодаря антиноцицептивным свойствам Ueq 12-1 может стать основой нового обезболивающего препарата с антибактериальными свойствами. *[#]Авторы внесли одинаковый вклад в работу*.

РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО БЕЛКА Ku В РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ-1

М.Б. Готтих, А.Н. Анисенко, Е.С. Княжанская, С.П. Королев, О.А. Шадрина
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Белок человека Ku, состоящий из субъединиц Ku70 и Ku80, выполняет в клетке множество функций, главной из которых является участие в репарации двуцепочечных разрывов в ДНК по механизму негомологичного соединения концов. Описано также участие Ku в регуляции репликации, транскрипции и трансляции, поддержании целостности теломер и ряде других клеточных процессов. Помимо этого обнаружено, что клеточный белок Ku важен для успешной репликации ВИЧ-1. Механизм, по которому Ku стимулирует развитие вируса, пока непонятен. Существует две основные гипотезы: 1) Ku влияет на транскрипцию с интегрированной в геном клетки вирусной ДНК и 2) Ku способствует успешной интеграции, взаимодействуя с интегразой ВИЧ-1 и защищая ее от протеасомной деградации. В литературе существуют данные, как подтверждающие, так и опровергающие каждую из этих гипотез. С использованием двух разных репортерных систем мы проверили, как влияет на транскрипцию и интеграцию изменение уровня каждой из субъединиц Ku в клетке. Первая система представляет собой вектор, кодирующий люциферазу под контролем промотора ВИЧ-1. Экспрессия люциферазы в этой системе активировалась при понижении уровня Ku70 и повышении уровня Ku80; отметим, что экспрессия люциферазы под контролем промотора цитомегаловируса не зависела от уровня Ku70 или Ku80. Учитывая, что снижение уровня Ku70 с помощью siRNA приводит к частичному повышению концентрации несвязанного Ku80, мы сделали вывод, что транскрипция с промотора ВИЧ-1 активируется при повышении уровня свободного Ku80 в клетке. Проверка влияния Ku на интеграцию проводилась с использованием VSV-псевдотипированного репликативно-некомпетентного вектора на основе ВИЧ-1, в котором ген люциферазы находится под контролем промотора цитомегаловируса и эффективность ее экспрессии коррелирует с уровнем интеграции ее гена в геном клетки. Оказалось, что эффективность интеграции существенно снижается при уменьшении концентрации Ku70. Мы подробно изучили взаимодействие Ku70 с интегразой ВИЧ-1 и выявили основной сайт связывания этих белков, мутации в котором препятствуют связыванию. *Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 17-14-01107) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 17-04-01178).*

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ, КОДИРУЕМЫХ ВИРУСОМ ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ

Т.Н. Ерохина[1], Е.А. Лазарева[2], А.Г. Соловьев[3], С.Ю. Морозов[3]
[1]Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Биологический факультет и [3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Однокомпонентный геном тобамовирусов представлен +РНК длиной 6,3–6,6 Кб. Геномная РНК содержит тРНК-подобную структуру на 3'-конце. Традиционно считалось, что эти вирусы являются цитоплазматическими и кодируют четыре белка, действующие в различных компартментах цитоплазмы. Белок, кодируемый геном ORT1, содержит, как известно, мотивы метилтрансферазы и РНК-хеликазы, и транслируется с использованием слабого терминирующего кодона совместно с геном ORT2, который кодирует домен РНК-зависимой РНК-полимеразы. ORT3 кодирует транспортный белок (ТБ) размером 30 кДа. ORT4 направляет синтез вирусного белка оболочки (БО). Ранее мы обнаружили, что геномы некоторых тобамо-

вирусов кодируют, в дополнение к известным, положительно заряженный пептид размером 6 Кда (так называемый белок ORT6). Примечательно, что субклеточная локализация этого белка довольно необычна для цитоплазматического вируса: белок ORT6 на ранних этапах обнаруживается в ядрышке, и позднее перемещается в нуклеоплазму и митохондрии. Продукт ORT1 (РНК-хеликаза) также выполняет неканонические функции супрессора РНК-сайленсинга. Недавно мы открыли новую группу ретротранспозонов семейства R1 LINE у насекомых, которые содержат дополнительный неканонический С-терминальный домен у закодированного полипротеина. Этот домен имеет значительное сходство с доменом РНК-хеликазы, закодированным в геноме вируса табачной мозаики. Мы предположили, что за счет горизонтального переноса генов от вирусов, сходных с ВТМ, ретротранспозоны насекомых приобрели ген хеликазы. В результате в ретротранспозонах появились элементы, способные подавлять сайленсинг РНК и, таким образом, противодействовать механизмам защиты насекомых против ретротранспозонов. Действительно, наши экспериментальные данные подтвердили, что у домена РНК-хеликазы насекомых явно обнаруживается способность подавлять сайленсинг РНК в живом организме. Дальнейшие данные о развитии исследований по неканоническим функциям белков ВТМ будут представлены. *Эта работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 16-04-00765).*

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ

С.В. Тиллиб, Т.И. Иванова, О.С. Горяйнова, А.И. Бурлин, Е.О. Хан, Ю.О. Добролюбова
Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Однодоменные антитела (nanobodies, наноантитела) – в нашем случае это рекомбинантные белки, являющиеся производными однодоменных антиген-узнающих вариабельных фрагменов особых антител, состоящих из димера укороченных тяжелых цепей при полном отсутствии легких цепей, и присутствующих, наряду с обычными антителами, в норме у представителей сем. Camelidae (Верблюдовые) и у некоторых видов хрящевых рыб. Особые свойства наноантител в сравнении с классическими антителами: малый размер, высокая растворимость и стабильность, способность к быстрой ренатурации, способность формировать необычные паратопы и узнавать необычные эпитопы антигенов, а также наличие эффективной технологии их генерирования и отбора, – могут обеспечить определенные преимущества при их использовании по сравнению с антителами традиционной структуры и их производными. Перспективные направления использования наноантител, которые развиваются в нашей лаборатории, будут представлены в докладе. Будут рассмотрены: способы модификации исходно получаемых наноантител для конкретных приложений, использование наноантител и их производных в качестве лигандов в новых иммуносорбентах, в качестве зондов, экспрессирующихся *in vivo*, в качестве инструментов для диагностических исследований, а также для борьбы с инфекциями, онкологическими и аллергическими заболеваниями.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПОВЕРХНОСТНОЙ МОДИФИКАЦИИ НАНОЧАСТИЦ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ АГЕНТОВ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ

В.О. Шипунова[1,2,3], И.В. Зелепукин[1,2,3], М.П. Никитин[1,3,4], П.И. Никитин[4], С.М. Деев[1,2] *[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; [3]Московский физико-технический институт (государственный университет);[4]Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия*

На данный момент проблема адресной доставки соединений в определённые области организма является одной из ключевых в развитии персонализированной медицины. Особое внимание заслуживает тераностика – современное направление, объединяющее в себе диагностические и терапевтические воздействия на организм посредством одного препарата. Перспективными средствами для создания тераностических агентов представляются наночастицы различной природы и многокомпонентные структуры на их основе. Мультифункциональность таких структур достигается, например, путём их модификации различными биомолекулами. Наиболее распространённым методом поверхностной модификации наночастиц является химическая конъюгация биомолекул, которая часто приводит к неориентированному и/или неселективному присоединению, а также к частичной потере функциональной активности присоединяемых компонентов, что снижает эффективность использования всего потенциала наноструктур в тераностике. В данной работе были разработаны новые методы модификации наночастиц биомолекулами, которые заключаются в использовании пептидов (как синтетических, так и биогенного происхождения), которые эффективно связывают поверхность немодифицированных частиц – как посредством электростатических взаимодействий, так и благодаря процессу биоминерализации. Использование генно-инженерных методов позволило создать белки слияния данных пептидов с направляющим модулем, селективно распознающим онкомаркёр HER2/neu, а именно – белком DARPin9.29. Наночастицы различной природы (магнитные и флуоресцентные) были покрыты данными белками и высокоселективно доставлены к раковым клеткам, гиперэкспрессирующим HER2/neu. Таким образом, в данной работе были разработаны универсальные подходы к биомодификации наноструктур и эффективность подходов была подтверждена селективной адресной доставкой наночастиц различной природы к раковым клеткам. *Исследование выполнено при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» в рамках научного проекта № 17-34-80105 «мол_эв_а» (работа с клеточными культурами) и финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта №14-24-00106 (модификация и синтез наночастиц).*

ИНГИБИРОВАНИЕ ТРОМБИНА, ЦЕНТРАЛЬНОГО БЕЛКА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ, В СИСТЕМЕ АПТАМЕР-АНТИДОТ

В.А. Спиридонова[1], А.В. Мельничук[1], Т.М. Новикова[1], А.Б. Добровольский[2], Е.В.Титаева[2], А.В. Мазуров[2]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва, Россия

Тромбин – центральная протеиназа системы свертывания крови. Он катализирует образование фибрина из фибриногена и агрегацию тромбоцитов – ключевые реакции в процессах внутрисосудистого тромбообразования и остановки кровотечений. Разработка новых ингибиторов на основе нуклеиновых кислот (аптамеров), способных специфически и с высокой аффинностью связывать фермент, а также антидотов к ним, имеет преимущество перед другими ингибиторами. Антидотами являются комплементарные олигонуклеотиды, которые разрушают комплекс тромбин-аптамер. Тремя независимыми методами (поверхностный плазмонный резонанс, электрофорез в ПААГ, медицинские тесты) показано образование специфиче-

ских комплексов тромбина с различными по структуре аптамерами. Изучено влияние антидота на стабильность таких комплексов. Рассчитаны термодинамические параметры разворачивания G-квадруплексных структур аптамеров с помощью антидота. Аптамерные ДНК к тромбину и антидоты к ним рассматриваются в качестве антитромботических препаратов для использования в терапии.

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ЛАКТОФЕРРИНА С НЕНАСЫЩЕННЫМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ

А.В. Соколов[1,2,3], А.Ю. Власенко[1], В.А. Костевич[1,2], В.В. Егоров[1], Э.А. Старикова[1], Е.П. Киселева[1], Е.Т. Захарова[1], О.М. Панасенко[2], В.Б. Васильев[1,3] *[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; [2]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва; Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

Катионный трансферрин экзокринных секретов и гранул нейтрофилов, лактоферрин (ЛФ), является одним из мажорных белков грудного молока. Для многих белков молока, например альфа-лактальбумина, показано формирование комплексов с олеиновой кислотой (HAMLET) с выраженной активностью против раковых клеток. Недавно цитотоксический комплекс с олеиновой кислотой был описан и для ЛФ из молока коров. Целью нашей работы было сравнение взаимодействия различных жирных кислот с ЛФ (человека и коровы). В течение 1–5 часов после внутрибрюшинной инъекции крысам ЛФ человека либо ЛФ коровы (100 мг/кг) крысам мы обнаружили увеличение концентрации неэстерифицированных жирных кислот в 1,5–4,2 раза. При добавлении растворов различных жирных кислот в этаноле к ЛФ мы не наблюдали образования мицелл, характерного для смешивания жирной кислоты с водой и физиологическим раствором только в случае ненасыщенных жирных кислот: олеиновой, линолевой, линоленовой и арахидоновой. Насыщенные жирные кислоты, пальмитиновая и стеариновая, не взаимодействовали с ЛФ. Титрование ЛФ показало, что один моль ЛФ может связать до 8 моль олеиновой, до 6 моль линолевой, до 5 моль линоленовой и арахидоновой кислот. При этом ЛФ человека и коровы практически не отличались по способности к связыванию перечисленных жирных кислот. Комплексы ЛФ с ненасыщенными жирными кислотами индуцировали апоптоз раковых клеток (HL-60, THP-1, Jurkat) и лимфоцитов, выделенных из периферической крови человека, а также дозо-зависимым образом инициировали гемолиз. Присутствие в среде специфического партнера ЛФ, церулоплазмина, предотвращало описанные выше цитотоксические эффекты. Вероятно, взаимодействие церулоплазмина с комплексами ЛФ и жирных кислот может модулировать их цитотоксическую активность. В пилотном опыте при изучении динамики роста опухолей после инокуляции гепатомы 22А у мышей линии С3НА в течение двух недель у пяти из девяти мышей, получавших комплекс ЛФ-олеиновая кислота, не наблюдалось заметного роста опухолей, в отличие от контрольной группы животных с практически равномерным и выраженным ростом опухолей. *Исследование поддержано грантом Президента РФ МК-5074.2016.4.*

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

ОКИСЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРИСУТСТВИИ МЕТАНОБАКТИНА ИЗ *METHYLOCOCCUS CAPSULATUS* (M)

Л.В. Авдеева, Р.И. Гвоздев *Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия*

Активные формы кислорода постоянно образуются в живой клетке как продукты нормального метаболизма кислорода. В жизнедеятельности живых организмов одно из важных мест занимают процессы окисления аскорбиновой кислоты и разложения пероксида водорода. Аскорбиновая кислота в клетке может вступать в окислительно-восстановительные реакции и выполнять роль антиоксидантов. Пероксид водорода дает сильнейший окислитель OH• в присутствии ионов Fe^{2+} или Cu^{+} (реакция Фентона). Так известно, что пероксид водорода является ингибитором для мембраносвязанной метанмонооксигеназы – ключевого фермента метанотрофов. Метанотрофы синтезируют метанобактин, который является новым низкомолекулярным (<1200 Да) хромопептидом, выполняющим роль внеклеточного компонента системы связывания меди метанотрофов. Известно, что окисление аскорбиновой кислоты может проходить в присутствии гетеробиметалических комплексов меди. В связи с чем целью данной работы было изучение роли метанобактина в реакции окисления аскорбиновой кислоты пероксидом водорода. Выделение метанобактина осуществляли из культуральной жидкости *Methylococcus capsulatus* (M) методом жидкостной хроматографии на колонке с носителем Diaion HP20 (Supelco). Комплекс метанобактина с медью получали путем инкубирования метанобактина с водным раствором сульфата меди. За образованием комплекса следили по тушению флуоресценции. Реакцию окисления аскорбиновой кислоты пероксидом водорода в присутствии метанобактина проводили при 21°C в среде 0,05 M натрий-ацетатного буфера, pH 4,5–6,0. За окислением аскорбиновой кислоты наблюдали по уменьшению поглощения при 265 нм (ε=7000 $M^{-1}см^{-1}$). Кинетические параметры реакции определяли из зависимостей начальных скоростей от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера–Берка. Установлено, что кинетика окисления аскорбиновой кислоты в присутствии метанобактина подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен. Таким образом, метанобактин из *M. capsulatus* (M) помимо транспортных функций (перенос ионов меди) обладает каталитическими свойствами в реакции окисления аскорбиновой кислоты пероксидом водорода. Это означает, что метанобактин может участвовать в детоксикации продуктов восстановления молекулярного кислорода, в частности пероксида водорода.

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ ГИСТОНОВ АУТОАНТИТЕЛАМИ КРОВИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ

С.В. Баранова, Г.А. Невинский *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, СО РАН, Новосибирск, Россия*

Аутоантитела с ферментативной активностью (абзимы) – отличительная особенность аутоиммунных и вирусных заболеваний. Сходство некоторых белков человека и вируса – это один из факторов сбоя иммунной системы. В организме сначала нарабатываются антитела против белков вируса, а затем иммунная система перестает различать чужеродные и собственные белки. Согласно литературным данным, в крови больных ВИЧ повышается концентрация гистонов. Показано, что электрофоретически и иммунологически гомогенные IgG, выделенные из крови ВИЧ-инфицированных пациентов и очищенные на аффинных сорбентах (гистон-сефароза), с высокой эффективностью гидролизуют гистоны, но не другие белки. На основании общепринятых критериев доказано, что гистон-гидролизующая активность является собственным свойством антител.

Методом масс-спектрометрии MALDI-TOF впервые идентифицированы сайты расщепления гистонов H2a (129 аминокислотных остатка, АК), H2b (125 АК), H3 (135 АК) и H4 (102 АК) анти-гистон антителами крови ВИЧ-инфицированных больных. Показано, что антитела гидролизуют гистон H2a в центральной части домена (31–38 АК, 2 главных, 4 умеренных сайта). В концевых доменах сайты гидролиза располагаются в антигенных детерминантах (1 главный и 2 умеренных (14–22 АК), 5 слабых (82–102 АК)). Для гистона H2b показано, что в центральном домене расположены 2 главных и 4 умеренных сайта расщепления (46–63 АК). В N-концевом домене – 2 умеренных сайта в одной из антигенных детерминант (12–17 АК). В С-концевом домене – 1 главный, 2 умеренных сайта гидролиза (80–88 АК). Абзимы гидролизуют гистон H3 в двух последовательностях центрального домена (18–30 АК, 3 главных, 5 слабых; 34–50 АК, 5 слабых). В гистоне H4 расщепление происходит в последовательности эпитопа (15–31 А, 3 главных, 2 умеренных, 2 слабых). В ходе работы установлено, что большинство сайтов расщепления гистонов расположены в области, взаимодействующей с ДНК. Согласно кристаллической структуре нуклеосомной частицы ядра, все идентифицированные сайты расщепления влияют на сборку нуклеосом. Наработка абзимов, гидролизующих гистоны, может быть очень важно для понимания неизвестных возможностей иммунной системы и биологических функций антител. *Работа поддержана грантами РФФИ №№ 15-04-03245, 16-34-00079, 16-04-00604.*

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ С РАЗВИТИЕМ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

А.А. Бойко[1], А.В. Муравьева[1], Н.И. Троянова[1], М.В. Гречихина[1], Н.В. Пономарева[2], В.Ф. Фокин[2], Е.Ю. Федотова[2], Т.Л. Ажикина[1], Е.И. Коваленко[1], А.М. Сапожников[1]

[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Научный центр неврологии», Москва, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний. Все больше данных свидетельствуют о том, что в патогенезе этого заболевания существенную роль играют региональные и периферические иммунные процессы. Это обусловило активный поиск взаимосвязи клинических признаков развития БП с показателями иммунного статуса пациентов. В рамках указанной проблемы нами проводится комплексный анализ нейрофизиологических и иммунологических характеристик при развитии БП.

На первом этапе данной работы была обследована группа из 30 добровольцев, включающая здоровых доноров и пациентов с БП. В результате этого исследования был обнаружен ряд характеристик клеток иммунной системы, существенно отличающихся у двух обследованных групп. В частности, анализ экспрессии активирующего рецептора NKG2C на лимфоцитах периферической крови доноров выявил увеличение доли NKG2C-позитивных NKT-подобных клеток в группе больных БП. В той же субпопуляции $CD3^+CD56^+$ у пациентов с БП была увеличена доля HLA-DR-позитивных клеток, что свидетельствует об их активации. Полученные данные указывают также на то, что в нейтрофилах периферической крови пациентов уровень HSP70 значительно снижен по сравнению с группой здоровых доноров, которое происходит на фоне увеличения транскрипционной активности гена HSPA8 у больных БП.

В экспериментах с клетками крови здоровых доноров было обнаружено, что популяции гранулоцитов (PMN) и мононуклеаров (PBMC) значительно отличаются по профилю экспрессии HSP70. Уровень конститутивного белка Hsc70 был значительно выше в PBMC по сравнению с PMN. В то же время в PMN внутриклеточное содержание индуцируемого белка Hsp70 было достоверно выше по сравнению с PBMC. В условиях гипертермии наблюдалось выраженное увеличение экспрессии генов HSPA1A/B (кодирующих Hsp70) как в PMN, так и PBMC. Однако в PMN индуцированная транскрипция гена HSPA8 (кодирующего Hsc70) была значительно выше, чем в PBMC. Указанные различия в транскрипции генов HSPA и внутриклеточном уровне HSP70 в популяциях лейкоцитов могут отражать специфические потребности в функционировании пула белков-шаперонов у иммунокомпетентных клеток с разной функциональной активностью и их ролью в иммунном ответе. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 16-15-10404.*

ВЛИЯНИЕ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β-ГЛИКОПРОТЕИНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

М.Б. Раев[1,2], В.П. Тимганова[1], М.С. Бочкова[1], П.В. Храмцов[1,2], М.Д. Кропанева[2], А.П. Калугина[2], С.А. Заморина[1,2]

[1]Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь;
[2]Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Трофобластический β1-гликопротеин (ТБГ) является одним из маркеров формирования и функционирования фетоплацентарной системы. Однако, роль ТБГ в формировании иммунной толерантности в период беременности находится на стадии изучения. Одним из ключевых факторов толерантности является субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). Дифференцировку Treg можно оценить по ядерной экспрессии транскрипционных факторов FOXP3 и HELIOS, а функциональная активность этих клеток ассоциирована с экспрессией CTLA4 п продукцией ИЛ-10. Таким образом, целью работы являлась оценка влияния ТБГ на экспрессию маркеров Treg (CTLA4, FOXP3 и HELIOS) и продукцию ИЛ-10 $CD4^+$-клетками.

Аутентичный нативный ТБГ человека получали авторским методом [Патент РФ № 2367449, Раев М.Б.]. Монокультуры CD4+-клеток получали методом иммуномагнитной сепарации (MACS®) из суспензии мононуклеарных клеток доноров (женщины, n=8). Эффекты ТБГ (1, 10, 100 мкг/мл) оценивали после 72 ч культивирования $CD4^+$-клеток в ППС при 370°C и 5% CO_2 в присутствии активатора (T-Cell Expansion Kit («Miltenyi Biotec») и ИЛ-2 (10 нг/мл). Экспрессию CTLA4, HELIOS и FOXP3 оценивали на проточном цитометре BD FACSCaliburTM, США. В работе применяли метод дифференциального гейтирования, позволяющий оценить экспрессию таргетных маркеров в зависимости от пролиферативного статуса клетки. Уровень ИЛ-10 оценивали иммуноферментным методом («Вектор-Бест»). Статистическую обработку проводили при помощи критерия Вилкоксона. Установлено, что ТБГ дозозависимо угнетал пролиферацию активированных $CD4^+$-лимфоцитов, одновременно снижая уровень ИЛ-10 в супернатантах.

Показано, что ТБГ (10 и 100 мкг/мл) угнетал экспрессию FOXP3 и HELIOS в не пролиферирующих клетках, а экспрессия CTLA4 под влиянием ТБГ (100 мкг/мл) снижалась до нуля. В то же время, на уровне пролиферирующих клеток, наблюдалась выраженная тенденция к увеличению FOXP3-позитивных клеток в культурах с ТБГ (10 и 100 мкг/мл) при параллельном снижении экспрессии CTLA4. Таким образом, установлено, что ТБГ оказывает супрессивные эффекты на дифференцировку

Treg в не пролиферирующем пуле $CD4^+$-лимфоцитов, одновременно угнетая продукцию ИЛ-10 этими клетками. Полученные данные расширяют представления о роли ТБГ в дифференцировке Treg.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-44-0591-а.

ЭВОЛЮЦИОННАЯ РОЛЬ КОНЦЕВЫХ УЧАСТКОВ ТРЕТЬЕГО ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ МИТОХОНДРИЙ ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE*

К.С. Дербикова, С.А. Левицкий, А.В. Кузьменко, М.В. Климонтова, П.А. Каменский
МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Согласно эндосимбиотической теории, митохондрии произошли от древних альфа-протеобактерий. С ходом эволюции большинство генов органеллы были перенесены в ядро, однако небольшое количество белков осталось закодированным в геноме митохондрий. Для реализации данных генов необходимо наличие собственного аппарата синтеза белка органеллы. Митохондриальная система трансляции устроена в целом по бактериальному типу, однако, имеет ряд особенностей. Так, третий фактор инициации трансляции у бактерий (IF3) состоит из двух доменов, соединенных линкерным регионом, тогда как митохондриальные факторы (IF3mt) различных организмов содержат дополнительные N- и C- концевые участки. Данная работа посвящена исследованию роли концевых участков IF3mt пекарских дрожжей Saccharomyces cerevisiae – белка Aim23p. Ранее было показано, что для нормального функционирования фактора необходимо наличие у него хотя бы одного из концевых участков. Для проверки функциональной значимости концевых участков Aim23p были созданы штаммы S. cerevisiae, в которых Aim23p был заменен химерным фактором, состоящим из бактериального IF3, фланкированного концевыми участками Aim23p. Было показано, что такой белок способен полностью функционально заменять дрожжевой фактор. В связи с тем, что концевые участки являются важной отличительной чертой митохондриального фактора, была проверена активность лишенного концевых участков Aim23p в клетках E.coli. В ходе эксперимента по комплементации было продемонстрировано, что такой фактор не способен заменять IF3 бактерий. Полноразмерный же Aim23p не только функционально не активен в E.coli, но и вызывает снижение скорости роста культуры при наличии в клетках одновременно и бактериального, и митохондриального факторов. Эксперименты *in vitro* подтвердили способность полноразмерного Aim23p связываться с бактериальными рибосомами, вероятно препятствуя нормальной работе бактериального IF3. Полученные экспериментальные данные позволяют предположить, что концевые участки Aim23p возникли в ходе эволюционного процесса как результат адаптации к изменениям в рибосомах митохондрий. Однако удаление данных участков не приводит к возникновению активности фактора в клетках бактерий. *Работа поддержана грантом РНФ № 17-14-01005.*

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ α-СПИРАЛЬНОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА CHMAP-28

А.А. Емельянова, Д.В. Кузьмин, П.В Пантелеев, Т.В. Овчинникова
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Известно, что некоторые антимикробные пептиды (АМП) обладают противоопухолевым действием за счет способности селективно воздействовать на цитоплазматическую мембрану и мембрану митохондрий раковых клеток. Нами проведено изучение цитотоксического эффекта и механизма клеточной гибели α-спирального антимикробного пептида ChMAP-28 из лейкоцитов козы *Capra hircus*. Пептид ChMAP-28 имеет молекулярную массу 3365 Да и обладает основными свойствами за счёт наличия пяти остатков лизина, четырёх остатков аргинина и двух остатков гистидина. Рекомбинантный пептид был получен методом гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*. Изучение цитотоксического эффекта ChMAP-28 проводилось *in vitro* на панели суспензионных и адгезионных опухолевых и нормальных клеточных линий человека и мыши с помощью МТТ-теста после инкубации с пептидом в течение 48 ч. Для опухолевых клеточных линий в МТТ-тесте величина IC50 составила от 3,4 до 6,5 мкМ. Значение IC_{50} для нормальных клеток – фибробластов человека – составило 9,2 мкМ, для астроцитов не достигалось 50% гибели в максимальной концентрации 10 мкМ. В выбранном диапазоне концентраций ChMAP-28 мало токсичен для эритроцитов человека: он вызывает гемолиз менее 10% эритроцитов. Для определения механизма действия ChMAP-28 на опухолевые клетки было проведено двойное окрашивание клеток HL-60 с последующей проточной цитофлуориметрией. Пептид вызывает гибель более 60% клеток в концентрации, равной IC50, при этом клетки окрашиваются аннексином V – FITC и иодидом пропидия, что является признаком позднего апоптоза или некроза. Соотношение мертвых и живых клеток сохраняется после 1, 2 и 4 ч инкубации с пептидом. Окрашивание трипановым синим показало, что ChMAP-28 вызывает гибель клеток уже после 15 мин инкубации. При этом доли мертвых клеток HL-60 после 15 минут и 1 часа инкубации с пептидом были сопоставимы. Поскольку эффект зависит от концентрации, но не зависит от времени инкубации и проявляется непосредственно в первые минуты, механизм клеточной гибели предположительно является некрозом. Добавление ингибитора каспаз Z-VAD-FMK не влияет на цитотоксический эффект, что исключает апоптоз с участием каспаз. *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ИЗОФОРМЫ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩИХ БЕЛКОВ ЧЕЧЕВИЦЫ И ГОРОХА

А.Д. Зазыкина, И.В. Богданов, Е.И. Финкина, Д.Н. Мельникова, Т.В. Овчинникова
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Липид-транспортирующие белки (LTP) растений – семейство катионных белков с молекулярной массой 6,5–10,5 кДа, имеющих как внутриклеточную, так и внеклеточную локализацию. Растительные LTP кодируются мультигенными семействами и в растениях представлены в виде множества изоформ. Уровни экспрессия генов, кодирующих изоформы, различаются в зависимости от локализации и стадий онтогенетического развития растения. Предполагается, что изоформы липид-транспортирующего белка в растении выполняют различные функции. Синтез множественных изоформ LTP является одним из элементов защиты растения от воздействия абиотических и биотических стрессовых факторов. В рамках работы по поиску и изучению новых LTP семейства бобовые Fabaceae в семенах чечевицы *Lens culinaris* и *гороха Pisum sativum* нами были обнаружены подсемейства из восьми новых липид-транспортирующих белков Lc-LTP1-8 и трех новых липид-транспортирующих белков Ps-LTP1-3, соответственно. Из сухих семян и трёхдневных проростков, а также из листьев, стеб-

лей, корней и усиков взрослых растений (35 дней после прорастания) была выделена тотальная РНК и проведена обратная транскрипция с использованием олиго-dT25 праймера. Для генов, кодирующих изоформы липид-транспортирующего белка гороха (PsLTP1-3), проводили ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием интеркалирующего красителя EvaGreen (Biotium), а в случае гена, кодирующего изоформу липид-транспортирующего белка чечевицы (Lc-LTP2), – с использованием двух зондов, меченных флуоресцентными красителями FAM и ROX, что позволяло одновременно детектировать продукты нескольких реакций в одной пробирке. Была изучена экспрессия генов, кодирующих изоформы липид-транспортирующих белков чечевицы (Lc-LTP2) и гороха (Ps-LTP1-3) в различных органах взрослых растений и на разных стадиях их онтогенетического развития, и выявлены различия в профилях дифференциальной экспрессии генов, кодирующих изоформы LTP чечевицы и гороха, в связи с чем сделано предположение о возможных биологических функциях данных белков. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КАЗЕИНОВЫХ МИЦЕЛЛ В МОЛОКЕ КОРОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И ПЕРИОДА ЛАКТАЦИИ

Е.Н. Зарудная, Л.А. Ромодин, С.Ю. Зайцев
Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

За последние годы сформировалось устойчивое мнение, что белки являются самой ценной составной частью молока. Одним из основных белков молока является казеин (76–86% от общего белка). В полидисперсной многофазной системе молока казеин находится в виде мицелл, формируя «тонкую коллоидную систему казеиновых частиц». Мицеллы казеина состоят из нескольких сотен субмицелл – агрегатов основных фракций казеина (αS-, β- и κ-), соединенных между собой гидрофобными, электростатическими, водородными связями и кальциевыми мостиками. Степень дисперсности мицелл казеина непостоянна, она генетически обусловлена и зависит от физиологического состояния, породы животных, стадии лактации, содержания и кормления животных. Нами были исследованы пробы молока, полученные от коров черно-пестрой породы в возрасте 3-4 лет, находящихся на разных месяцах лактации по 10 голов в каждой группе. Был проведен биохимический анализ молока на приборе "Клевер-2М". Был определен размер мицелл казеиновых частиц методом динамического светорассеивания. В начальный период лактации (1–2 мес.) обогащенное липидами (41,0±0,5 г/л) молоко бедно белком (31,2±0,6 г/л) и кальцием (32,9±0,5 ммоль/л) и содержит казеиновые частицы со средним диаметром 132±12 нм. На 3-4 месяце в разгар лактации (среднесуточный удой 18,0±0,3 кг) в относительно жирном молоке (40,0±0,6 г/л) содержание общего белка составляет 33,5±0,4 г/л с диаметром мицелл казеина 122±10 нм. В период снижения суточных удоев (5–7 месяц лактации) содержание общих липидов и белка в молоке составляет 37,2±0,4 г/л и 32,5±0,2 г/л, соответственно; с размером казеиновых наночастиц 118±5 нм. В заключительный период лактации (8–10-ый мес.) во время спада молочной продуктивности (период наименьших суточных удоев – 16,9±0,3 кг) жирность молока снижается. Содержание общих липидов составляет 34,2±0,8 г/л, что сопровождается наиболее высоким содержанием общего белка (34,7±0,5 г/л) и кальция (35,4±0,3 ммоль/л) и увеличением диаметра размера наночастиц до 162±12 нм. Т. о., полученные данные показывают, что размер наночастиц казеина, содержание общего белка, липидов и кальция в молоке изменяются реципрокно в течение всего периода лактации и подчеркивают важность сбалансированности по основным белок-липидным фракциям молока.

СТРАТЕГИИ ТВЕРДОФАЗНОГО ПЕПТИДНОГО СИНТЕЗА ДЛЯ НОВЫХ АНАЛОГОВ А-КОНОТОКСИНОВ

И.А. Иванов, Д.А. Сенько, А.О. Чугунов, В.М. Табакмахер, Д.С. Кудрявцев, И.В. Шелухина, Е.В. Крюкова, Е.Н. Спирова, И.Е. Кашеверов *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

α-Конотоксины – пептидные соединения из яда морских моллюсков рода Conus, сегодня стали одним из наиболее востребованных инструментов исследования никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР), играющих важную роль в функционировании нервной и иммунной систем организма. Более того, в последнее время делаются активные попытки использовать их в качестве лекарственных препаратов, в частности, новых анальгетиков направленного действия. Это диктует необходимость разработки надежных и экономичных способов получения α-конотоксинов. Небольшие размеры (до 20 а.о.) позволяет достаточно просто получать их твердофазным пептидным синтезом, однако наличие двух дисульфидных связей привносит определенные трудности, связанные с образованием трех возможных изомеров целевого продукта. Применение метода одновременного замыкания дисульфидов позволяет получать большие количества α-конотоксинов с меньшими затратами, но требует определения нужного изомера. Таким способом была синтезирована серия аналогов α-конотоксином PnIA, поскольку только один изомер для каждого аналога с природным замыканием дисульфидов по схеме 1-3 и 2-4 (globular) обладал функциональной активностью. Наномолярное сродство этих аналогов к α7 подтипу нАХР было показано методами радиолигандного анализа и электрофизиологии. Для получения «проблемных» α-конотоксинов, у которых активными могут оказаться также и другие изомеры с замыканием дисульфидов по схеме 1-4 и 2-3 (ribbon) или 1-2 и 3-4 (beads) предпочтительно использование твердофазного синтеза с ортогональными защитами боковых цепей цистеинов. По этой схеме были получены различные изомеры α-конотоксина RgIA и αO-конотоксина GeXIVA для характеристики методами радиолигандного анализа и электрофизиологии различных сайтов (ортостерического и аллостерического) связывания α9 подтипа нАХР, который, как полагают, участвует в передаче болевого импульса. *Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-08338.*

РОЛЬ ПЕРОКСИРЕДОКСИНОВ В РАЗВИТИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Е.В. Калинина[1], Я.А. Андреев[2], И.Б. Бродский[3], Н.Н. Чернов[1], М.Д. Новичкова[1]
[1]Российский университет дружбы народов; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [3]Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Пероксиредоксины (Prxs) регулируют клеточный сигналинг и пролиферацию клеток, защищают структуру белка, действуя как молекулярные шапероны, и ингибируют редокс-зависимые пути активации апоптоза, что свидетельствует об их важной роли в защите клеток от окислительного стресса. Высокий уровень экспрессии генов Prxs обнаружен в некоторых опухолях. Однако их роль в развитии лекарственной устойчивости раковых клеток остается мало изученной. Нами исследо-

вана роль пероксиредоксинов Prx1, Prx2, Prx3 и Prx6 в формировании устойчивости опухолевых клеток к цисплатину (цис-диаминодихлорплатин, CDDP), цитотоксический эффект которого помимо алкилирующего действия связан с активацией образования активных форм кислорода. Установлено, что развитие лекарственной устойчивости сопровождалось значительным увеличением экспрессии генов PRDX1, PRDX3, PRDX6 в клетках аденокарциномы молочной железы (MCF-7/CDDP) и карциномы яичника (SKOV-3/CDDP) человека. Наиболее выраженный рост отмечен для Prx6 мРНК. Известно, что окисленные формы Prx1 и Prx3 восстанавливаются тиоредоксином 1 (Trx1), тогда как глутатион восстанавливает окисленный Prx6. Нами было обнаружено, что нокдаун siRNA Trx1 увеличивает CDDP-индуцированную гибель резистентных клеток, которая значительно повышается при аддитивном использовании нокдауна siRNA Prx6. Таким образом, можно сделать вывод, что полученные данные свидетельствуют о важном вкладе Prxs в редокс-зависимые механизмы развития резистентности опухолевых клеток к CDDP.

ГОМОЛОГ ИНГИБИТОРА ПЕПТИДАЗ КУНИТЦА, КОДИРУЕМЫЙ ГЕННОЙ МАТРЕШКОЙ, СПОСОБСТВУЕТ МЕЖКЛЕТОЧНОМУ ТРАНСПОРТУ В РАСТЕНИИ

Е.В. Шешукова, Н.М. Ершова, Т.В. Комарова, Ю.Л. Дорохов *НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ-им. М.В. Ломоносова; Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия*

Мы идентифицировали в геноме Nicotiana benthamiana ген, не содержащий интронов и кодирующий гликозилированный белок, который является гомологом ингибитора пептидаз Кунитца (ГИПК). ГИПК и его мРНК практически не детектируются в зрелых листьях, т.к. их уровень очень низок. Однако, стрессовое воздействие, вызванное вирусной или бактериальной инфекцией, приводит к повышению содержания как белка, так и мРНК ГИПК. Мы предположили, что стабильность мРНК ГИПК в клетке может контролироваться освещением. Для проверки этой гипотезы мы поместили растения в темноту на длительное время. Оказалось, что накопление мРНК ГИПК резко возрастает на 4-й день инкубации в темноте. При исследовании механизма функционирования ГИПК в инфицированной клетке мы обнаружили в мРНК ГИПК альтернативную открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую 53 аминокислотный (53ак-ОРС) полипептид. Мутагенез стартового кодона 53ак-ОРС, отменяющий экспрессию 53ак-ОРС, приводил к 100-кратному увеличению уровня материнской мРНК ГИПК в клетке. Наши эксперименты показали также, что экспрессия 53ак-ОРС: (а) не объясняется наличием криптического промотора; (б) приводит к снижению стабильности материнской мРНК ГИПК; (в) требует фотосинтетической активности интактных хлоропластов. Также мы показали, что синтез 53ак-ОРС и ГИПК происходит с одной и той же мРНК, а оба синтезируемых белка являются мембранными и обнаруживаются в клеточной стенке. Мы предположили, что 53ак-ОРС участвует в негативном контроле экспрессии мРНК материнского гена в интактных листьях, что является первым примером подобного функционирования генной матрешки. Мы выявили способность ГИПК повышать эффективность межклеточного транспорта за счет изменения пропускной способности плазмодесм. Более того, оказалось, что ГИПК может частично компенсировать функцию транспортного белка вируса табачной мозаики. Мы пришли к выводу, что ГИПК утратил способность ингибировать активность трипсина, но приобрел способность обеспечивать межклеточный перенос макромолекул и фотоассимилятов. *Работа поддержана грантами РФФИ (16-34-00062_мол_а) и Президента Российской Федерации (МД-5697.2016.4).*

MICROSCALE THERMOPHORESIS MEASUREMENTS OF THE INTERACTION BETWEEN HUMAN DIPEPTIDYL PEPTIDASE 3 AND KELCH DOMAIN OF KEAP1 PROTEIN

Akmaral Kussayeva, Mihaela Matovina
Ruđer Bošković Institute, Division of Organic Chemistry and Biochemistry, Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

Human dipeptidyl peptidase 3 (hDPP3) is a metallopeptidase from the M49 family of peptidases that cleaves dipeptides from the amino-termini of 3-10 long peptides in vitro. Apart from its proposed role in the final stages of proteolysis in the cell, and potential role in the regulation of blood-pressure, pain and infection through cleavage of bioactive peptides, it has been confirmed that hDPP3 is involved in the regulation of Nrf2-Keap1 signalling pathway through its interaction with Keap1 protein. Nrf2-Keap1 pathway is the main regulator of the oxidative stress response. It has been shown that hDPP3 binds Keap1, which consequently releases Nrf2 transcription factor from the complex with Keap1, and enables its translocation to the nucleus and the activation of genes coding for a series of proteins that protect the cell from the damage caused by xenobiotics and oxidative stress. Keap1 is interacting with hDPP3 through its Kelch domain.

The interaction between hDPP3 and Keap1, and hDPP3 and Kelch domain of Keap1 protein has been confirmed with several methods, however the thermodynamic parameters of the interaction have not been measured. We used microscale thermophoresis (MST) to measure the dissociation constant of the hDPP3-Kelch domain complex for the wild type hDPP3, hDPP3 variant E690K, and two hDPP3 mutants found in cancer, R703C and R703H to check if the hDPP3 variant and mutants bind Kelch domain with different affinities than the wt. We performed only preliminary measurements, however, we established that it is possible to use MST to determine the thermodynamic parameters of the hDPP3-Kelch interaction.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИМИКРОБНЫХ БЕЛКОВ ИЗ ЯДА ГАДЮКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*VIPERA BERUS*)

Л.Е. Леонова[1], А.Г. Попугайло[1], Т.В. Гришина[1], Е.В. Романовская[1], В.Н. Кокряков[1,2] *[1]Санкт-Петербургский государственный университет; [2]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

Антимикробные пептиды и белки являются важным звеном в цепи молекулярных процессов системы врожденного иммунитета. Существует множество полипептидов различной молекулярной массы с различными путями воздействия на патогенные микроорганизмы. Яд змей считается самым богатым источником антимикробных агентов, что можно объяснить рядом причин. Змеиный яд – это секрет, обогащенный белком, поэтому он является идеальной средой для роста бактерий. Что еще хуже, ядовитые железы часто вступают в контакт с многочисленными бактериями, некоторые из которых являются патогенными. Возможно, это можно объяснить, по крайней мере отчасти, обилием антимикробных белков в змеином яде. В настоящем исследовании мы описали антибактериальные свойства цельного яда гадюки обыкновенной и нескольких индивидуальных различных белковых фракций, обладающих антимикробной активностью против *E. coli* и *L. monocytogenes*,

грам-отрицательных и грам-положительных тестовых бактерий, соответственно. Для получения высокоочищенных белковых фракций из яда гадюки, мы использовали метод препаративного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Мы выделили несколько фракций, обладающих антимикробной активностью, с молекулярной массой около 14-15 кДа. Большинство выделенных фракций обладали высокой активностью фосфолипазы А2,. Высокая антимикробная активность большинства белков наблюдается в присутствии ионов кальция и фосфолипидов, но ее можно было наблюдать в гелях и без каких-либо кофакторов, необходимых для образования лизофосфолипида, или только в присутствии ионов кальция. Более того, в нашем эксперименте присутствовала одна фракция с молекулярной массой около 15 кДа, не обладающая какой-либо активностью фосфолипазы А2, сходная по всем основным физико-химическим свойствам с другими белками, которые действуют на фосфолипидные субстраты, и обладающая антимикробной активностью только по отношению к *E. coli*, минимальная ингибирующая концентрация этой фракции существенно не зависела от каких-либо кофакторов.

АУТОКРИННЫЕ ФАКТОРЫ ВЫЖИВАНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Г.В. Луценко, М.В. Гречихина, М.А. Ефремов
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Москва, Россия

В многоклеточном организме выживание клеток находится под контролем множества цитокинов, факторов роста и аутокринных факторов выживания. Наименее изученными до настоящего времени остаются аутокринные факторы выживания. В данной работе проведено исследование аутокринных факторов, контролирующих выживание клеток цитотоксической интерлейкин-2-зависимой линии CTLL-2: разделение, изучение биологической активности и анализ физико-химических характеристик активных пептидов. Кондиционированная среда клеток CTLL-2, содержащая аутокринные факторы, была разделена посредством гель-фильтрации с использованием Bio-Gel P4 на четыре фракции – A, B, C и D (в порядке выхода из колонки). Проверка биологической активности полученных фракций проведена с использованием МТТ-теста на модели выживания клеток в разреженной 5-дневной культуре. В результате тестирования фракций по способности к поддержанию выживания клеток в культуре оказалось, что активностью обладают фракции A и B, в то время как фракции C и D активностью не обладают. Проведение MALDI-TOF-масс-спектрометрического анализа активных фракций A и B выявило в них наличие одного и того же пептида с молекулярной массой 1157 Да. С использованием энзиматического метода тестирования молочной кислоты во фракциях A и B обнаружено значительное количество лактата, который выходил из колонки вместе с пептидом. Концентрация лактата, определяемого во фракции A, составила 3,72±0,11 мМ, а во фракции B – 0,83±0,06 мМ. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что фракции A и B содержат супрамолекулярные комплексы пептида (М 1157 Да) с различным количеством лактата в них, связанного с пептидом нековалентными связями. В свободном виде пептид с М 1157 Да в составе кондиционированной среды клеток CTLL-2 не был обнаружен. Таким образом, установлено, что пептидный фактор с молекулярной массой 1157 Да содержится в кондиционированной среде цитотоксических клеток CTLL-2 в виде комплексов с молекулами лактата и в такой форме оказывает регуляторное действие на выживание этих клеток. *Исследование проведено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-04-00583).*

БОФ В ДИАГНОСТИКЕ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЙ ЧЕЛОВЕКА, СОБАК И КОШЕК

Е.В. Мальцев, Е.Н. Зарудная
Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

С-реактивный белок (СРБ) и гаптоглобин относятся к белкам острой фазы (БОФ), синтезируемых в печени и присутствующих в крови, концентрация которых у разных видов организмов неспецифически повышается в период индукции воспаления в ответ на патологические процессы разного характера. С-реактивный белок (СРБ) – бета-глобулин, состоящий из 5 одинаковых субъединиц нековалентно связанных между собой, строение которого у животных имеет ряд особенностей по сравнению с человеком, так у собак две из пяти субъединиц СРБ гликозилированы. СРБ является одним из самых чувствительных маркеров, его концентрация может повышаться в 10–100 раз уже через 6–12 часов после начавшегося воспаления. В норме уровень СРБ не превышает у людей – 0,5-1,0 мг/л, у собак – 1 мкг/л, увеличиваясь в крови последних при бабезиозе до 1–100 мл/л. СРБ кошек не является маркером воспаления, т.к. ингибируя хемотаксис и снижая функции нейтрофилов, активирует каскадный механизм комплимента, усиливая синтез антивоспалительных цитокинов. Гаптоглобин – α2-гликопротеин, у человека существует 3 наследственных фенотипа гаптоглобина: 1-1, 2-1 и 3-1, у собак обнаружен только один, напоминающий фенотип гаптоглобин 1-1 человека. Сходство заключается в последовательности аминокислотных остатков, молекулярной массе (81 кД), а также наличии 4 полипептидных цепей: 2 α- и 2 β, расположенных в той же последовательности: β-α-α-β. Отличия заключаются в различной фиксации α- и β-полипептидных цепей: в гаптоглобине человека – это дисульфидные мостики, в гаптоглобине собак и кошек – нековалентные связи; дополнительно у собак α-цепи имеют олигосахаридную связывающую последовательность и гликозилированы. У клинически здоровых особей уровень гаптоглобина составляет: у людей – 1,0-3,0 мг/дл, собак – 0,3–3,6 мг/дл, кошек – 0,7–2,0 мг/дл, а в период острой фазы повышается до 4,7–7,8 мг/дл, 4,0–9,0 мг/дл и 3,0–10,0 мг/дл, соответственно. Гаптоглобин является маркером системной красной волчанки у людей, повышаясь на 4–6-й день; полиартрите собак и панлейкопении кошек, повышаясь в крови животных в течение 24 ч. после начала воспаления. Т.о., БОФ являются ценными маркерами для диагностики ряда патологий, однако, в ветеринарии нужно учитывать функциональные и структурные особенности БОФ, применяя для измерения коммерческие тест-системы.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ТРЕХПЕТЕЛЬНЫЕ ТОКСИНЫ ГАДЮК ИНГИБИРУЮТ НИКОТИНОВЫЕ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ

Я.В. Макарова, Е.В. Крюкова, И.В. Шелухина, Д.С. Лебедев, Т.В. Андреева, Д.Ю. Рязанцев, В.И. Цетлин, Ю.Н. Уткин
Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Россия

токсинов гадюк были установлены на основании нуклеотидных последовательностей кДНК, клонированных их ядовитых желез *Azemiops feae* и *Vipera nikolskii*. Белки, соответствующие токсинам *Azemiops feae* (AF-TFT) и *Vipera nikolskii* (VN-TFT), получены гетерологической экспрессией в клетках *E. coli* с последующей ренатурацией в условиях, разработанных ранее для трехпетельных токсинов кобры. Активность полученных токсинов гадюк изучали с использованием различных типов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР). В частности, использовали клеточную линии SH-SY5Y, представ-

ляющую собой нейробластому человека и экспрессирующую несколько типов нАХР. Метод кальциевого имиджинга позволил обнаружить ингибирование гомо- (α7) и гетеромерных (α3-содержащих) рецепторов клеточной линии SH-SY5Y рекомбинантными токсинами AF-TFT и VN-TFT. Ингибирование ответов гетеромерных нАХР на никотин имело дозо-зависимый характер, величины IC_{50} составили 4,4 μM и 4,9 μM для TFT-AF и TFT-VN, соответственно. Для исследования влияния токсинов на отдельные рецепторы, гетерологически экспрессированные в ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, применяли метод электрофизиологии. При этом была обнаружена способность токсинов TFT-AF и TFT-VN блокировать в микромолярных концентрациях ацетилхолин-индуцированные токи в мышечном α1β1δε и нейрональном α3β2 нАХР. В опытах по конкурентному связыванию оба токсина ингибировали взаимодействие радиоактивного альфа-бунготоксина с нАХР мышечного типа электрического органа Torpedo, величины IC_{50} составили около 2 μM и 40 μM для TFT-VN и TFT-AF, соответственно. Оба токсина лишь незначительно ингибировали нАХР типа альфа7, гетерологически экспрессированный в клетках GH4C1. Полученные результаты позволили впервые определить биологическую активность трехпетельных токсинов гадюк. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-04-01843.*

ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ *B* В УСЛОВИЯХ КРАУДИНГА ПРИ 10°С

В.В. Михайлова, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева, Б.И. Курганов
Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Исследование процессов агрегации белков представляет большой интерес как для биохимиков и молекулярных биологов, изучающих заболевания, сопровождающиеся накоплением белковых агрегатов, так и для биотехнологов, занимающихся получением, использованием и длительным хранением белковых препаратов. Для изучения механизмов процессов агрегации белков нами была использована оригинальная тест-система, основанная на агрегации УФ-облученной гликогенфосфорилазы *b* (УФ-ФБ). Эта система интересна тем, что стадия разворачивания нативного белка в ней отсутствует и возможно изучение как непосредственно самого процесса агрегации, так и влияния на этот процесс различных агентов. Агрегацию УФ-ФБ изучали с использованием метода динамического светорассеяния при пониженной температуре (10 град С, 0,03 М Hepes, 0,1 М NaCl, pH 6,8), что позволило характеризовать начальные стадии процесса агрегации. Агрегацию УФ-ФБ индуцировали добавлением краудинг-агентов (полиэтиленгликоля и фиколла-70). На основании полученных кинетических данных сделан вывод о том, что механизм агрегации включает в себя стадию нуклеации, за которой следует стадия роста белковых агрегатов. Показано, что начальная скорость стадии роста белковых агрегатов пропорциональна квадрату концентрации белка. Это означает, что порядок агрегации по белку равен 2. Эти особенности кинетики агрегации УФ-ФБ объяснены в рамках механизма, согласно которому убыль денатурированного белка в растворе протекает в результате присоединения денатурированного белка к образовавшимся ядрам. Изучение процесса агрегации УФ-ФБ при 10 град С в условиях краудинга показало, что данный процесс является обратимым. Разбавление растворов УФ-ФБ или добавление химических шаперонов (аргинина и пролина) на начальных стадиях агрегации приводит к распаду образовавшихся белковых агрегатов. Однако по мере увеличения размера белковых агрегатов их прочность возрастает, и распад агрегатов становится невозможным. На основании полученных данных предложен основной путь агрегации УФ-ФБ, включающий в себя последовательное формирование обратимых, полностью диссоциирующих, частично диссоциирующих, а также необратимых агрегатов. Этот путь агрегации белков является, по-видимому, общим для агрегации различных белков. *Работа поддержана грантом РФФИ (16-04-00560-а).*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ ТАБАКА NT-4/1 И NTPBL И ИХ СВЯЗЫВАНИЕ С ДВУСПИРАЛЬНЫМИ РНК

А.В. Панкратенко, А.К. Атабекова, Е.А. Лазарева, Е.А. Толстыко, А.Г. Соловьев, С.Ю. Морозов
Биологический факультет и Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Белок табака Nt-4/1, специфичный для растений, способен взаимодействовать с транспортными белками фитовирусов и влиять на дальний транспорт вироида веретеновидности клубней картофеля (ВВКК) по флоэме. Показано, что Nt-4/1 взаимодействует в ВВКК in vitro. Вместе с тем, функции белка Nt-4/1 остаются неизвестными. Нами было обнаружено, что в дрожжевой двугибридной системе Nt-4/1 взаимодействует с табачным ортологом белка человека BAP31, названным NtPBL (*Nicotiana tabacum-encoded plant* BAP-like protein). Анализ взаимодействия белков *in vitro*, который проводился методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием рекомбинантных полипептидов, экспрессированных в бактериальных клетках, показал, что белки Nt-4/1 и NtPBL взаимодействуют с высокой аффинностью. Исследование субклеточной локализации Nt-4/1-GFP и NtPBL-mRFP при их временной ко-экспрессии в клетках растений показало, что данные белки колокализуются в тельцах, ассоциированных с кортикальным эндоплазматическим ретикулумом (ЭПР), что указывает на взаимодействие Nt-4/1 и NtPBL *in vivo*. При этом взаимодействие NtPBL с ЭПР определяется тремя трансмембанными сегментами белка, тогда как для взаимодействия Nt-4/1 с ЭПР требуется, как было показано делеционным мутагенезом, N-концевой район белка, включающий амфипатическую спираль. Был проведен анализ РНК-связывающих свойств С-концевого гидрофильного района белка NtPBL (NtPBL-C), экспрессированного в бактериальных клетках. В экспериментах по сдвигу в геле было показано, что NtPBL-C взаимодействует с несколькими протестированными РНК, проявляя наибольшую аффинность к предшественникам микро-РНК (pre-miRNA) и менее эффективное взаимодействие с ВВКК, что показывает сродство данного полипептида к молекулам РНК, имеющим выраженную вторичную структуру. С помощью сайт-направленного мутагенеза были картированы РНК-связывающие районы NtPBL-C. Временная экспрессия NtPBL-C в растениях с помощью вирусного вектора приводила к подавлению роста растений и дефектам развития листьев, что характерно для блокирования биогенеза и/или функций микро-РНК. Таким образом, полученные данные указывают на роль NtPBL и Nt-4/1 реализации функций высокоструктурированных РНК, связанные, возможно, с их транспортом по флоэме. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда 17-14-01032.*

АКТИВАЦИЯ БЕЛКОВОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ РЕЗОНАНСНЫМ ПЕРЕНОСОМ ЭНЕРГИИ

Г.М. Прошкина, Е.И. Шрамова, С.М. Деев
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В структуре смертности населения России злокачественные новообразования занимают второе место (~16%) после болезней системы кровообращения (~50%). Учитывая статистические данные, создание новых противораковых препаратов является актуальной задачей. Одним из многообещающих методов селективного воздействия на опухолевые новообразования является фотодинамическая терапия. Однако, в силу того, что для фотодинамической терапии необходим внешний источник света, этот метод имеет ряд ограничений, обусловленных потерей оптической активности возбуждающего света в биологических тканях за счет рефракции, отражения, поглощения и рассеяния световых волн. Альтернативой внешним источникам света для возбуждения фотосенсибилизатора могут стать внутриклеточные источники света. В современной молекулярной и клеточной биологии для изучения внутриклеточных процессов *in vivo* и *in vitro* широко используется явление биолюминесцентного резонансного переноса энергии, BRET (Bioluminescence resonance energy transfer), в основе которого лежит Фёрстеровский резонансный перенос энергии между двумя хромофорами – донором и акцептором. В разрабатываемой нами системе донором энергии является окисленная форма субстрата люциферазы NanoLuc (Promega), а акцептором – генетически кодируемый фотосенсибилизатор на основе фототоксичного флавопротеида miniSOG, способный продуцировать активные формы кислорода при облучении синим светом. Мы показали, что люцифераза NanoLuc, введенная в составе единой генетической конструкции с miniSOG в эукариотические клетки, в присутствии субстрата вызывает возбуждение фототоксичного флавопротеида miniSOG. При этом фотоиндуцированная цитотоксичность системы зависит от внутриклеточной локализации NanoLuc-miniSOG и составляет 48% при цитоплазматической локализации гибридного белка, 65% при митохондриальной локализации и 69% при мембранной локализации. Установлено, что фототоксичность miniSOG, индуцированная окисленной формой люциферазы NanoLuc, сопоставима с фототоксичностью miniSOG при облучении клеток внешним источником света. *Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 16–14–10321).*

АНАЛИЗ ГЛИКИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Е.В. Романовская[1], М.В. Вихнина[1,2], А.В. Соболева[1,2], Т. Мехмуд[2], Г.Н. Смоликова[3], С.С. Медведев[3], А.А. Фролов[1,2]
[1]Кафедра биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; [2]Отдел биоорганической химии, Лейбниц-Институт биохимии растений, Галле, Германия, [3]Кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Гликирование белков является неферментативной модификацией, в основе которой лежит взаимодействие между восстанавливающими сахарами или дикарбонильными продуктами их окислительной деградации с аминогруппами лизиновых и гуанидиновыми группами аргининовых остатков. Конечные продукты глубокого гликирования (КПГГ) – это группа модифицированных аминокислотных остатков, накапливающихся во время термической обработки, а также длительного хранения продуктов питания. В организме человека экзогенные КПГГ могут играть существенную роль в развитии субклинического воспаления. Так, употребление в пищу богатых белком продуктов растительного происхождения после длительного хранения может нанести вред здоровью человека. Таким образом, существует необходимость в методе количественного определения КПГГ в растительном материале. Нами была разработан методологический подход, включающий в себя пробоподготовку с использованием энзиматического гидролиза тотального белка, выделенного из семян гороха *Pisum sativum*, с последующим анализом КПГГ с помощью метода UHPLC-ESI-MS.

Семена гороха были подвергнуты ускоренному старению за счёт обработки при температуре 45°C и относительной влажности 86% в течение 3 дней и 5 дней. Тотальный белок выделяли из семян (n=3) с использованием метода фенольной экстракции. Продукты гликирования быстро деградируют при высоких температурах и низких значениях pH, именно поэтому был выбран ферментативный гидролиз. Так как тотальный белок не может быть полностью растворён в буфере из-за высокого содержания гидрофобных белков, для этой цели в буферный раствор добавляли додецилсульфата натрия (SDS), после чего полностью растворённый белок подвергался гидролизу. Далее детергент удаляли с помощью твердофазной экстракции, после чего гидролизованный белок дериватизировали в присутствии N^2-(5-фтор-2,4-динитрофенил)-*L*-валин амида (*L*-FDVA). Анализ был проведён с помощью RP-UHPLC-ESI-LIT-Orbitrap-MS. Полученные данные были обработаны с использованием программного обеспечения «Xcalibur» (Thermo Fisher Scientific), аддукты аминокислот были идентифицированы с помощью точной массы и ESI-MS^n анализа. Среди выявленных КПГГ преобладают следующие соединения: N^{ε}-карбоксиметиллизин, N^{ε}-карбоксиэтиллизин, N^{δ}-карбоксиметиларгинин, N^{δ}-карбоксиэтиларгинин, аргпиримидин и гидроимидазолоновое производное метилглиоксаля, которые могут быть также охарактеризованы по их паттернам фрагментации, полученным с помощью тандемной масс-спектрометрии. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-16-01042).*

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА МЕТАЛЛОЭНДОПЕПТИДАЗЫ *BACILLUS PUMILUS* 3-19

Н.Л. Рудакова, А.О. Тихонова, А.Р. Сабирова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова
Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Природный штамм *B.pumilus* 3-19 секретирует в окружающую среду минорную металлопротеиназу. Фермент был выделен в гомогенном состоянии и на основании первичной структуры был классифицирован как металлопротеиназа клана метцинкинов, сочетающая в себе признаки двух семейств: астацинов и адамализинов. Обнаруженный нами фермент является первым выделенным прокариотическим адамализиноподобным белком. Целью работы являлось выяснение механизмов регуляции экспрессии гена новой внеклеточной металлоэндопептидазы *Bacillus pumilus* 3-19. Для определения спектра возможных систем регуляции, контролирующих экспрессию mprBp была проанализировали промоторная область гена на наличие специфических сайтов связывания с регуляторными белками. Было показано, что промотор mprBp содержит сайты связывания с фосфорилированной формой регуляторного белка биодеградации DegU (4 сайта), сайты связывания с регулятор-

ным белком спорообразования Spo0A (4 сайта), сайты связывания с регуляторным белком азотного обмена TnrA (6 сайтов) и сайты связывания с регуляторным белком углеродного обмена CcpA (2 сайта). Наличие в регуляторной области гена сайтов связывания с этими белками указывает на возможное участие MprBp в трофических и спорообразовательных процессах клетки. Изучение экспрессии mprBp в штамме, дефектном по генам регуляторных белков DegS и DegU показало снижение продуктивности синтеза металлопротеиназы в среднем на 60% по сравнению со штаммом с полноценной системой DegS-DegU. Так же была изучена экспрессию mprBp в штаммах с мутацией в гене degU, приводящей к стабилизации DegU~P белка. Известно, что эта мутация приводит к многократному повышению уровня экспрессии генов, позитивно регулируемых системой DegS-DegU. Полученные результаты показали 10-кратное увеличение продукции металлопротеиназы в рекомбинантном штамме. Таким образом, Deg-система участвует в контроле синтеза протеиназы, но не является единственной в регуляции экспрессии гена mprBp. *Работа выполнена на средства гранта РФФИ (16-34-01150 мол_а), а также при финансовой поддержке Государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.*

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЕНДРИМЕРОВ С БЕЛКАМИ

Т.С. Серченя, И.В. Широчина, Д.Г. Щербин, О.В. Свиридов
Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Впервые иммунохимическими методами исследовано взаимодействие дендримеров с белковыми антигенами и специфическими антителами. При проведении исследований использовали белки с различными пространственными структурами – альфа-1-микроглобулин (A1M) с β-складчатой структурой из 8 антипараллельных тяжей, формирующих гидрофобную полость, альбумин человека, субдоменный α-спиральный белок, и чистые иммуноглобулины – поли- и моноклональные антитела против указанных антигенов, являющиеся сложными гликопротеиновыми молекулами с четко выраженной доменной структурой. В работе применяли модифицированные фосфорные дендримеры, дедронизированные золотые наночастицы и их дендроны и полиамидоаминные дендримеры 4-5-ого поколений, различающиеся поверхностными функциональными группами. Комплексы белков и дендримеров готовили в мольном соотношении 1:1, 1:10 и 1:100. Иммунохимические свойства белков оценивали после комплексообразования по взаимодействию с соответствующими антигенами и антителами в твердофазном иммуноферментном анализе, который проводили в 96-луночных микропланшетах. Согласно экспериментальным данным влияние дендримеров на иммунохимические свойства A1M и альбумина человека не является одинаковым, что может объясняться различием в строении их лигандсвязывающих сайтов, которые характеризуются преобладанием гидрофобных взаимодействий в случае A1M и электростатических сил с вкладом гидрофобных взаимодействий в случае альбумина. Установлены изменения иммунореактивности белковых антигенов при взаимодействии с дендримерами и наночастицами, которые, возможно, связаны с конформационными перестройками альбумина и A1M при комплексообразовании или с блокировкой эпитопов для специфических антител. Показано, что модифицированные фосфорные дендримеры и дедронизированные золотые наночастицы изменяют антигенсвязывающие свойства исследуемых иммуноглобулинов, влияние полиамидоаминных дендримеров на способность антител связывать антиген зависит от поверхностного заряда тестируемого дендримера. Таким образом, иммуноанализ полезен как первичный скрининг комплексообразования для последующего изучения биофизическими методами. Полученные данные важны для понимания закономерностей взаимодействия дендримеров с белками при их использовании в терапевтических целях и для технологий иммуноанализа.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

А.Ю. Скрипников, А.В. Глыбин, Е.В. Буравлева, В.Л. Воейков
МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоорганической химии, Москва, Россия

В растительных организмах пептиды участвуют в регуляции основных процессов жизнедеятельности, таких как рост, морфогенез, деление клеток и защитные реакции. С целью изучения биологической и физико-химической активности растительных пептидов в настоящей работе использовали CLE-пептиды CLV3p [RTVPSGPDPLHH] из *Arabidopsis thaliana*, PpCLE1 [RMVPSGPNPLHN], PpCLE2 [RMVPTGPNPLHN] из мха *Physcomitrella patens*, а также пептид GFL [GFLVARPN] – фрагмент Rubisco, обнаруженный в составе пептидных пулов гаметофоров *P. patens*. При добавлении CLV3p в среду культивирования в концентрациях 10^{-6}–10^{-8} M рост главного корня проростков арабидопсис значительно подавляется, при этом стимуляцируется образование боковых корней. При концентрации 10^{-12} M CLV3p вызывает стимуляцию роста главного корня, при этом количество боковых корней уменьшается. Пептиды мха PpCLE1 и PpCLE2 влияют на рост корней *A. thaliana* сходным образом. Пептид GFL стимулирует рост главного корня *A. thaliana* в диапазонах концентраций 10^{-8}–$10^{-1}0$ и 10^{-14}–10^{-16} M. Недавно было установлено, что соотношение между клеточной пролиферацией и дифференцировкой в корнях *A. thaliana* модулируется балансом активных форм кислорода (АФК) между зоной деления и зоной роста. Мы предположили, что исследованные пептиды оказывают свое действие на проростки арабидопсиса, влияя на процессы с участием АФК. Добавление пептидов к водным растворам $NaHCO_3$ и к нативной крови человека, в которых постоянно образуются АФК, в тех же концентрациях, в которых они влияют на рост корней, изменяет параметры свободно-радикальных реакций, оцениваемые по интенсивности хемилюминесценции. Эффекты пептидов в водных системах в широком диапазоне концентраций изменяются также немонотонно, как и при их действии на рост корней. Немонотонность концентрационной зависимости действия пептидов, их эффекты в чрезвычайно низких концентрациях, кинетические особенности их действия с трудом поддаются объяснению в рамках общепринятых лиганд-рецепторных представлений о биорегуляции.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ eIF1AD НА СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА

Е.В. Смирнова, Т.В. Ракитина, А.В. Гарковенко, В.М. Липкин
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В настоящее время в лаборатории белков гормональной регуляции ИБХ РАН проводятся исследования по изучению функций ядерного белка eIF1AD, который, как было показано с помощью двугибридной системы, взаимодействует с транс-

крипционным фактором STAT1. Белки STAT (преобразователи сигнала и активаторы транскрипции) составляют семейство транскрипционных факторов, открытых благодаря их ключевой роли в сигнальных путях интерферонов. Семейство белков STAT включает в себя 6 членов, активных в виде гомо и гетеродимеров, а также в составе олигомерных транскрипционных комплексов, образование которых зависит от активации определенных сигнальных путей, вызываемых цитокинами, включая интерфероны I и II типов. Мы показали, что подавление экспрессии eIF1AD в моноцитарной клеточной линии THP-1 блокировало ее дифференцировку в макрофаги, индуцируемую интерфероном-гамма. С использованием клеточных линий с подавленной и сверхэкспрессией eIF1AD нами была изучена транскрипционная активность факторов STAT при индукции интерферонами I и II типов, а также EGF. Белок eIF1AD избирательно регулировал трансактивацию интерферон-гамма зависимых генов, не влияя на транскрипцию генов, активируемых интерферонами I типа.

МУЛЬТИБЕЛКОВЫЙ СТАБИЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ЛАКТОФЕРРИНА МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА

С.Е. Соболева, Ю.О. Добролюбова, Г.А. Невинский
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Лактоферрин человека (ЛФ) является важным белком неспецифической первичной защиты организма, обладающим широким набором уникальных биологических функций. Поскольку ЛФ – относительно небольшой белок (80 кДа), его полифункциональность может быть результатом существования белка в комплексе с другими клеточными компонентами. Показано, что ЛФ в молоке человека образует высокомолекулярный белковый комплекс (~1000 кДа), который остается стабильным в присутствии соли в высокой концентрации. Известно, что мультиферментные комплексы являются совершенной организацией биохимических процессов в клетке. Поэтому, идентификация и характеристика белковых комплексов может стать важным шагом в исследовании функциональных свойств молока человека. Целью данной работы являлось определение белкового состава комплекса лактоферрина из молока человека и сравнительный анализ биологических функций комплекса и составляющих его белков. Показано, что эффективная диссоциация данного комплекса происходила только в жестких условиях (8 М мочевина и 1 М NaCl либо 100 мМ ДТТ и 1 М NaCl), соответствующих разрушению ионных взаимодействий и дисульфидных связей. Продукты диссоциации комплекса были разделены ионообменной и обращено фазовой хроматографиями с последующим анализом МАЛДИ масс-спектрометрией. Показано, что кроме лактоферрина и других высокомолекулярных белков комплекс содержит большое число трудно разделяемых коротких белков и пептидов с молекулярными массами от 2 до 10 кДа. Впервые показано, что стабильный белковый комплекс обладает протеолитической и фосфатазной активностями, а также цитотоксическим эффектом по отношению к раковым клеткам человека линии MCF-7. Проведен сравнительный анализ ферментативных активностей и цитотоксичности комплекса с активностями лактоферрина и других белков, входящих в его состав. Показано, что данный комплекс обладает более высокими протеолитической и фосфатазной активностями, а также эффективнее подавляет рост раковых клеток, чем составляющие его белковые компоненты. Таким образом, белковый комплекс молока обладает биологическими функциями, которые значительно превышают таковые для отдельных белков. Изучение структуры и свойств подобных комплексов позволит исследовать новые биологические функции, которые реализуются на супрамолекулярном уровне. *Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-00609.*

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ТОКСИНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГАМК

Л.В. Сон[1,2], Д.С. Кудрявцев[1], И.В. Шелухина[1], И.А. Иванов[1], М.Н. Жмак[1], Ю.Н. Уткин[1], И.Е. Кашеверов[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

В ходе предыдущих исследований нам удалось установить факт взаимодействия некоторых белковых и пептидных токсинов из ядов змей и моллюсков с ионотропными рецепторами гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК-А). Наиболее активным из протестированных оказался альфа-кобратоксин (α-CTX) из яда кобры Naja kaouthia, показавший активность в субмикромолярном диапазоне концентраций (IC_{50} ~ 300 нМ). Флуоресцентное производное α-CTX (Alexa Fluor 546 α-CTX) в концентрации 50 нМ специфично окрашивало клетки Neuro2a и HEK293T, экспрессирующие рецепторы ГАМК-А. Целью данной работы было дальнейшее исследование связывания α-CTX с ГАМК-А, а также возможностей применения его флуоресцентного производного в качестве инструмента поиска других пептидных токсинов, способных вытеснять меченный лиганд со связывающих участков рецептора. В ходе выполнения данной работы были найдены новые трехпетельные токсины из яда Naja melanoleuca, взаимодействующие с ГАМК-А. Метод двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах Xenopus laevis показал существенное уменьшение амплитуды ГАМК-опосредованных токов (более чем на 80%) в присутствии этих токсинов в концентрации менее 10 мкМ. Также было установлено, что данные токсины способны блокировать связывание Alexa Fluor 546 α-CTX с клетками Neuro2a, экспрессирующими различные подтипы ГАМК-А. Кроме белковых соединений из яда змей были обнаружены ГАМКергические свойства также у нескольких альфа-конотоксинов – коротких токсических пептидов из яда морских хищных моллюсков рода Conus, и исследованы молекулярные детерминанты их взаимодействия с ГАМК-А. Таким образом, нами был расширен арсенал белковых и пептидных молекул, взаимодействующих с ГАМК-А. Мы предполагаем, что некоторые из них могут послужить базой для разработки средств молекулярной диагностики и адресной доставки в медицине, а также для фундаментальных исследований. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-08338*.

ОТСТАВЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОГО НЕОНАТАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АНАЛОГА АВП(6-9) – AC-D-MPRG НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

А.А. Стаханова[1], О.Г. Воскресенская[1], В.П.Голубович[2], А.А.Каменский[1]
[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия ;[2]Институт биоорганической химии НАН Беларуси Минск, Беларусь

Исследование влияния острого интраназального введения структурного аналога АВП(6-9) – Ac-D-MPRG показало, что он обладает анксиолитическим, ноотропным и антидепрессантным действием, зависящим от дозы и времени введения. Целью данной работы было исследование отставленных поведенческих эффектов хронического неонатального введения Ac-D-MPRG (с 3-го по 7-ой дни жизни в дозах 1,0 и 10,0 мкг/кг) у животных разных возрастных групп. У животных первой воз-

растной группы (35–39 дни жизни, препубертатный период) хроническое неонатальное введение Ac-D-MPRG приводило к изменению ОИР только при использовании дозы 1 мкг/кг в стрессогенной модификации теста ОП – преобладала реакция затаивания. Не наблюдалось изменений уровня тревожности животных. Введение тетрапептида в обеих дозах не влияло на выработку реакции с положительным подкреплением, но ускоряло выработку УРАИ. Введение Ac-D-MPRG в дозе 1 и 10 мкг/кг вызывало снижение степени депрессивности у животных данной возрастной группы. У животных второй возрастной группы (49–53 дни жизни, пубертатный период) хроническое неонатальное введение Ac-D-MPRG не вызывало изменений ОИР и уровня тревожности, незначительно влияло на выработку реакции с положительным подкреплением. Введение Ac-D-MPRG вызывало ускорение выработки УРАИ, наиболее выраженное при использовании дозы 1 мкг/кг. Введение Ac-D-MPRG вызывало снижение уровня депрессивности, наиболее выраженное при использовании дозы 1 мкг/кг. У животных третьей возрастной группы (63-67 дни жизни, взрослые половозрелые животные) хроническое неонатальное введение Ac-D-MPRG приводило к изменению ОИР только при использовании дозы 1 мкг/кг в стрессогенной модификации теста ОП – преобладала реакция избегания. Введение Ac-D-MPRG в обеих дозах не приводило к изменению уровня тревожности, не улучшало выработку реакции с положительным подкреплением, но ускоряло выработку УРАИ и снижало степень депрессивности у животных данной возрастной группы. *Работа выполнена в рамках соглашения о научно-техническом сотрудничестве между ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» и кафедрой физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова и поддержана грантом РФФИ (проект №15-04-051040).*

IL-2 И МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЙ IL-21 ПРИВОДИТ К ИНДУКЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ, ИЗМЕНЕНИЮ ФЕНОТИПА И ФУНКЦИЙ NK-КЛЕТОК

М.А. Стрельцова, С.А. Ерохина, А.В. Муравьева, Е.И. Коваленко
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Растворимые и контактные стимулы приводят к получению фенотипически отличных друг от друга NK-клеток. Один из вариантов комбинированной стимуляции NK-клеток включает фидерные клетки K562, экспрессирующие мембранно-связанный IL-21 (mbIL-21), который может улучшать пролиферацию NK-клеток человека при культивировании с IL-2. В данной работе платформа стимуляции IL-2 и K562-mbIL21 была использована для разработки эффективного метода получения клонов NK-клеток. Получение клонов осуществляли путем сортировки единичных NK-клеток с в лунки 96-луночного планшета, содержащие 100 ед./мл IL-2 и 2000 кл./лунку K562-mbIL21. Начиная с 3-й недели культивирования, еженедельно проводили частичную замену среды с добавлением 2000 кл./лунку K562-mbIL21. Частота образования клонов на данной платформе значительно варьировала в экспериментах с NK-клетками, полученными от разных доноров (от 15 до 38%). Длительность жизни клонов составила около 6 недель. Данный тип стимуляции приводил к преобладающему росту клонов с характеристиками менее дифференцированных NK-клеток. Наблюдался высокий уровень экспрессии рецептора NKG2A, уменьшение уровня CD57 в клонах, полученных из высокоэкспрессирующих этот антиген клеток. Еженедельное добавление фидерных клеток K562mbIL-21 при культивировании способствовало увеличению экспрессии маркера активации HLA-DR. Было показано, что IL-21 в мембраносвязанной форме увеличивает в выращенных клетках продукцию IFNγ. Была показана сильная положительная корреляция уровня HLA-DR с уровнем продукции IFNγ. Наряду с увеличением экспрессии HLA-DR, в клонах росла экспрессия рецептора антитело-зависимой цитотоксичности CD16. Таким образом, можно заключить, что а) стимуляция NK-клеток клетками K562, экспрессирующими мембраносвязанных IL-21, стимулирует экспрессию HLA-DR и CD16, б) рост экспрессии HLA-DR ассоциирован с увеличением продукции IFNγ, в) стимуляция NK-клеток с помощью mbIL-21 приводит к получению активированных клонов NK-клеток, которые могут быть применены в адоптивной иммунотерапии человека. *Работа выполнена при поддержке РНФ (грант №16-15-00309).*

МЕМБРАНОСВЯЗАННАЯ КОЛЛАГЕНАЗА ММП-14 И ЕЁ ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ В ТЕЛЕ МАТКИ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ

О.С. Тимошенко, Т.А. Гуреева, Е.В. Кугаевская, Н.И. Соловьева
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Степень прогрессии и злокачественности опухолей определяют процессы инвазии и метастазирования, которые напрямую связаны с деградацией соединительно-тканного матрикса (СТМ). Мембраносвязанная коллагеназа ММП-14 наряду с другими ММП принимает участие в разрушении компонентов СТМ. Активация про-ММП-14 осуществляется внутриклеточно в аппарате Гольджи с помощью сериновой протеиназы – фурина. Активность ММП-14 наиболее эффективно ингибируется эндогенным тканевым ингибитором ТИМП-2, который кроме того в комплексе с ММП-14 участвует в активации про-ММП-2 – желатиназы, гидролизующей фибриллярные коллагены и коллаген базальных мембран. Цель исследования: выяснение особенностей экспрессии ММП-14, ММП-2, их ингибитора ТИМП-2 и активатора ММП-14 – фурина, как факторов прогрессии опухоли, при плоскоклеточной карциноме шейки матки на протяжении всего тела матки. Работа проводилась с использованием энзиматического, иммуногистохимического методов и зимографии. Работа проведена на образцах ткани от пациентов: протяженность образца – от стенки влагалища до дна полости матки («ленты» состояли из 4-8 фрагментов). Выводы: 1). При плоскоклеточной карциноме шейки матки происходит существенное увеличение экспрессии матриксной металлопротеиназы ММП-14 и ММП-2 в опухоли. 2). Экспрессия активатора ММП-14 фурина в большинстве образцов опухоли превышала уровень экспрессии в нормальной ткани матки. 3.) Экспрессия ингибитора ТИМП-2 находилась в основном на низком уровне или отсутствовала по данным ИГХ. 4). В морфологически нормальной ткани тела матки обнаружена существенная экспрессия ММП-14 и ММП-2. Следовательно, экспрессия как ММП, так и их эндогенных регуляторов направлена на увеличение деструктивного (инвазивного) потенциала опухоли. Данные имеют прогностическое значение и важны для понимания механизма развития заболевания. *Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2001 –2020.*

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ МЕДЬ-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА CORC ИЗ БАКТЕРИИ *THIOALKALIVIBRIO PARADOXUS* ARH1

Т.В. Тихонова[1], Н.И. Дергоусова[1], Е.М. Осипов[1], Е.Ю. Саплинов[1], А.В. Лильина[1], С.И. Цаллагов[1], Т.В. Ракитина[2], В.О. Попов[1,2]
[1]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [2]НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

CorC – периплазматический медь-связывающий белок, который играет важную роль в гомеостазе меди у бактерий. Известны два типа белков CorC. CorC типа A хорошо охарактеризован, для него известна пространственная структура. Он имеет 2 разных сайта связывания для ионов Cu(I) и Cu(II). CorC типа B был впервые выделен и описан для бактерии *Pseudomonas fluorescens*. В его первичной структуре отсутствует мотив, отвечающий за связывание Cu(I). Структура и функция этого белка неизвестны.

Объектом настоящего исследования является медь-связывающий белок CorC из галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1, которая способна расти на тиоцианате как источнике энергии и азота в присутствии высоких (до 700 мкг/л) концентраций ионов Cu(II). CorC из *Tv. paradoxus* относится к типу B. Гомология с известными CorC типа A и B не превышает 28%. Получен рекомбинантный препарат CorC в клетках *E. coli*. Рекомбинантный белок содержал на N-конце дополнительный фрагмент из трех аминокислот MDA. Методом тушения триптофановой флуоресценции показано, что CorC связывает Cu(II) в соотношении 1:1. Из периплазматической фракции клеток *Tv. paradoxus*, выращенных на тиоцианате, был выделен белковый комплекс, состоящий из CorC и флавоцитохром с сульфиддегидрогеназы. Получена пространственная структура комплекса с разрешением 2.7 A. Функция этого комплекса в клетке не установлена. В структуре CorC из *Tv. paradoxus* ион Cu(II) координирован атомами азота аминогруппы и имидазольного кольца N-концевого остатка His1 и атомами OD Asp110 и ND His112, причем атом азота аминогруппы His1 образует водородную связь с атомом OE Glu28. В структурах CorC из других организмов подобное строение медь-связывающего центра не обнаружено. Таким образом, His1 играет ключевую роль в координации иона меди у CorC из *Tv. paradoxus.* Для получения рекомбинантного CorC с N-концевым His была выбрана SUMO Expression System фирмы «LifeSensors», позволяющая получать белок с заданной N-концевой аминокислотой. Соответствующий ген был клонирован в плазмидный вектор pE-SUMOpro и получена его экспрессия. Функциональные свойства полученного белка исследуются. *Работа финансируется из средств грантов РФФИ 16-04-01818 и РНФ 14-24-00172.*

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ФОСФОРИЛИРУЕМЫХ УЧАСТКОВ БЕЛКА STAR В ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С БЕЛКАМИ СЕМЕЙСТВА 14-3-3

К.В. Тугаева[1,2], Д.В. Сотников[1], Н.Н. Случанко[1,3]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха АН, ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН; [2]Кафедра биохимии, Биологический факультет и [3]Кафедра биофизики, биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Регуляторный белок острой фазы стероидогенеза (StAR) принимает участие в синтезе стероидных гормонов, осуществляя перенос холестерина к внутренней мембране митохондрии. На данный момент нет четкого представления о механизме транспортировки холестерина. По последним данным, белок StAR функционирует в составе сложного белкового комплекса – трансдуцеосомы, в состав которой входит целый ряд белков, включая универсальные регуляторные белки семейства 14-3-3. Белок StAR человека имеет два участка (S57 и S195) фосфорилирования протеинкиназой A, окружение которых напоминает консенсусные последовательности, узнаваемые 14-3-3. По данным литературы, остаток S195 играет ключевую роль в образовании комплекса, однако из кристаллической структуры видно, что петля, в которой находится S195, слишком мала для оптимального связывания с белками 14-3-3, для которых обычно важен протяженный гибкий участок в окрестности фосфорилируемого остатка. Целью данной работы было проверить роль остатков Ser195 и Ser57 во взаимодействии 14-3-3/StAR. Для этого были сконструированы и очищены по разработанной ранее нами методике варианты белков StAR, содержащие один (StAR.66: S195) или два (StAR.46: S57, S195) потенциальных участка связывания. В качестве положительного контроля был получен белок StAR.46-L59P, содержащий каноническую последовательность связывания с 14-3-3. Фосфорилирование белков осуществляли при их коэкспрессии с ПКА, а затем проверяли способность к связыванию с очищенными рекомбинантными белками 14-3-3 методом гель-фильтрации. В выбранных нами условиях только в случае StAR.46-L59P/14-3-3 появлялся пик с кажущейся молекулярной массой 80 кДа, соответствующей стехиометрии связывания 1:2, в то время как взаимодействия с природным неканоническим вариантом StAR.46 обнаружено не было. По данным поверхностного плазмонного резонанса, кажущаяся константа диссоциации комплекса StAR.46-L59P/14-3-3 составила около 50 мкМ, что говорит о достаточно слабом прямом взаимодействии 14-3-3 и белка StAR, более точная количественная оценка которого будет проведена в дальнейшем. Вероятно, взаимодействие 14-3-3 с белком StAR, постулированное в литературе, является транзиентным, и образование более прочного комплекса зависит от наличия некоторого другого фактора, природу которого еще предстоит выяснить.

СНИЖЕНИЕ АДГЕЗИИ Т-КЛЕТОК К ФИБРОНЕКТИНУ НА ФОНЕ БЛОКАДЫ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ

Д.В. Хасанова, Р.В. Мулюкова, Л.Ф. Зайнуллина, Ю.В. Вахитова
Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа, Россия

Адгезионные способности Т-клеток опосредуются молекулами клеточной адгезии на самих иммунных клетках – интегринами (LFA-1, VLA-4). Лигандами интегринов на клетках эндотелия сосудов являются суперсемейство иммуноглобулинов (ICAM-1, 2, 3; VCAM-1) и группа селектинов (P-, E-селектины) (Bevilacqua et al., 1993). В случае экстравазальной циркуляции, например в анастомозах между лимфатическим и кровеносным руслами в лимфоузлах и других органах, адгезия Т-клеток осуществляется к молекулам экстраклеточного матрикса (ЭКМ) (фибронектину, ламинину и др.) (Pimton et al., 2011). В последние годы стали появляться работы, свидетельствующие о том, что именно глутамат – основной возбуждающий нейромедиатор ЦНС является фактором, вовлекающим Т-клетки в аутоиммунные процессы, протекающие в зоне повреждения нервной ткани (Schwartz et al., 2003), опосредуя механизмы адгезии и миграции Т-клеток через гематоэнцефалический барьер (Ganor et al., 2003). Целью данной работы было исследование роли рецепторов глутамата NMDA подтипа в регуляции адгезии клеток Jurkat к молекуле ЭКМ – фибронектину. Оценку адгезионных свойств Т-клеток проводили статическим методом, позволяющим охарактеризовать один из первых этапов адгезии и миграции через сосудистую стенку – стадию плот-

ной адгезии клеток. Согласно полученным данным, как конкурентный (AP5), так и неконкурентный антагонисты ((+)MK801) NMDA-рецепторов приводят к существенному, дозо-зависимому снижению адгезии клеток к фибронектину. При этом в наших экспериментальных условиях на фоне глутамата, содержащегося в среде культивирования (137 мкМ), неконкурентный антагонист (+)MK801 оказывает более выраженное негативное влияние – снижение адгезии Jurkat на 50% при 168 мкМ. В то же время, конкурентный антагонист AP5 приводит к 50% ингибированию адгезионных способностей клеток при 252 мкМ. Таким образом, нами охарактеризована вовлеченность NMDA-рецепторов в регуляцию адгезии Т-клеток к фибронектину. Хотелось бы отметить, что обнаруженное снижение адгезии клеток в присутствии антагонистов может объясняться ингибирующим влиянием антагонистов на взаимодействие VLA-4 – фибронектин, но не цитотоксическим эффектом (IC_{50}(+)MK801>200 мкМ; IC_{50}AP5>300 мкМ в собственных экспериментах). *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-04-01441 А.*

АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В УСЛОВИЯХ КРАУДИНГА

Н.А. Чеботарева, С.Г. Роман, Т.Б. Еронина, Н.Н. Случанко, Б.И. Курганов
Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии, РАН, Москва, Россия

Малые белки теплового шока (sHsps) принадлежат к классу молекулярных шаперонов, которые играют важную роль в поддержании гомеостаза белка в клетке. Они препятствуют агрегации развернутых форм белков за счет связывания с ними и поддержания в форме пригодной для фолдинга. sHsps обладают пластичной четвертичной структурой, что, как считается, необходимо для механизма их функционирования. Предполагается, что большие олигомерные ансамбли sHsps обратимо диссоциируют, затем взаимодействуют с развернутыми белками и реассоциируют в крупные комплексы sHsp–белок-клиент. Однако большинство данных по антиагрегационной активности sHsps получены в условиях *in vitro* в разбавленных растворах, которые значительно отличаются от условий краудинга внутри клетки. Между тем есть некоторые указания на то, что краудинг может влиять как на конформацию и динамику олигомеров sHsps, так и на их антиагрегационную активность. Нами было показано, что олигомерное состояние нескольких sHsps (альфа-кристаллина, HspB1, HspB5, HspB6) меняется в присутствии краудинг-агентов. Это позволяет предположить, что олигомерное состояние sHsps в условиях краудинга в клетке может отличаться от олигомерного состояния в разбавленных растворах. Краудинг стимулирует ассоциацию комплексов sHsps–белок-клиент с образованием агрегатов большого размера и тем самым снижает кажущуюся антиагрегационную активность sHsps. Тем не менее, нами также было показано, что комплексы между диссоциированными формами sHsps и белками-клиентами могут быть стабильны и существовать в течение длительного времени в условиях краудинга. Таким образом, по-видимому, диссоциация sHsps на суболигомерные формы является важной составляющей антиагрегационной активности sHsps. Кроме того, в условиях краудинга различные факторы, включая двухвалентные катионы, могут модулировать шапероноподобную активность sHsps. Мы показали, что ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} оказывают небольшое влияние на антиагрегационную активность HspB5 в разбавленном растворе. Однако относительно низкие концентрации Ca^{2+} (или смесь Ca^{2+} и Mg^{2+} могут восстанавливать активность HspB5, которая сильно снижается в условиях краудинга. *Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-00560-а.*

ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНАЯ АДРЕСНАЯ ЛЕНТИВИРУСНАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ФОТОТОКСИНА В HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Е.А. Суслова, О.Н. Шилова, Е.О. Кузичкина, С.М. Деев
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В настоящее время перспективным подходом является использование тераностических агентов, сочетающих в себе как детектирующий, так и эффекторный модули. Настоящая работа посвящена разработке высокоселективной системы доставки визуализирующего белка TagRFP и фототоксина miniSOG в HER2-положительные опухолевые клетки с использованием лентивирусной системы. В работе была использована система векторов псевдотипированного лентивируса с применением псевдо-ориентированных гликопротеинов вируса кори: гемагглютинина (H) и фьюжн белка (F). В качестве направляющего модуля был использован белок неиммуноглобулиновой природы DARPin_9–29, имеющий высокое сродство к онкомаркеру HER2. DARPin вводился в оболочку лентивируса в составе белка слияния с мутантной формой белка H, что позволило перенацелить систему доставки вируса на HER2-положительные опухолевые клетки. В качестве эффекторного модуля мы использовали генетически кодируемый фототоксин miniSOG, способный при облучении синим светом вырабатывать активные формы кислорода, вызывающие гибель раковых клеток. Для визуализации опухоли мы создали бицистронный лентивирусный вектор, кодирующий в одной рамке считывания miniSOG и красный флуоресцентный белок TagRFP, разделение которых осуществляется на уровне полипептида за счет введенной между ними последовательности саморасщепляющегося T2A-пептида тешовируса свиней. Полученные конструкции были использованы для трансфекции пакующей линии HEK293T. Методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии была показана экспрессия красного флуоресцентного белка в пакующей клеточной линии через 24 часа после трансфекции и нарастание флуоресцентного сигнала в течение 72 часов. Доля успешно трансфецированных клеток составила 80%, интенсивность красной флуоресценции повысилась в 110 раз по сравнению с контролем. Таким образом, получена система векторов для наработки псевдотипированных лентивирусных частиц для доставки фототоксина и визуализирующего модуля в опухоль. В дальнейшем планируется работа по оптимизации выделения вирионов и трансдукции клеточных линий с различным уровнем экспрессии рецептора HER2. *Работа осуществлена при поддержке гранта РФФИ 17-04-00308 и гранта Президента МК-6957.2016.4.*

КОНКУРС МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

ИЗМЕНЕНИЕ МЕХАНИЗМА АГРЕГАЦИИ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ПРИСУТСТВИИ ХИМИЧЕСКИХ ШАПЕРОНОВ

В.А. Борзова[1], Д.А. Кара[1], К.А. Маркосян[1], С.Ю. Клейменов[2], Б.И. Курганов[1]
[1]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; [2]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Для изучения механизма влияния химических шаперонов (аргинина и его производных, путресцина и спермидина) на агрегацию белков были использованы тест-системы с различным кинетическим режимом агрегации, а именно тест-системы на основе дитиотреитол (ДТТ)-индуцированной и тепловой агрегации бычьего сывороточного альбумина (БСА). В случае ДТТ-индуцированной агрегации БСА (45°C, 0,1 M Na-фосфатный буфер, pH 7,0, [ДТТ] = 2 мМ) порядок агрегации по белку (n) равен 1, и скорость-лимитирующей стадией является стадия денатурации молекул белка-мишени. В случае тепловой агрегации БСА (70°C, 0,1 M Na-фосфатный буфер, pH 7,0) n=2, и скорость-лимитирующей стадией является стадия агрегации денатурированных молекул белка. Использование тест-систем с различным кинетическим режимом агрегации позволяет изучать влияние химических шаперонов на разные стадии общего процесса агрегации. Для установления механизма влияния химических шаперонов на ДТТ-индуцированную и тепловую агрегацию БСА было проведено сопоставление кинетических данных, полученных методом динамического светорассеяния, и прямых данных по накоплению агрегированного белка, полученных методом фракционирования в поле асимметричного потока. Построение графиков зависимости гидродинамического радиуса агрегатов (Rh) от доли агрегированного белка (Gagg) позволило охарактеризовать изменение механизма ДТТ-индуцированной и тепловой агрегации БСА при внесении химических шаперонов в тест-системы. Термостабильность БСА в присутствии химических шаперонов контролировали методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Показано, что химические шапероны (аргинин и его производные, путресцин и спермидин) оказывают двоякое действие на агрегацию БСА. Они стабилизируют нативную форму БСА, но в то же время ускоряют слипание образовавшихся агрегатов. Исследование выполнено при поддержке *Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-00997-мол_а).*

РЕГУЛЯЦИЯ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЦЕКРОПИНОВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ АМФИФИЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

С.С. Ефимова, Р.Я. Медведев, Л.В. Щагина, В.В. Малев, О.С. Остроумова
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Антибиотики применяются около ста лет, но многие бактерии уже выработали к ним устойчивость, и резистентны к лекарственной терапии штаммы встречаются все чаще. В настоящее время в качестве основы для создания новых действенных антибактериальных препаратов рассматриваются антимикробные пептиды. Цекропины одни из первых идентифицированных антимикробных пептидов, характеризующихся широким спектром антибактериальной активности. Молекулярные механизмы взаимодействия цекропинов с клеточными мембранами до сих пор дискуссионные. Для изучения мембранотропного действия цекропинов использовали низкомолекулярные амфифилы, способные при сорбции на мембране и встраивании в нее изменять физико-химические параметры бислоя. Введение флоретина, RH421, RH237, бупивакаина, бензокаина или тетракаина приводит к уменьшению средненормированной проводимости цекропиновых каналов (gSC). Введение в мембраноомывающие растворы мирицетина, лидокаина или прокаина не изменяет gSC. Сравнение абсолютных величин изменения дипольного потенциала отрицательно заряженных мембран и относительных изменений gSC после введения указанных модификаторов показывает, что проводимость одиночных цекропиновых каналов не является функцией дипольного потенциала. Учитывая снижение температуры главного фазового перехода ДПФХ при адсорбции амфифилов, можно сделать заключение, что наблюдаемые изменения gSC обусловлены изменением эластических свойств мембраны при адсорбции модификаторов. Изучение действия амфифилов на мультиканальную активность цекропиновых каналов показало, что уменьшение равновесного числа цекропиновых каналов (Nop) наблюдается при введении в мембраноомывающие растворы флоретина, бупивакаина, бензокаина или тетракаина, в то время как добавка RH421 или RH237 вызывает рост Nop. Установлено, что мирицетин, лидокаин и прокаин Nop практически не изменяют. Сопоставление результатов влияния модификаторов на мультиканальную активность цекропина и их действия на физико-химические свойства бислоев позволяет заключить, что изменение равновесного числа цекропиновых каналов при адсорбции модификаторов определяется суперпозицией влияния двух факторов: модификация дипольного потенциала мембран и изменения плотности упаковки мембранных липидов. *Работа выполнена при поддержке РНФ (№14-14-00565-П) и СП-69-2015.4.*

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОКСОРУБИЦИНА СОПРОВОЖДАЕТСЯ НАКОПЛЕНИЕМ АПОПТОЗ-ИНДУЦИРУЮЩЕГО ФАКТОРА В ЯДРАХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ H9C2

А.С. Ефремова, С.И. Шрам *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

Известно, что ряд патологий сопровождается гибелью эукариотических клеток по каспаза-независимому пути, в котором ключевую роль играет транслокация апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) из митохондрий в ядро. В данной работе мы исследовали влияние противоопухолевого агента доксорубицина (Dox), известного своей кардиотоксичностью, на внутриклеточное распределение AIF в культивируемых кардиомиоцитах H9c2. Показано, что 6- и 24-часовая обработка кардиомиоцитов Dox (1 мкМ) приводит к значительному снижению плотности клеток в культуре и к увеличению доли апоптотических клеток, по сравнению с аналогичными показателями для интактных культур. При этом как в интактных, так и в обработанных Dox культурах, ядра апоптотических клеток были более компактные, чем в живых клетках, что связано с конденсацией хроматина при фрагментации ДНК апоптотическими нуклеазами. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что в интактных культурах кардиомиоцитов AIF локализован преимущественно в цитоплазме, а после 6- и 24-часовой инкубации клеток с Dox (1 мкМ) наблюдается значительное его накоплению в области ядер. Причем это характерно как для клеток сохранивших нормальную морфологию ядра, так и для апоптотических клеток с конденсированным хроматином. В ядрах клеток, сохранивших нормальную морфологию ядра после воздействия Dox, содержание AIF после 6- и 24-часового воздействия возрастало в среднем на 30% и 44%, по сравнению с контролем (ядра с нормальной морфологией в интактных культурах клеток). В

то же время, в ядрах клеток с конденсированным хроматином содержание AIF на тех же временных сроках увеличивалось в среднем на 75% и 152% по сравнению с контролем (апоптотические ядра в интактных культурах клеток). Показано, что фармакологическое ингибирование поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) частично предотвращало вызываемую Dox апоптотическую гибель кардиомиоцитов и транслокацию AIF в ядро. Таким образом, нами было установлено, что цитотоксическое действие Dox на культивируемые кардиомиоциты сопровождается PARP-зависимой транслокации AIF из цитоплазмы в ядро, что приводит к запуску каспаза-независимого пути гибели кардиомиоцитов. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01870).*

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДИПЕПТИДОВ С ДВУНИТЕВОЙ ДНК

Н.В. Колчина[1,2], А.С. Афанасьева[2], Т.С. Салль[3], Н.С. Динькова[1,3], М.Г. Петухов[2], В.Х. Хавинсон[3,4]
[1]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; [2]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург; [4]Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

При взаимодействии двунитевой ДНК (днДНК) с полипептидами распознавание нуклеотидных последовательностей ДНК происходит только в большой бороздке днДНК. Основания ДНК развернуты в сторону большой бороздки, и там оказываются доступны функциональные группы ДНК, по которым могут быть однозначно опознаны нуклеиновые кислоты. Связывание лигандов в малой бороздке днДНК возможно, но в этом случае можно говорить лишь о неспецифическом связывании [Branden C., Tooze J. Introduction to Protein Structure // 2nd ed. – Garland Publishing, 1999. – 410 p.]. С помощью метода молекулярного докинга пептидов в ДНК и пакета программ ICM-Pro (Molsoft LLC, США) проанализирована возможность и вероятность связывания 13 биологически активных дипептидов с днДНК в B-форме. Проанализировано связывание 13 пептидов с днДНК всех возможных последовательностей из 4-х пар нуклеотидов (141 вариант последовательностей). Для дипептидов DR (Asp-Arg) и AE (Ala-Glu) с высоким качеством (ICM SCORE) были получены низкоэнергетические комплексы на участках ДНК с последовательностями «CCAG» и «ACCC» соответственно. Получены примеры неспецифического связывания пептидов DR и AE с днДНК в малой бороздке: DR – с последовательностью «CATG», AE – с «TCGG». Сопоставлены полученные результаты с двумя известными кристаллографическими структурами (2B3E и 4U8C) из базы данных PDB. В PDB нам удалось найти примеры связывания небольших лигандов с днДНК только в малой бороздке, что может свидетельствовать о предпочтительном неспецифическом взаимодействии ДНК с небольшими лигандами. Однако в PDB есть только несколько комплексов днДНК с низкомолекулярными лигандами. Возможно, что бронхопротекторный пептид AE и тропный к ткани простаты пептид DR окажутся способными к специфическому связыванию с днДНК.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ВНУТРЕННЕ-НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ УЧАСТКОВ БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ СПИРАЛЬНЫХ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ

В.В. Макаров, С.С. Макарова, Н.О. Калинина *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

В последнее десятилетие в связи с достижениями криоэлектронной микроскопии получена структура спиральных вирусов растений (гордеивирусов и потексвирусов) в высоком разрешении, что не удавалось ранее с использованием традиционных методов структурного анализа. Однако, несмотря на исчерпывающие данные о коровой части белков оболочки (БО), структура и функции внутренне-неупорядоченных участков БО спиральных вирусов растений до сих пор охарактеризованы недостаточно. Данная работа посвящена структурно-функциональной характеристике поверхностно экспонированных внутренне-неупорядоченных участков БО гордеи- и тобамовирусов. Исследования структуры БО гордеивируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) показали, что, он, несмотря на сходство между его аминокислотной последовательностью и последовательностью БО тобамовирусов, обладает существенной структурной лабильностью и занимает промежуточное положение между палочковидными и гибкими спиральными вирусами растений. Продемонстрировано существование двух структурно различных форм вириона и наличие нового типа межсубъединичного контакта, образуемого неупорядоченной петлей БО, удаление которой приводит к невозможности ВШМЯ формировать вирионы в процессе инфекции в растениях. Удаление неупорядоченных N- и C-концевых фрагментов БО ВШМЯ в составе генома химерного тобамовируса приводит соответственно или к гиперчувствительному ответу или к заметному усилению симптомов инфекции. Вероятно, эти эффекты обусловлены вовлечением поверхностно экспонированных участков БО в сложную систему взаимодействий между защитными системами растения-хозяина и вирусом. Нами также изучена роль неупорядоченного C-конца БО тобамовируса табачной мозаики (ВТМ) при вирусной инфекции. Показано, что удаление более 6-ти аминокислотных остатков с C-конца молекулы БО приводит к абортивной инфекции. При этом инфицированные растения, несмотря на отсутствие в клетках вирусной РНК, демонстрировали мягкие симптомы в течение 2 недель с момента заражения. Мы предполагаем, что C-концевой фрагмент БО ВТМ может быть вовлечен в процессы репликации и/или межклеточного транспорта вирусного генома. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-24-00007.*

РЕКОМБИНАНТНЫЙ БТШ70 ВЛИЯЕТ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАСОМ И РАЗРУШАЕТСЯ 20S ПРОТЕАСОМАМИ ПО УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМОМУ ПУТИ

А.В. Морозов[1], Т.М. Астахова[2], Д.Г. Гарбуз[1], О.Г. Зацепина[1], Вадим Л. Карпов[1], М.Б. Евгеньев[1]
[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; [2]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Клеточный протеом очень динамичен и, в тоже время, чувствителен к различным стрессам. Для поддержания его гомеостаза клетки содержат целую сеть молекулярных шаперонов взаимодействующих с клеточными системами деградации белков: аутофагией и убиквитин-протеасоной системой (УПС). Белок теплового шока 70 (БТШ70) – один из наиболее важных стресс-индуцибельных шаперонов. Совместно с кошаперонами БТШ70 «определяет» будет ли поврежденный белок-клиент подвергнут рефолдингу или убиквитинирован и направлен на УПС-зависимую деградацию. Известно, также, что во время стресса БТШ70 взаимодействует и сохраняет в нужной конформации 19S регулятор 26S протеасом. С другой стороны, БТШ70 является субстратом убиквитин-зависимого протеолиза и эффективно разрушается в 26S протеасомах по окончанию стрессового воздействия на клетку. Таким образом, ряд аспектов взаимодействия БТШ70 и УПС были изучены, однако пря-

мое влияние БТШ70 на функциональное состояние различных форм протеасом остается неисследованным. Нами было показано, что активность различных форм протеасом меняется разнонаправлено после инкубации с рекомбинантным БТШ70. Так, химотрипсинподобная активность 20S протеасом значительно снижается (более чем на 52%), в то время как активность 26S протеасом возрастает на 125%. Нами также выявлено, что БТШ70 является субстратом 20S протеасом и может деградировать в них без предварительной модификации убиквитином. Это частично объясняет обнаруженное снижение активности 20S протеасом после инкубации с БТШ70. Полученные результаты раскрывают новые стороны взаимодействия БТШ70 и разных форм протеасом, а также указывают на потенциальное наличие дополнительного пути деградации БТШ70 в клетке. *Работа выполнена при поддержке гранта Министерства Образования и Науки договор #14.Z50.31.0014 и гранта Президента РФ для молодых ученых МК-3613.2017.4.*

БИСПЕЦИФИЧНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

С.Е. Седых, В.В. Принц, В.Н. Бунева, Г.А. Невинский *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Биспецифичными называют иммуноглобулины, содержащие два разных антигенсвязывающих центра и способные связывать два разных антигена. Особый интерес к молекулам биспецифичных иммуноглобулинов обусловлен их терапевтическим применением, в 2015 году журнал Nat. Rev. Drug. Disc. назвал биспецифичные иммуноглобулины – «антителами нового поколения» (Next generation antibodies). Исследования, опубликованные в последние годы, посвящены различным способам получения моноклональных биспецифичных иммуноглобулинов, доклиническим и клиническим испытаниям этих препаратах, а также возможным перспективам их использования. В молоке, плаценте и крови здоровых доноров мы обнаружили природные биспецифичные иммуноглобулины. Определено содержание биспецифичных молекул в данных биологических объектах, а также соотношение биспецифичных молекул к моноспецифичным. Литературные данные указывают на то, что одновременная экспрессия двух генов легких цепей в одном клоне В-лимфоцита возможна при хронической лимфоцитарной лейкемии, такие молекулы обнаружены в клетках миеломы S107, в клетках гибридом, в случае индуцированной плазмацитомы мыши. Ранее высказаны предположения, что эти случаи могут быть связаны с вторичной перестройкой генов иммуноглобулинов и с тем, что некоторые периферические популяции В-лимфоцитов избегают аллельного исключения. Обнаруженные нами природные биспецифичные молекулы, по-видимому, образуются в организме человека in vivo в результате обмена иммуноглобулинов HL-фрагментами (половинами молекул). Полученные данные указывают на то, что данный процесс в крови, молоке и плаценте человека происходит между IgG всех подклассов, а также на возможную роль обмена HL-фрагментами при беременности и лактации. *Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-60066 мол_а_дк, 16-34-00163 мол_а, а также грантом Президента РФ МК МК-410.2017.4.*

ТИОРЕДОКСИН И ГЛУТАРЕДОКСИН: РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

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

Опухолевый рост сопровождается дизрегуляцией пролиферации и апоптоза, что играет важную роль в патогенезе злокачественных новообразований молочной железы. Цель: оценить роль тио- и глутаредоксина в молекулярных механизмах регуляции пролиферации клеток линии MCF-7 при модуляции редокс-статуса блокатором SH-групп белков и пептидов N-этилмалеимидом (NEM, 5 мМ) и протектором тиоловых групп – 1,4-дитиоэритритолом (DTE, 5 мМ). Для исследований использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7. Содержание тио- и глутаредоксина определяли методом вестерн-блоттинга. Оценку распределения по фазам клеточного цикла и количество аннексин-положительных клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии. При действии NEM в клетках линии MCF-7 возрастало содержание тиоредоксина на 8% ($p<0,05$) и глутаредоксина на 16% ($p<0,01$) по сравнению с интактной культурой (1,86 (1,83-1,87) и 1,66 (1,61-1,68) у.е., соответственно), что отражало высокую потребность клеток в редокс-белках в условиях защиты макромолекул от окислительного стресса и для выживания опухолевых клеток при изменении редокс-статуса. Увеличение содержания тио- и глутаредоксина при действии NEM сопровождалось остановкой клеточного цикла в S фазе и повышением количества аннексин-положительных клеток линии MCF-7. При добавлении DTE – увеличивалось содержание тиоредоксина на 4% ($p<0,05$) и глутаредоксина на 23% ($p<0,01$) по сравнению с интактной культурой линии MCF-7. DTE способствовал остановке клеточного цикла в G0/G1 фазах, что может быть связано с высокой способностью глутаредоксина и глутатиона вступать в реакции глутатионилирования/деглутатионилирования белков, в том числе факторов транскрипции, сопровождающиеся изменениями их структуры и функциональных свойств, что влияет на синтез белков регуляторов пролиферации – циклинов и циклинзависимых киназ. Таким образом, снижение пролиферации клеток линии MCF-7 при действии редокс-модуляторов может быть связано с изменениями активности редокс-чувствительных белковых комплексов, регулирующих клеточный цикл, что позволяет рассматривать тио- и глутаредоксин как молекулярные мишени регуляции пролиферации опухолевых клеток. *Исследование выполнено в рамках гранта Президента Российской Федерации № МК-1742.2017.7.*

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ КАК ИСТОЧНИК АНТИГЕННЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ АУТОРЕАКТИВНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Е.С. Шилов *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Аутореактивные Т-лимфоциты, узнающие эпитопы собственных белков организма, удаляются в процессе развития в тимусе в ходе отрицательной селекции. Для отрицательной селекции Т-клеток необходимо, чтобы протеом организма был представлен им наиболее полным образом, по этой причине эпителиальные клетки тимуса экспрессируют более 20 тысяч различных кодирующих белки генов. Однако некоторые эпитопы собственных белков организма могут не участвовать в процессе селекции Т-клеток по причине альтернативного сплайсинга мРНК. Гипотеза о том, что различия сплайсинга пре-мРНК между тимусом и органом нормальной экспрессии гена-мишени приводит к уходу эпитопа от отрицательной селекции и развитию аутоиммунного заболевания, у человека впервые была доказана в 2001 г. для диабета I типа. Настоящая работа посвящена проверке этой гипотезы на мышиной модели. В работе были использованы 45 мышиных ортологов генов с альтернативным сплайсингом из работы Ng et al., а также 297 генов мыши с различиями паттерна сплайсинга между эпителием

тимуса и другими эпителиальными клетками из работы Keane et al. Для всех 342 генов была выполнена верификация их экспрессии в ткани тимуса по материалам работы Sansom et al, а также на основе аннотированных профилей библиотек EST базы данных UniGene. Для соответствующих белков при помощи баз данных Uniprot и NCBI Protein было проанализировано число изоформ, возникающих в результате альтернативного сплайсинга. При помощи базы данных Immune Epitope Database для белков были получены профили их Т-клеточных антигенов. По результатам анализа был составлен список из 10 кандидатных генов, для которых был возможен альтернативный сплайсинг в тимусе и связанные с этим потенциальные Т-клеточные эпитопы. Были получены кДНК из тимуса, селезёнки, головного мозга, печени, почек, легких и скелетных мышц мышей C57BL/6, которые использовали для сплайс-форм-специфической RT-ПЦР. 2 гена с низкой экспрессией: Add2 и Dst были технически исключены из анализа, 5 генов: Dclk1, G6pc2, Magi2, Mbp и Ubtf показали сбалансированный паттерн сплайсинга в тимусе, для 3 генов: Golga7, Lmna и Nasp были подтверждены редкие для тимуса сплайсформы мРНК.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-04-01188.

Литература

1. Ng et al, J Allergy Clin Immunol,2004.
2. Keane et al, Bioinformatics,2015.
3. Sansom et al, Genome Res, 2014.

ИССЛЕДОВАНИЕ МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ, КОНТРОЛИРУЕМО ВОЗДЕЙСТВУЮЩИХ НА КЛЕТКИ ЭУКАРИОТ, ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ АГЕНТОВ ТЕРАНОСТИКИ

В.О. Шипунова[1,2,3], М.П. Никитин[1,3,4], П.И. Никитин[4], С.М. Деев[1,2] *[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; [3]Московский физико-технический институт;[4]Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия*

В настоящее время значительные усилия исследователей в области нанобиотехнологии нацелены на разработку агентов для тераностики. Привлекательной платформой для создания тераностических агентов являются наночастицы различной природы. Помимо собственных уникальных свойств, диагностические и терапевтические модальности наночастицы приобретают за счёт модификации поверхности различными биомолекулами, например лектинами (поскольку профиль гликозилирования раковых клеток может отличаться от такового у нормальных, лектины являются перспективными молекулами для адресной доставки соединений). Нами были синтезированы и модифицированы рядом лектинов золотые и магнитные наночастицы; специфичность и селективность их связывания с различными гликопротеинами предварительно исследовали в бесклеточной системе в формате иммунохроматографии. Для количественного исследования связывания данных структур с раковыми клетками мы разработали новый высокочувствительный метод MPQ-цитометрии. Мы показали, что полученные лектин-модифицированные наночастицы специфично и, более того, обратимо связываются с клетками эукариот (структуры элюировали с поверхности клеток специфичным лектину моносахаридом). Более того, было установлено, что конъюгаты наночастиц с агглютинином зародыша пшеницы могут быть использованы для разделения клеточных линий (а именно, Jurkat и 7.16.4). Полученные данные использовали для разработки тераностических структур нового поколения, а именно – биороботов на основе наночастиц. Было показано, что данные структуры могут выполнять полный набор булевых функций и специфично связываться с поверхностью клеток-мишеней на основе логического анализа молекулярного микроокружения клеток, таким образом, выступая в качестве перспективных агентов тераностики, одновременно анализирующих несколько параметров биохимической информации и принимающих заранее заданное решение. *Исследование выполнено при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» в рамках научного проекта № 17-34-80105 «мол_эв_а» (работа с клеточными культурами) и финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта №14-24-00106 (модификация и синтез наночастиц).*

РОЛЬ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОИММУННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ СТРЕССЕ

И.А. Янкелевич[1,2], Г.М. Алешина[2], В.Н. Кокряков[2], Т.А. Филатенкова[2] *[1]Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург; [2]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

На протяжении многих лет антимикробные белки и пептиды нейтрофильных гранулоцитов рассматривались как противомикробные молекулярные факторы прямого действия системы врожденного иммунитета. Позже было показано, что эти молекулы вовлечены в более широкий спектр физиологических и патофизиологических реакций, в том числе накоплены многочисленные данные о влиянии антимикробных белков и пептидов на протекание иммунных реакций организма. Помимо иммунных реакций, целью которых является поддержание антигенного гомеостаза организма, к защитным реакциям относят и так называемые системные адаптивные реакции организма, запускаемые в ответ на стрессорные воздействия различной природы. Причем, по-видимому, эти реакции тесно связаны между собой и имеют как общие механизмы реализации, так и общие регуляторные молекулярные факторы, которыми могут являться антимикробные белки и пептиды. Целью нашей работы являлось изучение роли антимикробных белков и пептидов нейтрофильных гранулоцитов в регуляции нейроэндокриноиммунных взаимодействий при экспериментальном стрессе. Было показано, что дефенсины крыс и лактоферрин человека снижают уровень гормона стресса – кортикостерона в плазме крови экспериментальных животных. Участие эндогенных дефенсинов в регуляции уровня кортикостерона при стрессе было подтверждено нами опытом с превентивным введением экспериментальным животным антител к тотальной фракции дефенсинов. При введении антител уровень кортикостерона через 3 ч после стресса не снижался до базового уровня, характерного для естественного течения стресс-реакции, а оставался на повышенном уровне. Кроме того, дефенсины и лактоферрин нормализовали стресс-индуцированное перераспределение лейкоцитов крови и уровни экспрессии генов противовоспалительного цитокина IL-4 и паттерн-распознающего рецептора TLR4 в клетках селезенки крыс. Также нами установлен факт того, что при естественном течении стресс-реакции, через 30 мин после стрессирующего воздействия секреция дефенсинов нейтрофилами возрастает, а к трем часам их концентрация в плазме существенно повышается. По совокупности полученных данных можно сделать вывод о том, что молекулярные факторы врожденного иммунитета играют медиаторную роль в регуляции адаптивных реакций при стрессе.

НАКОПЛЕНИЕ СРЕДНЕМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ В КРОВИ КОРОВ-МАТЕРЕЙ ПРИ ГЕСТОЗЕ КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ У ТЕЛЯТ

Е.А. Калаева[1], В.Н. Калаев[2], М. Алхамед[2], А.Е. Черницкий[3], Н.Н. Каверин[4] *[1]Кафедра биофизики и биотехнологии, Медико-биологический факультет, Воронежский государственный университет; [2]Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, медико-биологический факультет, Воронежский государственный университет; [3]Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии РАСХН; [4]Военный учебно-научный центр Военно-воздушных сил «Военно-воздушная академия им. Н.Е. Жуковского и Ю.А. Гагарина», Воронеж, Россия*

Гестоз – патологическое состояние организма беременных животных, проявляющееся эндогенной интоксикацией, генерализованным эндотелиозом, сосудистым спазмом и полиорганной функциональной недостаточностью. На фоне гестоза отмечается рождение ослабленного или маложизнеспособного приплода. В качестве параметра оценки степени эндогенной интоксикации используют концентрацию среднемолекулярных пептидов (СМП). К их числу относят эндогенные компоненты, молекулярная масса которых составляет 500–2000 Да, образующиеся в процессе протеолиза в поврежденных тканях, а также в плазме при выходе в кровь протеолитических ферментов. Пул СМП включает в себя компоненты пептидной природы, производные олигоспиртов и глюкуроновой кислоты. СМП обладают нейротоксической активностью, угнетают процессы биосинтеза белка, разобщают процессы окисления и фосфорилирования, нарушают механизмы регуляции синтеза адениловых нуклеотидов, изменяют транспорт ионов через мембраны, эритропоэз, фагоцитоз, микроциркуляцию, лимфодинамику, вызывают состояние вторичной иммунодепрессии. СМП могут проникать через плацентарный барьер, оказывая непосредственное токсическое влияние на плод, вызывая полиорганные нарушения разного характера. Нами была исследована связь между содержанием СМП в сыворотке крови коров на 239–262 день гестации и заболеваемостью новорожденных телят бронхопневмонией. Было обнаружено, что уровень СМП у коров, телята которых впоследствии не заболели бронхопневмонией, составил 0,408±0,152 у.е. (Me=0,354 у.е.). У коров, телята которых заболели бронхопневмонией, содержание СМП было достоверно ($p<0,05$) выше (0,615±0,197 у.е., Me=0,674 у.е.). Выявлена статистически достоверная корреляция между концентрацией СМП в сыворотке крови коров и вероятностью развития бронхопневмонии у их потомства ($r_s=0,536$; $p<0,005$). ROC-анализ позволил установить, что содержание СМП в сыворотке крови коров может служить предиктором возможного развития бронхопневмонии у новорожденных телят (AUC=0,782, чувствительность – 85,71 %, специфичность – 81–82%; критическое значение – >0,547 у.е.). Таким образом, накопление СМП в крови коров в период гестации позволяет не только оценивать степень тяжести интоксикации, но и с достаточно высокой точностью прогнозировать развитие бронхолегочной патологии у их потомства.

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ В РЕПОРТЁРНЫХ МРНК НА ИХ ТРАНСЛЯЦИЮ *IN VITRO* И *IN VIVO*

А.С. Анисимова[1,2], К.А. Акулич[1,2], Т.С. Зацепин[3,4], О.В. Сергеева[3,4], Т.О. Абакумова[5], Т.Е. Приказчикова[3], И.М. Теренин[1], Д.Е. Андреев[1], И.Н. Шатский[1], С.Е. Дмитриев[1,6]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Сколковский институт науки и технологий, Москва; [4]Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [5]Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского, Москва; [6]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Метод трансфекции мРНК стремительно завоевывает популярность в биологии и биомедицине. Он применяется при изучении регуляции экспрессии генов на уровне трансляции, для перепрограммирования стволовых клеток, вакцинации и заместительной терапии. Поскольку мРНК не может встроиться в геном клетки, этот метод считается более безопасным и перспективным для терапевтических приложений, чем технологии, связанные с ДНК. При изучении механизмов генной экспрессии с использованием репортёрных конструкций мРНК-трансфекция позволяет сосредоточиться на анализе трансляционных механизмов, исключив вклад других этапов экспрессии. При трансфекции готовой мРНК отсутствует стадия доставки в ядро, что облегчает работу с неделящимися клетками. Тем не менее, в случае первичных клеточных культур мРНК-трансфекция может представлять трудности из-за активации систем врожденного иммунитета. Применение модифицированных нуклеотидов позволяет минимизировать эту проблему, а также увеличивает стабильность мРНК. В литературе существуют противоречивые данные о способности различных модификаций повысить выход белкового продукта при мРНК-трансфекции. В данной работе мы изучили влияние двух модифицированных оснований (N1-метилпсевдоуридина и 5-метилцитозина), введённых в состав транскриптов, и трёх разновидностей 5’-кэпа на трансляцию репортёрных мРНК в различных системах. Мы сравнили эффективность и кинетику трансляции обычных и модифицированных мРНК в бесклеточных *in vitro* системах (коммерчески доступном лизате ретикулоцитов кролика и самостоятельно изготовленной системе из клеток асцитокарциномы мыши), иммортализованных культурах клеток (гепатокарциномы мыши Huh7, фибробластов мыши NIH3T3 и эмбриональной почки человека HEK293T), а также в первичных гепатоцитах и фибробластах мыши. Все мРНК, содержавшие m7G-кеп, были способны эффективно продуцировать люциферазу на протяжении 1–2 часов в бесклеточной системе и до 10–12 часов в живых клетках, но эффекты введения модифицированных оснований в разных системах отличались. Для первичных культур клеток наибольшую эффективность показали транскрипты, полученные в присутствии 50% N1-метилпсевдоуридина и 50% 5-метилцитозина, содержавшие на 5’-конце структуру кеп-0. Полученные результаты могут быть использованы для разработки эффективных методов мРНК-трансфекции животных. *Работа поддержана грантом Правительства РФ № 14.W03.31.0012.*

ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГАМКЕРГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

С.А. Антонов, Е.В. Новосадова, О.С. Лебедева, А.Г. Кобылянский, И.А. Гривенников
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Рецепторы ГАМК-А вовлечены в определение фенотипа дифференцирующихся нейронов. Активация ГАМК-А вызывает противоположные эффекты в развивающихся (возбуждение) и зрелых (торможение) клетках нервной системы. Данные эффекты определяются экспрессией в нейронах двух мембранных переносчиков ионов хлора – NKCC1 и KCC2. Экспрессия

обоих переносчиков создает в клетке условия, при которых активация ГАМК-А рецептора приводит к гиперполяризации мембраны и торможению, в отсутствии KCC2 активация ГАМК-А вызывает возбуждение клетки. Исследования проводили на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) человека, дифференцирующихся в дофаминергические нейроны. На различных этапах данного процесса с помощью ОТ-ПЦР мы проанализировали экспрессию NKCC1, KCC2 и ряда субъединиц ГАМК-А рецептора, а также провели измерения уровня внутриклеточного кальция ($[Ca2^+]i$) при аппликации ГАМК и ее аналога мусцимола. Мы установили, что мРНК b1 субъединицы ГАМК-А рецептора экспрессируется в нейросферах (НС), коммитированных нейральных предшественниках (НП) и молодых нейронах. В молодых нейронах также наблюдалась экспрессия мРНК a1 субъединицы. a3 субъединица экспрессировалась в НС и коммитированных НП и, в меньшей степени, в молодых нейронах, но ее уровень экспрессии в ходе всего процесса дифференцировки был заметно ниже, по сравнению с b1 субъединицей. мРНК NKCC1 детектировалась на всех стадиях нейральной дифференцировки ИПСК, появляясь одновременно с нейральным маркером даблкортином. Наличие мРНК KCC2 выявлялось только в нейронах на самых поздних этапах дифференцировки. В ходе всего процесса дифференцировки мы не обнаружили экспрессию a2 и b2 субъединиц. Экспрессия всех перечисленных генов в недифференцированных ИПСК не обнаруживалась. Далее мы показали, что в коммитированных НП и молодых нейронах ГАМК и мусцимол вызывали заметное транзиентное увеличение $[Ca2^+]i$. Данный эффект характерен для возбуждающего действия ГАМК через деполяризацию мембраны и активацию потенциал-зависимых кальциевых каналов. Таким образом, мы показали наличие функциональных ГАМК-А рецепторов в коммитированных НП и созревающих нейронах человека. Данный феномен может быть использован в качестве модели для оценки активности соединений, обладающих ГАМКергической активностью. *Проект РФФИ № 17-04-01661 А*

СПОСОБНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ПРОНИКАТЬ В ГОЛОВНОЙ МОЗГ МЫШЕЙ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЕЙ АЛЬЦГЕЙМЕРОВСКОГО ТИПА И ЗАЩИЩАТЬ ИХ НЕЙРОНЫ

С.М. Баласанянц[1], Т.Д. Волкова[1], А.В. Камынина[1], Д.О. Короев[1], М.П. Филатова[1], П.В. Некрасов[2], И.В. Нестерова[2], А.Н. Самохин[2], Н.В. Бобкова[2], О.М. Вольпина[1] *[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской области, Россия*

Рецептор конечных продуктов гликозилирования (RAGE) находится на поверхности нейронов и клеток глии и взаимодействует с рядом лигандов, в том числе со значимый при патогенезе болезни Альцгеймера (БА) β-амилоид. Активация RAGE в головному мозге при БА приводит к развитию ряд патологических процессов реакций, в связи с чем данный рецептор является перспективной мишенью для разработки терапевтических средств против этого заболевания. Известно, что растворимая форма RAGE, состоящая только из внеклеточной части рецептора, проявляет нейропротективное действие в опытах *in vitro* и *in vivo*. Мы предположили, что такой активностью могут обладать и короткие фрагменты RAGE, содержащие сайты связывания с лигандами. Ранее нами была показана способность синтетического фрагмента RAGE (60–76) и его N-концевого участка (60–70) восстанавливать пространственную память при интраназальном введении бульбэктомированным (БЭ) мышам, которых использовали в качестве экспериментальной модели спорадической формы БА. Целью данной работы является изучение влияния пептида RAGE(60–76) и его фрагментов на состояние нейронов головного мозга животных с нейродегенерцией альцгеймеровского типа. Для этого проведено исследование морфофункционального состояния головного мозга БЭ мышей после интраназального введения пептидов. Выявлено, что только пептиды (60–76) и (60–70) достоверно восстанавливают число нормальных нейронов и уменьшают число нейронов с такими патологиями, как пикноз, кариолизис и цитолиз до нормального физиологического уровня в височной коре и гиппокампе. Для изучения способности пептида (60–76) проникать в мозг был синтезирован флуоресцентно-меченный аналог. Доказано, что после интраназального введения флуоресцентного пептида БЭ мышам и трансгенным мышам Tg-5xFAD, проявляющим признаки БА, пептид присутствует в коре и гиппокампе. В результате иммуногистохимического исследования срезов головного мозга таких животных было обнаружено, что флуоресцентный пептид солокализуется с амилоидными бляшками. Мы предполагаем, что пептид (60–76) соответствует фрагменту сайта связывания RAGE с бета-амилоидом. В настоящее время проводятся исследования по изучению связывания пептида с бета-амилоидом в опытах *in vitro*. *Работа выполнена в рамках проектов РФФИ 15-04-01360А, 17-34-80016 мол_эв_а.*

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP70 КЛЕТКАМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

А.А. Борнусова[1,2], Е.В. Дзюбинская[2], А.М. Сапожников[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В последние годы активно изучается роль гуморальных и клеточных факторов иммунитета в развитии и прогрессировании процессов атеросклеротического поражения сосудов. Установлено, что в формирование клеточных и гуморальных аутоиммунных реакций в очагах поражения сосудов вовлечены стресс-индуцируемые белки теплового шока (HSP), в частности HSP70, экспонированные на поверхности поврежденных клеток эндотелия. Продемонстрировано, что в сыворотке крови больных атеросклерозом наблюдается повышенное содержание растворимой формы HSP70 и антител к этим протеинам. Механизмы вовлеченности HSP70 в патогенез атеросклероза далеки от полного понимания. Наши предыдущие исследования показали, что при ряде патологий региональные процессы, характеризующиеся вовлеченностью HSP70, отражаются не только на уровне внеклеточного, сывороточного пула этих протеинов, но и на уровне их экспрессии клетками иммунной системы. В развитие указанного наблюдения в данной работе нами проводится анализ изменений уровня экспрессии белков теплового шока HSP70 клетками иммунной системы, в процессе патогенеза облитерирующего атеросклероза человека. Накопленные нами к настоящему времени результаты анализа образцов периферической крови пациентов и доноров свидетельствуют о существенных различиях между этими двумя группами по ряду характеристик, связанных с HSP70. Так, наши данные впервые продемонстрировали повышенное содержание индуцируемой формы этих протеинов (Hsp70) в популяции мононуклеаров, полученных от больных атеросклерозом по сравнению со здоровыми донорами. Предварительные результаты указывают также поверхностную локализацию HSP70 на лимфоцитах в образцах крови некоторых пациентов, что в соот-

ветствии с литературными данными не наблюдалось в наших экспериментах при анализе клеток здоровых доноров. Наши результаты подтвердили опубликованные рядом авторов данные о повышенном содержании в сыворотке крови пациентов внеклеточного пула HSP70 (конститутивной формы, Hsc70) и антител к этим протеинам. Существенным дополнением к имеющимся литературным сведениям является обнаруженная нами положительная корреляция перечисленных показателей с уровнем кальцификации сосудов, отражающего степень развития болезни.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского научного фонда, грант № 16-15-10404.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ, ИНГИБИРУЮЩИХ ОБРАЗОВАНИЕ И АГРЕГАЦИЮ АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА БЕТА НА ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Н.С. Вашурина, П.К. Шувалова, А.Л. Шварцман, С.В. Саранцева
НИЦ «Курчатовский институт», Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина, Россия

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием пожилого возраста, которое обнаруживается, как правило, у людей старше 65 лет. БА характеризуется прогрессирующей потерей памяти, нарушением когнитивных функций, дисфункцией синапсов и гибелью нейронов. Этиология заболевания в настоящий момент неизвестна и более 90% случаев являются спорадическими. Отложение в мозге больных БА экстраклеточных агрегатов амилоидного пептида β (Aβ) является одним из основных нейропатологических признаков БА. Хотя функции Aβ остаются неизвестными, предполагается, что агрегация и олигомеризация Aβ являются инициирующим событием в развитии БА. При скрининге комбинаторных пептидных библиотек нами были определены пептиды, блокирующие различные стадии образования амилоидных фибрилл Aβ (SH5, SH8). Однако данные пептиды не могли проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Для превращения уже найденных «ингибиторов образования амилоида» в потенциальные терапевтические мы модифицировали их, присоединив к их последовательности вектора, способные проходить через ГЭБ млекопитающих: TP2, Arg9 и Cog14-10. Мы исследовали эффект составных пептидов TP2-SH8, Arg9-SH8-8, Cog14-10- SH8, Arg9-SH5 и Cog14-10 - SH5 на модели *Drosophila melanogaster*, которая воспроизводит основные черты БА, а именно, образование и отложение Aβ42, нейродегенерацию, нарушения поведения и памяти. Мы использовали трансгенные линии мух, несущих в геноме последовательность Aβ42 и последовательность Aβ42 с мутацией Arctic. Для активации трансгенов использовали драйвер elav155C, запускающий экспрессию в нервных клетках. При анализе прохождения пептидов через ГЭБ мы детектировали флуоресцентный сигнал внутри мозга для всех исследуемых пептидов, что говорит о прохождении пептидов через ГЭБ. Контрольный пептид не детектировался в мозге на всем протяжении опыта. Мы также проанализировали продолжительность жизни, уровень растворимого и нерастворимого Aβ42, нейродегенерацию в мозге, а также поведение животных при кормлении их пептидами. Эксперименты показали, что пептиды по-разному действуют на вышеуказанные показатели.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-29-01350.

ВЛИЯНИЕ КАВЕОЛИНА-1 НА РЕГУЛЯТОРНУЮ ФУНКЦИЮ Ca^{2+}-СЕНСОРА РЕКОВЕРИНА В СИСТЕМЕ ФОТОТРАНСДУКЦИИ

В.И. Владимиров[1], Е.Ю. Зерний[2], В.Е. Бакшеева[2], И.И. Сенин[2], С.Е. Пермяков[3], В.М. Липкин[1], Д.В. Зинченко[1]
[1]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущино; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Институт биологического приборостроения с опытным производством, Пущино, Россия

Система генерации фотоответа в клетках позвоночных животных – динамичный процесс, реализуемый за счёт регуляции активности фоточувствительного рецептора – родопсина, по средствам каскада белковых взаимодействий. Важную роль в этом процессе играют белки семейства нейрональных кальциевых сенсоров (НКС). Типичный представитель семейства НКС – фоторцепторный Ca^{2+}-связывающий белок рековерин, модулирующий активность родопсинкиназы – фермента, участвующего в процессе десенситизации родопсина. Критический параметр для реализации физиологической функции НКС рековерина – концентрация ионов кальция в клетке. От количества свободного кальция, и порога чувствительности рековерина зависит процесс выключения зрительного каскада. Недавно в наружных сегментах фоторецепторных клеток палочек были обнаружены рафт-структуры, особые мембранные компартменты, содержащие в своем составе зрительный пигмент родопсин, и многие другие белки, принимающие участие в передаче зрительного сигнала. Основным регуляторным белком рафт-структур является трансмембранный белок кавеолин-1, сайт взаимодействия с которым был обнаружен в рековерине. Показано взаимодействие каркасного домена белка кавеолина-1, основного регуляторного белка рафт-структур, с фоторецепторным Ca^{2+}-сенсором рековерином, и влияние такого взаимодействия на процесс зрительной трансдукции. Образование комплекса с кавеолином-1 приводит к снижению кооперативности связывания кальция рековерином ионов кальция, с одновременным сдвигом соответствующей константы диссоциации в сторону более низких концентраций катиона. Зависимость Ca^{2+}-чувствительности рековерина от присутствия кавеолина-1 делает его ингибирующую эффективность в отношении родопсинкиназы более выраженной именно в базальных дисках наружного сегмента палочек, что приводит к замедлению процесса десенситизации родопсина в этой части клетки. Показано, что повышение Ca^{2+}-чувствительности рековерина обусловлено стабилизацией открытой конформации его второго Ca^{2+}-связывающего центра EF2.

Таким образом, транслокация рековерина в фоторецепторные рафт-структуры, содержащие кавеолин-1, повышает Ca^{2+}-чувствительность регуляторной активности белка, адаптируя ее к физиологическому диапазону изменения концентрации катиона в фоторецепторной клетке.

АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НЕЙРОТРОФИНОВ И БЕЛКОВ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА В ГИППОКАМПАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ ПОСТНАТАЛЬНОМУ ВВЕДЕНИЮ ВАЛЬПРОАТА НАТРИЯ

В.Р. Гедзун[1], Н.Ю. Сарычева[1], В.А. Дубынин[1], И.Ю. Шамакина[2]
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; [2]НИИ наркологии – филиал Федерального медицинского исследовательского центра психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского, Москва, Россия

Моделирование расстройств аутистического спектра (РАС) в живых системах необходимо для изучения механизма формирования данного спектра нарушений, а также поиска адекватных путей коррекции РАС. Наиболее распространены модели на лабораторных крысах, основанные на введении вальпроатов на ранних этапах онтогенеза, причем введение может осуществляться как в пре-, так и в постнатальный период. В результате у животных формируется спектр поведенческих нарушений, сходных с аутистической симптоматикой. В то время, как поведенческие особенности вальпроатных моделей исследованы крайне подробно, данных о биохимических особенностях процессов, происходящих в ЦНС, не достаточно много. В связи с этим нами была поставлена цель оценить уровень экспрессии некоторых нейротрофинов, а также белков везикулярного транспорта SNAP-25 и VAMP-2 в гиппокампе крыс, подвергшихся хроническому постнатальному введению солей вальпроевой кислоты (ВПК). Для моделирования аутистических особенностей животным опытной группы вводили раствор ВПК (6-12 день жизни, 150 мг/кг, ip), контрольной вводили эквивалентный объем растворителя (ip). Анализ уровня экспрессии целевых генов в гиппокампальной области проводился методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Обнаружено, что уровень экспресии VAMP-2 и SNAP-25 в гиппокампе животных, получавших хроническое постнатальное введение ВПК статистически значимо увеличен. При этом изменения уровня экспрессии нейротрофинов BDNF и GDNF выявлено не было. Как известно, высокоорганизованный мультибелковый SNARE комплекс играет ключевую роль в формировании синапсов и передаче сигнала в ЦНС. Важными компонентами SNARE комплекса являются белки SNAP25 и VAMP2. Клинические данные свидетельствуют о том, что белок SNAP-25 ассоциирован с рядом психопатологий, в частности, шизофренией, биполярным расстройством, а также расстройствами аутистического спектра (РАС). Наши данные позволяют предположить, что аутистическая симптоматика у животных, подвергшихся хроническому постнатальному воздействию ВПК, имеет сходный механизм формирования с некоторыми случаями аутистической патологии у людей, поскольку в наших экспериментах были выявлены аналогичные биохимические маркеры.

РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК EL29 ЧЕЛОВЕКА – РЕГУЛЯТОР ТРАНСЛЯЦИИ МРНК ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В СПЕЦИФИЧНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КАСКАДЫ

А.В. Гопаненко[1,2], Ю.С. Бартули[1], В.С. Мелентьев[1,2], А.А. Малыгин[1,2], А.Е. Тупикин[1], М.И. Мещанинова[1], А.Г. Веньяминова[1], М.Р. Кабилов[1], Г.Г. Карпова[1,2] *[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Рибосомный белок (гр) eL29 млекопитающих не является белком, необходимым для функционирования рибосомы, хотя у первичных эмбриональных фибробластов мыши, нокаутных по гену этого белка, наблюдали пониженную скорость пролиферации и белкового синтеза [Kirn-Safran *et. al.*, 2007]. Это дало основание полагать, что гр eL29 обладает регуляторными функциями. Для выявления роли этого белка в регуляции экспрессии специфичных генов на уровне трансляции мы использовали метод рибосомного профайлинга с последующим глубоким секвенированием библиотеки кДНК, полученной на основе фрагментов мРНК, защищаемых рибосомами (Ribo-seq), позволяющий определять количество транслируемых мРНК. Применение этого метода к клеткам HEK293, с пониженным уровнем гр eL29, позволило выявить изменения в профиле транслируемых мРНК, вызванные дефицитом этого белка. Содержание гр eL29 в клетках было снижено с помощью РНК-интерференции. Показано, что 2-3-кратное снижение уровня гр eL29 не приводит к существенному изменению уровней других рибосомных белков и не сказывается на полисомном профиле. Скорость пролиферации и выживаемость eL29-дефицитных клеток согласно МТТ-тесту также не изменялись. Вместе с тем, установлено, что рибосомы, не содержащие гр eL29, присутствовали в полисомах, т.е. были активны в трансляции. Анализ данных Ribo-seq показал, что при снижении уровня гр eL29 увеличивается эффективность трансляции мРНК более чем 20 генов, среди которых наибольшую долю составляют гены, которые кодируют белки, участвующие в связывании с клеточным скелетом или являющиеся мембранными рецепторами. При этом пониженную эффективность трансляции мРНК наблюдали для примерно 4 тысяч генов, и этот набор содержал большое количество генов – участников путей регуляции актинового цитоскелета и передачи сигналов с рецепторов цитокинов, а также путей, регулирующих клеточную адгезию. В целом, наши данные впервые свидетельствуют о непосредственном участии гр eL29 в регуляции экспрессии генов человека на уровне трансляции. *Работа поддержана грантом Президента РФ МК-7535.2016.4 и частично ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (базовый проект № VI.57.1.2, 0309-2016-0001) и комплексной программой СО РАН (проект № II.2П/VI.57-3 (0309-2015-0024).*

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РИБОСОМНОГО БЕЛКА US3 ЧЕЛОВЕКА, ОСНОВАННЫЕ НА ЕГО СПОСОБНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С АПУРИН-АПИРИМИДИНОВЫМИ САЙТАМИ В ДНК

А.С. Грошева[1], Д.О. Жарков[1,2], А.В. Гопаненко[1,2], А.Е. Тупикин[1], М.З. Кабилов[1], Д.М. Грайфер[1,2], Г.Г. Карпова[1,2] *[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН;[2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Известно, что эукариотические рибосомные белки семейства uS3 имеют свойства ферментов эксцизионной репарации ДНК. В частности, эти белки способны расщеплять двуцепочечную (дц) ДНК с 3′-стороны от апурин-апиримидинового (АР) сайта, т.е. они обладают АР-лиазной активностью. Однако способность uS3 взаимодействовать с одноцепочечной (оц) ДНК не была изучена, и, кроме того, оставалось неизвестным, способен ли взаимодействовать с АР-сайтами uS3, находясь в составе рибосомы, является ли взаимодействие uS3 с ДНК сиквенс-специфичным и какие участки ДНК взаимодействуют с uS3 *in vivo*. В настоящей работе для изучения взаимодействий uS3 *in vitro* использованы 40S субчастицы рибосом человека и рекомбинантный uS3, а также оц- и дц-23-звенные олигомеры ДНК, немодифицированные или содержащие АР сайт. Установлено, что (i) оц-ДНК является значительно лучшим субстратом для свободного uS3, чем дц-ДНК; (ii) рибосомосвязанный uS3 не обладает АР-лиазной активностью, но способен сшиваться с АР-сайтом оц-ДНК посредством экспонированного пептида в его KH-домене; (iii) свободный uS3 сшивается предпочтительно с 5′-концевым фрагментом оц-ДНК, обра-

зующимся после ее расщепления по АР-сайту; (iv) связывание оц-ДНК со свободным uS3 практически не зависит от последовательности ДНК, тогда как связывание оц-ДНК с рибосомо-связанным uS3 детектировано не было. Применение метода ChIP-seq к клеткам HEK293 позволило выявить участки ДНК, вовлеченные в связывание свободного uS3 *in vivo*. Оказалось, что эти участки находятся преимущественно в прицентромерных районах хромосом, и в ½ хромосом они совпадают с доменами хроматина, ассоциированными с ядрышком, или примыкают к этим доменам. Большинство участков связывания uS3 расположены в районах хромосом, гиперчувствительных к ДНКазе I, где хроматин не конденсирован и ДНК более доступна для ДНКазы и ДНК-связывающих белков. Сделано предположение, что свободный uS3 участвует в репарации ДНК в ядрышке и в районах хроматина, ассоциированных с ядрышком, тогда как uS3 в составе рибосомы может быть вовлечен в сигнальные пути, связанные с окислительным стрессом. *Работа была поддержана грантом РФФИ 16-04-00241-а и частично ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (базовый проект № VI.57.1.2, 0309-2016-0001) и комплексной программой СО РАН (проект № II.2П/VI.57-3 (0309-2015-0024).*

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ МУТАЦИЙ НА АКТИВНОСТЬ АР-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

А.Т. Давлетгильдеева[1,2], И.В. Алексеева[1], Н.А. Кузнецов[1,2], О.С. Федорова[1,2]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск; [2]Факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Одними из наиболее часто встречающихся повреждений ДНК являются апуриновые/апиримидиновые сайты (АР-сайты). Ежедневно в каждой клетке организма человека может возникать до 10 000 таких повреждений. АР-сайты обладают высокой мутагенностью в связи с отсутствием кодирующего азотистого основания. Кроме того, в связи с повышенной химической нестабильностью, АР-сайты могут приводить к появлению одноцепочечных разрывов рибозофосфатного остова ДНК. Один из основных ферментов системы эксцизионной репарации оснований – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза человека APE1 – играет ключевую роль в поиске и инициировании процесса удаления АР-сайтов из ДНК. Известно, что некоторые однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) гена, кодирующего APE1, вызывают снижение активности фермента по сравнению с диким типом, что может приводить к повышенному риску возникновения рака у людей, носящих такие мутации. Ввиду этих данных исследование влияния замен аминокислотных остатков в АР-эндонуклеазе человека APE1, обусловленных SNP, представляет огромный интерес. В данной работе проведен анализ известных SNP и отобран ряд полиморфизмов, вызывающих замены аминокислотных остатков в области ДНК-связывающего центра фермента. Из клеток продуцентов получены очищенные препараты четырех мутантных форм фермента APE1, содержащих замены остатков аминокислот Arg237Ala, Asn222His, Gly241Arg и Arg274Glu. Методом «остановленного потока» зарегистрированы конформационные изменения мутантных форм фермента и ДНК-субстрата с использованием 13-звенных дуплексов, содержащих аналог АР-сайта – F-сайт (2'-метокси-3'-окситетрагидрофуран). Для регистрации конформационных изменений ДНК был использован субстрат, содержащий остаток 2-аминопурина напротив F-сайта. Полученные данные позволили определить кинетическую схему, описывающую взаимодействие мутантных форм APE1 с ДНК-субстратами, рассчитать константы скорости всех элементарных стадий и установить стадии процесса, на которые оказали влияние исследованные аминокислотные замены. *Эта работа была поддержана частично ФАНО (№ VI.57.1.2, 0309-2016-0001), комплексной научной программой «Молекулярная и клеточная биология» СО РАН (№ II.2П / VI.57-6 (0309-2015-0025), грантами РФФИ (№ 16-04-00037 и 15-04-00467).*

ИССЛЕДОВАНИЕ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ КАТЕЛИЦИДИНОВ КОЗЫ *CAPRA HIRCUS* НА БАКТЕРИИ

А.А. Калашников, П.В. Пантелеев, И.А. Болосов, С.В. Баландин, Т.В. Овчинникова
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Потенциальными объектами для создания антибиотиков нового поколения являются антимикробные пептиды (АМП). АМП играют ключевую роль в иммунной системе животных благодаря активности в отношении широкого спектра микроорганизмов и иммуномодулирующим свойствам. Как правило, репертуар защитных пептидов у млекопитающих включает молекулы различных структурных классов, которые способны, с одной стороны, нарушать целостность мембраны патогена, с другой – ингибировать ряд метаболических процессов путем взаимодействия с внутриклеточными мишенями. Подобный механизм действия в значительной степени препятствуют формированию резистентности к АМП. Объектами данного исследования стали кателицидины домашней козы *Capra hircus*: Pro-богатый минибактенецин mini-ChBac7.5Nα и α-спиральный пептид ChMAP-28, а также гибридные молекулы, включающие структурные элементы обоих пептидов. Исследуемые соединения были получены методом гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3). Для оценки способности пептидов подавлять бактериальную трансляцию была использована бесклеточная белок-синтезирующая система на основе клеточного экстракта *E. coli* BL21(DE3) Star. Способность пептидов нарушать целостность цитоплазматической мембраны живых бактерий оценивали с помощью флуориметрических и фотометрических методов анализа. В ходе работы были изучены антимикробные свойства и эффекты при совместном действии кателицидинов в отношении широкого спектра бактериальных тест-культур. Полученные результаты дают основание полагать, что пептиды mini-ChBac7.5Nα и ChMAP-28 обладают принципиально различающимися механизмами антимикробного действия, что может лежать в основе синергического эффекта при их взаимодействии, продемонстрированного в отношении бактерий. Кроме того, была показана возможность реализации «двойного» механизма действия в рамках единой гибридной молекулы с сохранением высокой антибактериальной активности. Однако, максимальный антибактериальный эффект может быть достигнут лишь при использовании смеси кателицидинов как отдельных пептидов, причем в неэквимолярных соотношениях. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ ПУТИ "N-КОНЦЕВОГО ПРАВИЛА" В ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ АМИЛОИДНЫХ ПЕПТИДОВ

О.И. Кечко, И.Ю. Петрушанко, К.И. Пятков, В.А. Митькевич, А.А. Макаров
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Согласно амилоидной гипотезе, ключевую роль в развитии болезни Альцгеймера (БА) играет процесс олигомеризации бета-амилоида (Аβ). Аβ – это пептид, состоящий из 37–43 аминокислот, который образуется из трансмембранного белка-

предшественника при последовательном действии β- и γ-секретаз. В гене данного пептида найден ряд наследственных мутаций, ассоциированных с развитием быстро прогрессирующих форм БА. Такие мутантные пептиды обладают большей нейротоксичностью и склонностью к агрегации по сравнению с немодифицированным Aβ. С помощью метода проточной цитометрии мы показали, что пептиды, имеющие наследственную «английскую» (H6R-Aβ) мутацию, оказывают более выраженный апоптогенный эффект на клетки нейробластомы Neuro-2a, чем Aβ. Основной антиапоптозной системой в клетках млекопитающих является путь «N-концевого правила». Данный путь включает в себя ряд ферментов – N-концевые аминогидролазы, аргинил-трансферазы и убиквитин-лигазы, – распознающих белки с различными дестабилизирующими аминокислотными остатками на N-конце. После взаимодействия с такими ферментами к белку присоединяется цепь убиквитинов, являющаяся сигналом для протеасомной деградации белка. Мы установили, что H6R-Aβ оказывает более сильное ингибирующее действие на антиапоптозный путь «N-концевого правила», чем Aβ. Используя пептиды с различными N-концевыми аминокислотными остатками, мы показали, что мишенью действия амилоидных пептидов являются аргинил-трансферазы (Ate1). При инкубации клеток Neuro-2a, нокаутных по гену Ate1, с H6R-Aβ или Aβ значительно снижается процент апоптотических клеток в популяции по сравнению с диким типом, что подтверждает участие аргинил-трансфераз в токсическом действии амилоидных пептидов. Таким образом, способность амилоидных пептидов ингибировать протеолитическую активность пути «N-концевого правила» может обуславливать их нейротоксичность, наблюдаемую при БА. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-24-00100.*

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ И КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ENDO VIII ИЗ *E. COLI* С ПОВРЕЖДЕННОЙ ДНК

О.А. Кладова[1], А.А. Кузнецова[1], О.С. Федорова[1,2], Н.А. Кузнецов[1,2] *[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Эндонуклеаза VIII из *E. coli* представляет собой бифункциональную ДНК-гликозилазу, обладающую как N-гликозилазной, так и AP-лиазной активностями в отношении различных окислительно-поврежденных пиримидиновых оснований. Для определения термодинамических и кинетических параметров взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратами исследована предстационарная кинетика процесса методом остановленной струи. С целью идентификации областей в ферменте и ДНК, подвергающихся конформационным изменениям, и выяснения роли аминокислотных остатков (Leu70, Tyr71, Phe121, Phe230 и Pro253) в распознавании поврежденной ДНК методом флуоресцентной спектроскопии изучен ряд мутантных форм Endo VIII, содержащих одиночные замены аминокислот. На основании кинетических данных рассчитаны изменения свободной энергии Гиббса (ΔG°), энтальпии (ΔH°) и энтропии (ΔS°) для отдельных стадий связывания и катализа. В результате, мутантный, кинетический и термодинамический анализ позволил улучшить понимание молекулярно-кинетической природы механизма специфического распознавания поврежденного участка в ДНК и его каталитического превращения под действием фермента Endo VIII. *Эта работа была поддержана частично ФАНО (№ VI.57.1.2, 0309-2016-0001), комплексной научной программой «Молекулярная и клеточная биология» СО РАН (№ II.2П / VI.57-6 (0309-2015-0025), грантами РФФИ (№ 16-04-00037 и 15-04-00467).*

АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА-АССОЦИИРОВАННЫЙ ПРОТЕИН 1 В ПРОГРЕССИИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ГОЛОВЫ И ШЕИ И НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Е.С. Колегова[1,2], Г.В. Какурина[1], И.В. Кондакова[1], А.А. Завьялов[1,2], Д.Н. Костромицкий[3]
[1]Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск; [2]Сибирский государственный медицинский университет; Томский областной онкологический диспансер, Томск, Россия

Основной причиной смертности при раке является опухолевая прогрессия, которая характеризуется, главным образом, способностью опухолевых клеток к инвазии и метастазированию. Формирование метастатического фенотипа опухолевых клеток связано с ремоделированием актинового цитоскелета, регулирующегося актинсвязывающими белками к которым относится аденинлатциклаза-ассоциированный протеин 1 (CAP1). CAP1 осуществляет разборку нитей актина самостоятельно и в связи с белком кофилином, участвует в клеточном сигналинге. Цель работы: исследование содержания CAP1 в тканях больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) и плоскоклеточной карциномой головы и шеи (ПКГШ) в зависимости от выраженности опухолевой прогрессии. Материалом для исследования явились ткани НМРЛ (n=35) и ПКГШ (n=46), соответствующие неизмененные ткани и лимфогенные метастазы. Уровень CAP1 определяли с помощью ИФА набора ELISA kit (Cusabio) на микропланшетном ИФА ридере Anthos Reader 2020 (Biochrom). В исследовании показано увеличение уровня CAP1 при НМРЛ в ткани опухоли и ткани метастатически измененных лимфоузлов по сравнению с неизмененной тканью легкого. Для ПКГШ наблюдалось увеличение уровня CAP1 в ткани опухоли по сравнению с неизмененной прилежащей тканью на уровне тенденции (p=0,1). Обнаружено изменение уровня CAP1 в зависимости от размера первичной опухоли (T): при НМРЛ отмечено увеличение изучаемого белка в ткани первичной опухоли с ее ростом со стадии T2 до T3; для ПКГШ было характерно волнообразное изменение данного показателя в ткани опухоли от ее размера. Так, при изменении размера опухоли с T1 до T2 наблюдалось снижение содержания CAP1, а при дальнейшем росте первичной опухоли (до T3-4) показатель вновь значимо возрастает. При вовлечении в опухолевый процесс регионарных лимфоузлов (N1-2) уровень CAP1 также значительно возрастал в опухолевой ткани как при НМРЛ, так и при ПКГШ. Полученные результаты свидетельствуют о вовлеченности белка CAP1 в процессы опухолевой прогрессии при НМРЛ и ПКГШ. Тканевое содержание этого белка зависит от стадии заболевания и может в дальнейшем послужить для разработки дополнительного тканевого прогностического маркера течения раковых заболеваний. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17–04–00198 А).*

КЛЕТОЧНАЯ РНК-ХЕЛИКАЗА DDX3X – МИШЕНЬ ДЛЯ АНТИВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

А.Н. Коровина[1], М.С. Новиков[2], С.М. Деев[3], М.К. Куханова[1]
[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; [2]Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Волгоград; [3]Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Исследование участия компонентов клетки в репликации вирусов и создание препаратов, направленных на соответствующие клеточной мишени, представляет собой авангардную научную задачу, поскольку позволяет избежать возникновения вирусной резистентности. Клеточная РНК-хеликаза DDX3X является перспективным кандидатом на роль такой мишени. В последнее время этот фермент стал популярным объектом исследования во всём мире, поскольку стало известно, что он необходим для репликации многих вирусов, например, вируса денге, вируса Западного Нила, и в том числе до сих пор представляющего собой глобальную угрозу здоровью ВИЧ. Ингибирование или блокирование синтеза DDX3X приводит к подавлению репликации этих вирусов. Нами была создана двуцистронная плазмида для прокариотической экспрессии pET-21d-2c-DDX3X, несущая ген DDX3X и кодирующая гексагистидиновый фрагмент, необходимый для очистки белка с помощью афинной хроматографии. Выход рекомбинантного белка составлял ~1 мг с литра культуры. Фермент проявлял АТР-азную и хеликазную активности в присутствии РНК и ДНК дуплексов. Совместно с Волгоградским государственным медицинским университетом и Институтом органического синтеза им. И.Я. Постовского на основе производных N,N-диарилмочевины и замещённых триазинов были разработаны соединения, представляющие собой отправную точку для разработки антивирусных препаратов, способных подавлять хеликазную и АТР-азную активности DDX3X. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 17-34-80145.*

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ АГОНИСТА СИГМА 1 РЕЦЕПТОРА НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА *IN VITRO*

Н.А. Красковская, А.В. Большакова, О.Л. Власова, И.Б. Безпрозванный
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Болезнь Хантингтона (БХ) является аутосомно-доминантным наследственным нейродегенеративным заболеванием, причиной которого является аномальное увеличение количества повторов (>39) кодона CAG в гене хантингтине, кодирующий мутантный белок хантингтин (mHtt). БХ характеризуется прогрессирующей атрофией стриатума в результате дегенерации средних шипиковых нейронов (СШН), которая начинается с элиминации постсинаптических компартментов, называемых дендритными шипиками. Хотя точная связь между накоплением mHtt и селективной гибелью СШН при БХ остается неустановленной, множество доказательств указывают на нарушение Ca^{2+} гомеостаза в СШН под действием мутантного mHtt и на изменение Ca^{2+} регуляции в дендритных шипиках. Аномальный Ca^{2+} сигналлинг в постсинапсе инициирует синаптическую дисфункцию в СШН, которая приводит к нарушениям в синаптической передачи и потери синаптических связей между нейронами коры и стриатума. Кортико-стриатная синаптическая дисфункции является ключевым компонентом патофизиологии ранней стадии БХ, ведущей в дальнейшем к когнитивной дисфункции и двигательным нарушениям. В настоящем исследовании мы сосредоточились на нейропротекторных свойствах сигма 1 рецепторов (С1Р), одна из основных функций которого, связана с модуляцией Ca^{2+} гомеостаза в клетки, кроме того недавнее исследование выявило локализацию С1Р в области постсинапса. Исследование проводилось на кортико-стриатной ко-культуре нейронов, выделенной из мышей с моделью БХ (FVB-Tg (YAC128) 53Hay / J; Jackson Laboratory). Добавление селективного агониста С1Р 2-(4-морфолиноэтил)-1-фенилциклогексан-1-карбоновой кислоты (PRE-084) в кортико-стриатную ко-культуру предотвращает элиминацию дендритных шипиков в СШН и восстанавливает синаптические связи между нейронами коры и стриатума. Нейропротекторный эффект соединения PRE-084 была полностью блокирован после РНК-опосредованного нокдауна С1Р, а так же частично нивелировался после аппликации антагониста С1Р, соединения 4-метокси-3- (2-фенилэтокси) -N, N-дипропилбензолэтанамина (NE-100). На основании полученных данных мы считаем, что С1Р представляет собой перспективною мишень для разработки лекарственных препаратов для лечения БХ. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-25-00024-П.*

ЭКСПРЕССИЯ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА В МАТКЕ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧЕНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ

Е.В. Кугаевская, О.С. Тимошенко, Т.А. Гуреева, Н.И. Соловьева *НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия*

Ренин–ангиотензиновая система (РАС) вовлечена в злокачественную трансформацию и опухолевую прогрессию. Ангиотензин превращающий фермент (АПФ) и рецептор ангиотензина II типа 1 (AT1R) экспрессированы в различных злокачественных опухолях человека. AII-AT1R-опосредованный сигналинг стимулирует опухолевый рост, ангиогенез и метастазирование. Рецептор ангиотензина II типа 2 (АТР2) оказывает антипролиферативное действие и стимулирует дифференцировку клеток. При опухолевой прогрессии наблюдается активация опухолевых РАС, что выражается в повышенном образовании AII под действием АПФ и экспрессии AT1R. Цель работы – изучение экспрессии АПФ и его рецепторов при плоскоклеточной карциноме шейки матки (ПКШМ) в парных клинических образцах опухолевой ткани и прилегаюшей к ним морфологически нормальной ткани (взятых из банка опухолей ОНЦ); а также в образцах («лентах»), расположенных на протяжении от стенки влагалища до дна полости матки (полученных в ходе операции по удалению матки). В работе использованы энзиматические и иммуногистохимические методы. Установлено, что в парных образцах активность АПФ в большинстве случаев (70%) была существенно выше в опухолевой ткани (от 0,3 до 3 раз), а в 20% случаев – в прилегающей к опухоли нормальной ткани. Исследование тканевых «лент» показало, что удельная активность АПФ практически во всех лентах имела наивысшие значения во фрагментах, содержащих опухолевую ткань; величины активности АПФ в образцах опухолей колебались от 1,9 до 4,8 нм/мг/мин (по специфическому субстрату Z-Phe-His-Leu), а в образцах, не содержащих опухолевую ткань, от 0,9 до 2,7 нм/мг/мин. Предварительный иммуногистохимический анализ некоторых тканевых «лент» показал, что эспрессия АПФ и АТР1 в основном была обнаружена в сосудах окружающей опухоль морфологически нормальной ткани, в то время как экспрессия АТР2 не была выявлена. Полученные результаты свидетельствуют о повышении уровня активности АПФ при ПКШМ в опухолях. Повышенная активность АПФ в образцах морфологически нормальной ткани может свидетельствовать об активации РАС и служить негативным прогностическим признаком.

ЛИГАНД Na,K-АТФазы, КАРДИОТОНИЧЕСКИЙ СТЕРОИД УАБАИН, ИЗМЕНЯЕТ ОТВЕТ КЛЕТОК НА ГИПОКСИЮ

В.А. Лакунина, К.М. Бурнышева, В.А. Митькевич, А.А. Анашкина, А.А. Макаров, И.Ю. Петрушанко
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Кардиотонические стероиды (КТС) – вещества растительного происхождения, которые используются в клинической практике. У человека обнаружены эндогенные КТС, в частности, уабаин, который присутствует в крови в наномолярной концентрации и выполняет функцию гормона, активируя сигнальные пути апоптоза, пролиферации и других клеточных процессов. Единственным известным рецептором для КТС является Na,K-АТФаза. Дальнейшая передача сигнала может осуществляться вследствие активации Src-киназы, находящейся в комплексе с Na,K-АТФазой. В условиях гипоксии транспортная активность Na,K-АТРазы снижается вследствие глутатионилирования регуляторных остатков цистеина, однако остается неизвестным, как снижение уровня кислорода влияет на сигнальную функцию фермента и меняется ли при этом воздействие уабаина на клетки. Влияние уабаина на клетки в условиях гипоксии изучали, используя линию SC-1 фибробластов мыши. Было оценены такие параметры как жизнеспособность клеток, внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК) и восстановленного глутатиона (GSH), а также степень активации сигнальных каскадов. Было показано, что в то время как при гипоксии жизнеспособность клеток значительно снижается, добавление уабаина в этих условиях способствует повышению выживаемости. При кратковременной инкубации в условиях острой гипоксии для клеток характерен рост АФК, однако добавление уабаина, напротив, приводит к снижению уровня АФК. Аналогичная ситуация наблюдается и с уровнем GSH. Было установлено, что в то время как инкубация клеток при гипоксии приводит к активации Src-киназы, обработка уабаином в данных условиях снижает уровень ее активирующего фосфорилирования. Согласно данным компьютерного моделирования уабаин-независимая активация Src-киназы в условиях гипоксии происходит вследствие глутатионилирования Na,K-АТФазы, в свою очередь, вероятно, индуцированного ростом АФК. Связывание же уабаина при гипоксии приводит к уменьшению уровня АФК, деглутатионилированию Na,K-АТФазы и последующему снижению активности Src-киназы. Известно, что в организме человека в условиях гипоксии происходит выброс в кровь эндогенного уабаина из коры надпочечников, поэтому подавление уабаином активности Src-киназы при гипоксии может носить адаптивный характер. *Поддержано Российским научным фондом, грант 14-14-11052.*

ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ TMA20/MCTS1, TMA22/DENR И TMA64/eIF2D УДАЛЯЮТ ПОСТ-ТЕРМИНАЦИОННЫЙ КОМПЛЕКС СО СТОП-КОДОНА МРНК, ПРЕДОТВРАЩАЯ НЕСАНКЦИОНИРОВАННУЮ РЕИНИЦИАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ

Д.С. Макеева[1,2], А.С. Анисимова[1,2], Е.А. Столбоушкина[3,4], И.Н. Шатский[1], С.Е. Дмитриев[1,4]
[1]НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва; [2]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Институт белка РАН, Пущино; [4] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

eIF2D и его гомологи MCTS1 и DENR – эукариотические трансляционные факторы, обладающие способностью как стабилизировать связывание тРНК в Р-сайте рибосомы на стартовом кодоне, так и высвобождать её из пост-терминационного комплекса на стоп-кодоне. Недавно было показано, что эти факторы влияют на трансляцию мРНК, содержащих короткие рамки считывания (uORF) в 5'-нетранслируемых областях. Однако их функции в живой клетке до конца не ясны. Чтобы исследовать функцию этих белков в дрожжах, мы приготовили бесклеточные трансляционные системы на основе трёх штаммов *S.cerevisiae*: *wt*; двойного нокаутного штамма по генам *TMA64* (ортолог *EIF2D*) и *TMA20* (ортолог *MCTS1*); двойного нокаутного штамма по генам *TMA64* и *TMA22* (ортолог *DENR*). Был приготовлен набор репортёрных мРНК, кодирующих люциферазу и содержащих различные uORFs в 5'-нетранслируемых областях. Эти мРНК были транслированы в *in vitro* системах на основе трёх штаммов. Мы обнаружили повышенный уровень трансляции основной рамки в случае мРНК с uORF в лизатах, где отсутствовали данные факторы. В случае мРНК без uORF такой разницы не наблюдалось. Степень выраженность эффекта зависела от длины uORF и её расположения относительно основной кодирующей части. Неадекватно высокий уровень трансляции был обнаружен также для второго цистрона бицистронных мРНК Rluc-Fluc. Мы сделали вывод, что в отсутствие данных белков частота реинициации трансляции сильно увеличена. Добавление к лизатам, приготовленным из клеток *Δtma64/Δtma20* и *Δtma64/Δtma22*, рекомбинантных димеров TMA20/TMA22 или MCTS1/DENR подтвердило наши выводы. Мы предлагаем модель, согласно которой действие этих белков в норме направлено на предотвращение связывания факторов инициации eIF1, eIF2-Met-tRNAi и eIF3 с пост-терминационным комплексом на 3'-конце кодирующей части. Таким образом, они защищают рибосомы, которые должны подвергнуться ресайклингу, от вовлечения в новый (несанкционированный) раунд инициации трансляции на 3'-нетранслируемой области. В некоторых случаях, однако, они могут позволять такую посадку, дискриминируя между «разрешённой» и «не разрешённой» реаинициацией трансляции на эукариотических мРНК. *Работа поддержана грантом РНФ 14-50-00060.*

АНТИДЕПРЕССАНТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЭНДОГЕННЫХ МЕЛАНОКОРТИНОВ В МОДЕЛИ НЕПРЕДСКАЗУЕМОГО ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА

Д.Д. Марков, К.А. Яценко, Л.С. Иноземцева, И.А. Гривенников, О.В. Долотов
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Депрессия – это сложное, гетерогенное, многофакторное психическое заболевание с недостаточно изученной этиологией и патофизиологией. Несмотря на то, что депрессия является одним из наиболее распространенных психических расстройств, существующие в настоящее время антидепрессанты недостаточно эффективны и обладают рядом побочных эффектов. Ангедония (утрата способности получать удовольствие) является ключевым симптомом депрессии и может быть оценена на животных в экспериментальных условиях. Модель непредсказуемого хронического стресса (НХС), обладающая хорошей прогностической, внешней и конструктивной валидностью, наиболее естественно отражает этиологию депрессии. Нейропептиды, в частности меланокортины, способны оказывать антивоспалительные эффекты, регулировать функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, модулировать уровень нейротрансмиттеров и нейротрофинов, что делает их потенциальными кандидатами на роль терапевтических препаратов с антидепрессантными свойствами. Целью настоящей работы являлось изучение способности α-меланоцитстимулирующего гормона (α-МСГ) и его фрагмента АКТГ(4-10) влиять

на выраженность ангедонии, индуцированной НХС, у крыс. Животные группы «стресс» на протяжении 5.5 недель подвергались процедуре НХС. С момента начала и до окончания процедуры НХС, ежедневно, крысы получали внутрибрюшинно инъекцию α-МСГ или АКТГ(4-10). В результате работы было обнаружено, что ежедневное периферическое введение α-МСГ и АКТГ(4-10) на фоне хронического стресса не только предотвращало снижение предпочтения животными раствора сахарозы (мера гедонистического поведения), но также приводило к нормализации набора веса животными и снижению относительного веса надпочечников, основных показателей стрессогенного воздействия на организм. Полученные данные указывают на способность системно вводимых α-МСГ и АКТГ(4-10) оказывать антидепрессантоподобные эффекты в стрессовой модели депрессии и указывают на возможность использования эндогенных меланокортинов и их аналогов для разработки терапевтических препаратов с антидепрессантной активностью. *Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (13-04-01690) и РНФ (16-15-10199).*

ОТНЕСЕНИЕ СИГНАЛОВ АТОМОВ ^{1}H, ^{13}C и ^{15}N В ЯМР-СПЕКТРАХ БЕЛКА EST3 – КОМПОНЕНТА ТЕЛОМЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА ДРОЖЖЕЙ

С.С. Марьясина[1], О.А. Петрова[1], С.В. Ефимов[2], В.В. Клочков[2], А.Б. Манцызов[1], О.А. Донцова[1], В.И. Польшаков[1]
[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва; [2]Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Теломераза – фермент, состоящий из нескольких субъединиц, отвечающий за стабильность генома при репликации в клетках эукариот. Ключевая роль этого фермента в развитии рака и в процессах старения делает его важной мишенью для развития антираковой терапии. Однако, вплоть до настоящего времени нет примеров успешного создания ингибиторов теломеразы методами рационального драг-дизайна, что связано с недостатком структурной информации о нем. Существенный вклад в изучение биологии теломеразы сделан при изучении теломеразы дрожжей – простейших эукариотических организмов. Теломераза дрожжей состоит, как минимум, из четырех субъединиц: матричной РНК и трех белков – Est1, Est2 и Est3. Делеция любого из этих компонентов подавляет функции теломеразы *in vivo*. Настоящее исследование посвящено определению структуры в растворе белка Est3 из термофильных дрожжей *Hansenula polymorpha (hpEst3).*

Первым и ключевым шагом во всех ЯМР-исследованиях является отнесение сигналов. В настоящей работе сделано отнесение сигналов атомов 1H, 13C и 15N основной цепи белка с помощью серии 3D-спектров, а также отнесение сигналов атомов боковых групп с помощью спектров HCCH-TOCSY. Анализ полученных химических сдвигов позволил предсказать вторичную структуру и оценить параметр порядка, отражающий подвижность белковой цепи. Также, проведено экспериментальное измерение подвижности аминокислотных остатков по данным 15N{1H} NOE. Предсказание параметра порядка белковой цепи по химическим сдвигам и по измерению 15N{1H} NOE показало, что некоторые аминокислотные остатки расположены в неупорядоченных областях.

Вся полученная информация будет использована для расчета 3D-структуры белка hpEst3, что позволит прийти к более глубокому пониманию механизма теломеразной активности, приближая возмжоность разработки новых ингибиторов теломеразы с антираковой активностью методами рациоанльного драг-дизайна. *Исследование проведено при поддержке Российского* научного фонда *(грант 14-14-00598).*

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ОВЕЧЬЕГО ПРИОННОГО БЕЛКА

А.К. Мельникова[1], М.В. Медведева[2]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и [2]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Неправильное сворачивание прионного белка (PrP) связано с развитием трансмиссивных губчатых энцефалопатий [1]. Точный механизм агрегации и гибели нейронов до сих пор остается неизвестным. Одна из распространенных точек зрения состоит в том, что крупные амилоидные структуры служат ловушками, удерживающими более токсичные для клетки олигомеры [2]. Однако, токсичная форма PrP до сих пор не установлена, а данные литературы в отношении наиболее токсичной формы белка противоречивы [3,4]. В нашей работе мы использовали полноразмерный рекомбинантный овечий PrP, а также его олигомеры и фибриллы, полученные in vitro и охарактеризованные методами ДЛС и флуоресценции тиофлавина Т. Многие исследователи использовали в своих работах фрагменты PrP с укороченным N-концом, поскольку они проще в обращении и достаточны для получения амилоидных фибрилл, однако существует предположение, что N-конец PrP влияет на конформацию олигомеров и фибрилл и таким образом может модулировать токсичность [3]. В качестве модели мы использовали клеточную линию нейробластомы человека SH-SY5Y, и провели сравнение уровня выживаемости недифференцированных и дифференцированных в нейроны клеток при добавлении в культуральную среду мономеров, олигомеров и амилоидных фибрилл PrP. Выживаемость недифференцированных клеток была снижена при добавлении более 2 μM фибрилл, в то время как олигомеры не были токсичны. При этом для дифференцированных клеток были токсичны как олигомеры, так и фибриллы PrP, снижая выживаемость клеток на 20% через 24 ч после воздействия. Мы также исследовали способность фибрилл PrP к фрагментации и токсичность получаемых при этом форм белка. Результаты наших исследований расширяют понимание возможных причин токсичности олигомеров и фибрилл PrP.

Литература

1. Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science.216, 136–144
2. S. Fontaine, D. Brown (2009) Mechanisms of Prion Protein Aggregation. Protein & Peptide Letters. 16, 14-26.
3. V. Novitskaya, O.V. Bocharova et al.(2006) Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. J Biol Chem. 281(19), 13828-36.
4. S. Simoneau, H. Rezaei et al. (2007) *In vitro* and *in vivo* neurotoxicity of prion protein oligomers. PLoS Pathog 3(8) e125.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА DksA НА ИНИЦИАЦИЮ ТРАНСКРИПЦИИ РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ *ESCHERICHIA COLI*, СОДЕРЖАЩЕЙ РАЗЛИЧНЫЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ СИГМА-СУБЪЕДИНИЦЫ

А.Д. Огиенко[1,2], Д.В. Пупов[2], Д.М. Есюнина[2], А.В. Кульбачинский[1,2]
[1]Кафедра молекулярной биологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Бактериальной РНК-полимеразе (РНКП) для инициации транскрипции необходимо наличие специального фактора – сигма-субъединицы. У РНКП *E. coli*, кроме основной сигма70-субъединицы, существует шесть альтернативных сигма-факторов (38, 32, 28, 24, 19 and 54), участвующих в инициации транскрипции в стрессовых условиях и на разных стадиях роста. Сигма70-субъединица вовлечена в различные стадии инициации транскрипции: узнавание и плавление промотора, синтез новой РНК, абортивную инициацию и уход с промотора. Ранее нами было показано, что консервативный район 3.2 сигма70 вовлечен в позиционирование матричной цепи ДНК в активном центре РНКП, связывание инициаторных нуклеотидов и облегчает диссоциацию сигма-субъединицы на последующих стадиях инициации, за счет прямого столкновения с растущей РНК. Активность многих бактериальных промоторов, узнающихся сигма70 РНКП в стационарной фазе роста, подавляется с помощью транскрипционного фактора DksA, снижающего стабильность промоторных комплексов. Более того, как было показано недавно, нуклеотид-содержащие кофакторы (NADH, FAD, CoA) могут быть использованы РНКП как инициаторные нуклеотиды и, возможно, участвуют в регуляции инициации транскрипции. Однако, очень мало известно о роли района 3.2, фактора DksA и неканонических нуклеотидов в инициации транскрипции РНКП, содержащими альтернативные сигма-факторы. В данной работе, мы показали что регион 3.2 играет важную роль в инициации транскрипции РНКП на промоторах для сигма-субъединиц 38, 32 и 28. Делеции района 3.2 в альтернативных сигма-субъединицах значительно увеличивают стабильность комплексов РНКП с их промоторами. В отличие от РНКП, содержащей сигма70 и сигма38-субъединицу, фактор DksA увеличивает стабильность комплексов РНКП, содержащих сигма32 и сигма28-субъединицы. Мы также показали, что РНКП, содержащие альтернативные сигма-субъединицы, способны включать NADH в растущую РНК в качестве 5'-концевого нуклеотида как в присутствии, так и в отсутствие DksA. Таким образом, DksA может играть важную роль в регуляции активности РНКП, содержащих альтернативные сигма-факторы, в стрессовых условиях. *Работа поддержана грантом РФФИ (17-04-02133).*

IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЯ ХЕЛАТИРУЮЩИХ СВОЙСТВ N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА ВЫСОКО АФФИННОГО ИМПОРТЕРА МЕДИ 1, КЛОНИРОВАННОГО В *E. COLI*

Ю. А. Орлов[1,2], Т. П. Санькова[1,2], А. Н. Савельев[2], Д. А. Кириленко[2,3], Л. В. Пучкова[1,2]
[1]Университет ИТМО; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; [3]Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия

Развитие болезней Альцгеймера, Паркинсона и Вильсона, связано с дисгомеостазом меди (Cu). В результате нарушений её метаболизма в клетках появляются свободные ионы Cu, провоцирующие образование АФК по механизму реакции Фентона. При указанных заболеваниях применяют Cu-хелаторы: тетратиомолебдат, триентин, *d*-пеницилламин. Однако они способны экстрагировать Cu из жизненно важных ферментов и образовывать нерастворимые комплексы с Cu-белками в клетках и во внеклеточных пространствах, что приводит к тяжелым побочным эффектам. У человека N-концевой домен белка CTR1 (NdCTR1), высоко аффинного импортера меди 1, состоит из 66 а.о., содержит два мотива для связывания Cu^{2+} и один для Cu^{+}, который также связывает Ag^{+}, изоэлектронный аналог Cu^{+}.

В работе участок гена, кодирующий NdCTR1, клонировали в экспрессирующий бактериальный вектор pGEX-4T-1 и трансформировали им штамм *E. coli* BL21 (DE3), экспрессию рекомбинантного белка, слитого с GST, индуцировали IPTG. Клетки, синтезирующие GST или GST-NdCTR1, росли с той же скоростью, что и нетрансформированные. Соответствие NdCTR1 фрагменту белка hCTR1, подтвердили секвенированием и иммуноблотингом с антителами к пептиду, соответствующему второму Cu-связывающему мотиву NdCTR1. Клетки, синтезирующие GST-NdCTR1, на несколько порядков устойчивее контрольных к Cu^{2+} и Ag^{+}. Для анализа хелатирующих свойств GST-NdCTR1 использовали абиогенные ионы Ag^{+}. Показано, что спасение клеток белком GST-NdCTR1 от токсического действия Ag^{+} происходит на фоне накопления серебра в клетке. По данным гель-фильтрации и иммунопреципитации Ag^{+} связаны с NdCTR1. Данные трансмиссионной электронной микроскопии показали, что суперэкспрессия белка GST или GST-NdCTR1, способствует восстановлению Ag^{+} в Ag^{0}, формированию наночастиц серебра и образованию филаментов *E. coli* длиной более 10 мкм. В клетках большая часть GST-NdCTR1 находится в тельцах включения. Агрегаты растворяются в 6 М растворе гуанидин-HCl, но не 8 М мочевине. Растворенный слитый белок аффинно связывается с заряженной Ni^{2+} хелатирующей сефарозой Fast Flow, вероятно, благодаря наличию двух His-богатых мотивов в NdCTR1. GST-NdCTR1 элюируется буфером, содержащем 6 М мочевину, при pH 5.0. В работе обсуждаются перспективы использования NdCTR1 в качестве нетоксичного биогенного хелатора меди.

МИКРОБНЫЙ РОДОПСИН *S. PAUCIMOBILIS*: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ

И.С. Охрименко[1], Н.Л. Маляр[1], А.А. Алексеев[1], Л.Е. Петровская[4], П.А. Попов[1], И.В. Чижов[5], Д.А. Долгих[4,6], М.П. Кирпичников[4,6], Г.Д. Бюльдт[1], В.И. Горделий[2,3]
[1]Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия; [2]Университет Гренобль Альпы, Гренобль, Франция; [3]Институт сложных систем:Структурная Биохимия (ICS-6), Исследовательский Центр г. Юлих, Германия; 4Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [5]Институт биофизической химии, Медицинская Школа Ганновера, Германия; [6]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

Первые микробные родопсины были обнаружены в *Halobacterium salinarum* [1]. Бактериородопсин (BR), галородопсин (HR) и сенсорный родопсин (SR) были хорошо охарактеризованы и стали модельными объектами для ретинальных светочувствительных белков. Начиная с 2000 было показано, что многие микробные родопсины функционируют как протонные насосы и каналы, управляемые светом. Теперь ясно, что они очень распространены среди крупных таксономических групп. Метагеномные исследования показали, что и различные нижшие эукариоты, в том числе множество грибов и некоторые водоросли, и даже вирусы, тоже имеют ретинальные свето-чувствительные белки с семью трансмембранными спиралями (7TM). Важно, что аминокислотные остатки, участвующие в переносе ионов в BR, являются консервативными во всех по-

добных ему белках, тем не менее, существует значительное разнообразие протонных помп. Новая волна интереса к микробным родопсинам поднялась в 2000 и 2005 году, после того, как было показано, что они могут использоваться – в оптогенетике, для контроля активности нейронов с помощью света. Биоинформационный поиск, проведенный в открытых базах данных белков и геномов микроорганизмов, показал не менее чем 7000 микробных родопсинов, которые еще не изучены [2]. Ген, кодирующий один из них, относится к *Sphingomonas paucimobilis*, грамотрицательной бактерии, характеризующейся необычным составом липидной мембраны и участвующей в различных типах клинических инфекций. Подбор условий экспрессии оптимизированного гена дал выход около 100 мг/л очищенного гетерологически синтезированного белка. Мы установили, что родопсин *S. paucimobilis* перекачивает протон и имеет максимум поглощения при 540 нм. Данные флэш-фотолиза показывают, что он, как и SR, имеет медленный фотоцикл. Но отсутствие трансдьюсера в его экспрессионной кассете в геноме хозяина возможно указывает на другой способ функционирования.

Работа поддержана грантом РНФ 16-15-00242.

Литература

1. Hildebrand E., Dencher N.A. "Two photosystems controlling behavioural responses of Halobacterium halobium." *Nature* 257 (1975): 46-48.
2. Ushakov, A., et al. "Knowledge-based prediction model for characterization of microbial rhodopsins for optogenetics." *FEBS Journal*. Vol. 283. 111 River st, Hoboken 07030-5774, NJ USA: Wiley-Blackwell, 2016.

РОЛЬ S100B В РАЗВИТИИ МОЗГА И ФОРМИРОВАНИИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Н.А. Перепеченова[1], А.В. Лобанов[1], А.А. Сидякин[2], И.А. Захарова[2], Д.М. Давыдов[2], С.Г. Морозов[2], А.Н. Мурашев[1]
[1]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московская область; [2]НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва, Россия

S100B – димерный белок из семейства Ca2+ связывающих белков, наибольшее его количество присутствует в астроцитах, является компонентом множественных путей внутри- и внеклеточного характера. Одним из основных рецепторов S100B является RAGE (receptor for advanced glycation end products), с которым он реагирует в дозозависимой манере и может вызвать как рост нервов, так и апоптоз. Ранняя индикация S100B в онтогенезе дала начало предположениям о критических изменениях в строении мозга при его отсутствии. Однако эти предположения не подтвердились. В то же время у животных отмечались те или иные изменения в поведении. Ситуация значимого снижения количества S100B в организме часто моделируется на нокаутных животных, но подобные случаи в практике крайне редки. Поэтому за основную взята пришедшая из медицинской практики модель индуцированного аутоиммунного снижения S100B у матери и, как следствие, у потомства, поскольку S100B передается через плаценту и молоко. Мы показали, что модель аутоиммунного снижения S100B приводит к появлению у потомства особого фенотипа поведения, так называемый фенотип бесстрашия. Механизм возникновения этого фенотипа до сих пор остается загадкой, поскольку сообщения об изменениях в формировании чувства страха, вызываемом нехваткой S100B, весьма противоречивы. Определённо можно сказать лишь одно – в данном случае нельзя поставить знака равенства между данными, полученными на нокаутных мышах и на потомстве иммунизированных матерей. Есть разрозненные данные о роли S100B в формировании чувства страха. Мы предполагаем, что как Ca^{2+}-связывающий белок, S100B может оказывать влияние на передачу ионов нейротрансмиттерами к структурам мозга, отвечающим за страх и беспокойство, а также метаболизм норадреналина, играющего в этом процессе не последнюю роль. Этот вопрос весьма обширный, и дальнейшие исследования помогут уточнить функции S100B в мозге, а также изучить возможный механизм формирования страха и бесстрашия.

БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Д.И. Козлова[1,2], А.В. Попов[1,3] *[1]ООО «Научно-производственная фирма «АБРИС+»; [2]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН; [3]Санкт-Петербургский государственный технологический институт, Санкт-Петербург, Россия*

Аутоиммунные заболевания (АЗ) – это разнородный по клиническим симптомам класс заболеваний. Симптомы многих АЗ схожи с таковыми у заболеваний, имеющих другую этиологию, что затрудняет их диагностику и лечение. Исследования, дающие возможность диагностировать АЗ с высокой точностью, редко назначают пациентам из-за высокой стоимости и сложной интерпретации результатов, поэтому, важной задачей является поиск биомаркеров и создание доступных тест-систем, позволяющих отделить АЗ от других заболеваний со сходной симптоматикой. Целью нашей работы являлось изучение активности бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) плазмы крови крыс и человека при АЗ. Одним из наиболее распространенных АЗ является сахарный диабет 1-го типа (СД1). Мы провели исследование активности БуХЭ плазмы крови крыс с СД1 (n=15) и СД второго типа (СД2; n=10), а также контрольной группы (К; n=20), которое показало четырехкратное увеличение этого параметра при СД1 (127,2±0,5 пмоль БуТХ/мг/мин; $p<0,005$) относительно К (31,0±0,1). Схожие изменения были зафиксированы нами в плазме крови пациентов с СД1 (n=45; 540,0±31,6 пмоль БуТХ/мг/мин), где уровень активности БуХЭ был в 3 раза выше, чем в группах К (n=30; 185±41,5) и СД2 (n=60). Полученный результат позволил выдвинуть гипотезу о том, что этот критерий может быть использован для отделения АЗ от других патологий. Проведенное с целью проверки этой гипотезы исследование активности БуХЭ плазмы крови пациентов с такими АЗ, как: ревматоидный артрит (РА; n=7; 651,0±30,2) и аутоиммунный тиреоидит (АИТ; n=7; 963,1±56,9), продемонстрировали увеличение ее уровня минимум в 4 раза относительно контрольной группы, как и в случае с СД1. Полученные результаты свидетельствуют о стабильно высоких показателях активности БуХЭ при всех исследованных АЗ, в то время как при метаболической патологии, такой как СД2, они остаются на уровне контроля. Определение данного параметра в плазме крови может быть положено в основу разработки комплексной тест-системы, одной из возможностей которой будет отделение АЗ от других заболеваний со сходной симптоматикой.
Благодарим ФГБУЗ «Санкт-Петербургская клиническая больница Российской академии наук» и ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ за предоставленный материал.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР

Ф.Н. Гильмиярова[1], О.А.Гусякова[1], Н.А. Колотьева[1], В.И. Потехина[1], П.Е. Тимченко[2], Е.В. Тимченко[2]
[1]Самарский государственный медицинский университет Минздрава России; [2]Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева, Самара, Россия

Применение конфокальной микроскопии для изучения и визуализации взаимодействия белковых структур представляет собой новый подход к изучению основ молекулярного метаболизма. Работа посвящена визуализации и оценке влияния минорного компонента метаболизма лактата на процессы межмолекулярного взаимодействия с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Для визуализации использовался конфокальный микроскоп фирмы ANDOR. Объект исследования – молекулярная модель АВО системы крови (патент на изобретение № 2484480 от 10.06.2013). Проводилась реакция гемагглютинации с преинкубацией эритроцитов с лактатом в концентрации 2 ммоль/л в течение пяти минут, контролем служили разведенные гликопротеины А и В без добавления лактата. Оценивались данные конфокальной микроскопии в видимом свете, в режиме лазерной флюоресценции и регистрировалось пространственное распределение пиков флюоресценции. Таким образом, мы визуализировали белок-белковое (антиген-антительное) взаимодействие и количественно оценили изменения, вызываемые лактатом при введении его в экспериментальную систему. Использование естественных интермедиатов в качестве молекулярных зондов позволяет выяснить биологические эффекты данных соединений и характер регулируемых ими молекулярных взаимоотношений. Гликопротеин А обуславливает, вероятно, высокую чувствительность А(II) группы крови к внешним стимулам, что по-видимому, является молекулярной предпосылкой к частому возникновению инфекционных заболеваний у данной группы лиц. Гликопротеин В менее восприимчив к влиянию лактата, что раскрывает молекулярный механизм стабильности В(III) группы крови в восприятии чужеродных веществ и объясняют высокую устойчивость лиц данной группы крови к вирусам и инфекционным агентам. Сведения раскрывают причины индивидуальной реакции на действия факторов экзогенной и эндогенной природы у носителей различных групп крови. Это имеет важное значение для превентивной медицины и способствует более глубокому пониманию процессов рецепции, межмолекулярного узнавания в норме и патологии, в условиях накопления недоокисленных продуктов обмена, а также позволит адекватно состоянию больного оценивать результат лабораторных исследований на базе лигандных технологий.

PARP1, ТЕЛОМЕРЫ И ТЕЛОМЕРАЗА

Н.В. Савельев[1], М.П. Рубцова[1,2], О.И. Лаврик[3], О.А. Донцова[1,2] *[1]Химический факультет и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Сколковский институт науки и технологий, Сколково; [3]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

На концах хромосом всех эукариот присутствуют нуклеотидные повторы (у позвоночных TTAGGG), защищающие хромосомы от деградации в результате недорепликации, а также концевого слипания, – теломеры. Теломеры участвуют в ответе клетки на повреждения ДНК. С теломерами связан белковый комплекс, состоящий из множества белков, – шелтерин, компоненты которого защищают теломеры от узнавания системами репарации, а также привлекают теломеразу, которая удлиняет теломеры в половых, стволовых, а также большинстве раковых клеток. PARP1 – это поли(АДФ-рибоза)-полимераза, которая является одним из ранних сенсоров на повреждения ДНК [1]. Известно, что повышенная экспрессия одного из белков шелтеринового комплекса – TRF1, а также PARP1 наблюдается у пациентов с мышечной дистрофией Дюшена, и это приводит к укорочению теломер [2]. Активность некоторых компонентов шелтеринового комплекса регулируется при помощи парилирования [3]. Теломеры и PARP1 играют важную роль в поддержании целостности генома. Мы получили клеточную линию со сниженной экспрессией гена PARP1 и оценили состояние и структуру теломер, а также функционирование теломеразы. Полученные данные позволяют предположить, что PARP1 регулирует биогенез теломеразы, а именно сборку и стабильность активного фермента, а также делает теломеры более доступными для удлинения. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ грант №14-24-00061*

Литература

1. Ame, J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. The PARP superfamily. Bioessays, 2004. 26(8): p. 882-93.
2. Aguennouz M, Vita GL, Messina S, Cama A, Lanzano N, Ciranni A, Rodolico C, Di Giorgio RM, Vita G. Telomere shortening is associated to TRF1 and PARP1 overexpression in Duchenne muscular dystrophy. Neurobiol Aging. 2011 Dec;32(12):2190-7.
3. PARP1 Is a TRF2-associated Poly(ADP-ribose)polymerase and Protects Eroded Telomeres // Molecular Biology of the Cell Vol. 17, 1686–1696, April 2006

РОЛЬ СТРУКТУРЫ И ТОПОЛОГИИ ПРЕДСКАЗАННЫХ ХОЛЕСТЕРИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ МОТИВОВ В ABCA1, ABCG1 И SR-B1 В ЭФФЛЮКСЕ КЛЕТОЧНОГО ХОЛЕСТЕРИНА

Е.В. Савушкин, Д.Ю. Литвинов, Е.А. Гараева, А.Д. Дергунов
Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины, Москва, Россия

Транспортеры ABCA1, ABCG1 и рецептор SR-B1 играют ключевую роль в эффлюксе холестерина (ХС) из клетки. Механизмы эффлюкса ХС этими белками различны и до конца не известны. Независимо от механизма эффлюкса, ХС-связывающие участки белков могут участвовать в этом процессе. Для обоснования этой гипотезы, для трех белков были выявлены консервативные ХС-связывающие мотивы CRAC (L/V-X1–5-Y-X1–5-R/K) и CCM (R/K-X2-6-I/L/V-X3-W/Y), проанализирована их мембранная топология и проведен *in silico* анализ (1) упорядоченности структуры с использованием предикторов MFD и SPINE-D и (2) влияния одиночных аминокислотных замен из баз данных SNP и HGMD на структуру и активность белков с использованием предикторов PolyPhen-2 и MutPred. В структуре ABCA1 три ХС-связывающих мотива (CCM1, CRAC4, CRAC11) локализованы в трансмембранных спиралях. Эти мотивы могут участвовать в связывании ХС в отсутствие больших структурных изменений спиральных участков. Пять ХС-связывающих мотивов (CRAC5, CRAC6, CRAC8, CRAC12, CCM3) примыкают или локализованы в участках молекулярного узнавания (MoRF). В структуре ABCG1 два ХС-связывающих мотива (CRAC7, CRAC8) перекрываются с шестой трансмембранной спиралью. Аминокислотные замены в CRAC7 не влияют на стабильность структуры и эффективность молекулярного узнавания. Второй мотив CRAC8 может взаимодействовать с «активным» ХС на границе раздела фаз. Мотив CRAC3 локализован в области выраженного нарастания разупорядоченности и замена R339Q приводит к снижению эффективности молекулярного узнавания. В структуре SR-B1 все шесть ХС-связывающих мотивов локализованы вне трансмембранных спиралей. Участок молекулярного

узнавания MoRF2 перекрывается с CCM4 и замена I406T приводит к возрастанию неупорядоченности. Мотив CCM3 локализован в высокоупорядоченной области, однако замена H232R приводит к увеличению эффективности молекулярного узнавания вследствие разупорядочивающего влияния остатка аргинина. Для всех трех белков выявлена вовлеченность аргининовых остатков при связывании холестерина внутри участков молекулярного узнавания. Предположена роль ХС-связывающих мотивов с различной локализацией – внутримембранной, на границе мембрана-вода и в водной фазе – в транспорте различающихся пулов холестерина для ABCA1 и ABCG1.

БЕЛОК Mcl-1 – РЕГУЛЯТОР ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К АПОПТОТИЧЕСКИМ СТИМУЛАМ

В.В. Сеничкин, Г.С. Копеина, И.Н. Лаврик, Б.Д. Животовский
Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Семейство белков Bcl-2 объединяет более 20 представителей. Большинство из них вовлечены в регуляцию процесса апоптоза – программируемой клеточной гибели. При этом указанные белки могут выполнять либо проапоптотическую, либо антиапоптотическую функцию. Одним из важнейших антиапоптотических белков семейства Bcl-2 является Mcl-1. Данный белок имеет ряд уникальных особенностей, отличающих его от других белков семейства Bcl-2. В частности, Mcl-1 характеризуется очень коротким временем полужизни (примерно 40 минут) из-за тонкой регуляции на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях. В ходе нашего исследования было показано, что цитотоксическое действие ДНК-повреждающего агента цисплатина на опухолевые клетки усиливается при удалении сыворотки из культуральной среды. Данный эффект сопровождался быстрым падением уровня белка Mcl-1 в обеих исследуемых опухолевых линиях – клетках карциномы яичника Caov-4 и карциномы шейки матки HeLa. Было показано, что Mcl-1 подвергается протеасомной деградации, которая, однако, наблюдалась независимо от наличия сыворотки в среде. Также было продемонстрировано, что падение уровня Mcl-1 не зависит от активности каспаз – основных ферментов, ответственных за запуск и активную фазу апоптоза. В качестве возможного механизма снижения уровня Mcl-1 в ответ на удаление сыворотки из среды был проанализирован уровень мРНК исследуемого белка. В отсутствие сыворотки наблюдалось значительное уменьшение количества мРНК белка Mcl-1. Таким образом, в рамках данной работы показана роль снижения уровня белка Mcl-1 в усилении апоптоза опухолевых клеток. Было показано, что удаление сыворотки из среды регулирует уровень Mcl-1 через подавление транскрипции.

НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ L-ТИПА СЕНСОРОМ STIM1 ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

К.В. Скобелева, М.А. Суслова, М.А. Рязанцева, Е.В. Казначеева *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

Большая часть мутаций, ассоциированных с наследственной болезнью Альцгеймера (НБА), обнаружена в гене белка пресенилин-1 (PS1). У пациентов с НБА и в мышиных моделях было обнаружено нарушение кальциевого гомеостаза. Одной из ассоциированных с НБА мутаций является PS1 M146V. В клетках, экспрессирующих PS1 M146V нарушено депонирование кальция эндоплазматическим ретикулумом (ЭР). В норме опустошение кальциевых депо приводит к перемещению кальциевого сенсора STIM1 к плазматической мембране (ПМ), где STIM1 активирует депо-управляемые кальциевые каналы и блокирует активность потенциал-управляемых кальциевых каналов L- и T-типа. Мы показали, что в клетках, несущих мутантный PS1 M146V, перемещение сенсоров STIM1-YFP к ПМ снижено по сравнению с контрольными клетками. Мы предположили, что изменение динамики перемещения STIM1 в модельных клетках НБА повлияет на активность потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа. Для проверки этой гипотезы мы исследовали потенциал-управляемый вход кальция в нейронах с предварительно опустошенными кальциевыми депо. Потенциал-управляемые кальциевые каналы активировали заменой омывающего нейроны раствора на деполяризирующий раствор с 140 мМ KCl. Опустошение кальциевых депо ЭР осуществляли с помощью ингибитора кальциевой АТФазы ЭР. В нейронах гиппокампа с предварительно опустошенными депо ЭР вход кальция в ответ на деполяризацию был значительно снижен. При этом подавление экспрессии STIM1 с помощью shRNA двукратно увеличивало вход кальция в ответ на деполяризацию, но не в присутствии ингибитора потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа. Таким образом, мы убедились, что сенсор STIM1 регулирует активность каналов L-типа в нейронах гиппокампа мыши. В нейронах гиппокампа с PS1 M146V при опустошении депо вход кальция через каналы L-типа был значительно выше, чем в контрольных, но при подавлении экспрессии STIM1 увеличивался лишь на 20%. В данной работе было продемонстрировано, что в нейрональной модели наследственной болезни Альцгеймера нарушена регуляция активности потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа кальциевыми сенсорами STIM1.
Работа поддержана грантами РФФИ №16-04-01125, а также РНФ №14-14-00720.

ТРИПЕПТИДНЫЕ АНАЛОГИ ХЛОРАМФЕНИКОЛА

А.Г. Терещенков[1], И.А. Остерман[2], Н.В. Сумбатян[2], А.А. Богданов[1,2]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского; [2]Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

При биосинтезе белка рибосомой растущая полипептидная цепь, проходя через рибосомный туннель, может вступать во взаимодействия с образующими его стенки нуклеотидами, регулируя таким образом процесс трансляции. Исследование подобных явлений на молекулярном уровне затруднено вследствие высокой динамичности системы. Однако использование низкомолекулярных зондов, представляющих собой конъюгаты пептидов и антибиотиков, прочно связывающихся с рибосомой, делает возможным изучение специфических взаимодействий между аминокислотными остатками пептидной цепи и стенками рибосомного туннеля. В случае антибиотика хлорамфеникола замена в его структуре дихлорацетильного остатка на пептид позволяет направить его в сторону рибосомного туннеля, подобно растущей полипептидной цепи, в то время как оставшаяся часть соединения служит в качестве «якоря», удерживающего молекулу в А-сайте пептидилтрансферазного центра [1]. С учетом возрастающей опасности бактериальной резистентности, подобные аналоги антибиотиков, способные взаимодействовать с различными функциональными сайтами рибосомы, могут представлять интерес как потенциальные антибактериальные препараты. С целью поиска возможных взаимодействий между аминокислотными остатками пептидов и элементами рибосомного туннеля в настоящей работе был проведен виртуальный скрининг методом молекулярного докинга всех возможных трипептидных аналогов хлорамфеникола, позволяющий выявить их способность связываться в рибосомном

туннеле. В результате были отобраны соединения, обладающие наибольшей аффинностью к рибосоме, осуществлен синтез конъюгатов хлорамфениколамина с трипептидами FWH, VFR, RAW, AAA как со свободными N-концевыми аминогруппами, так и защищенными ацетильной группой. Для экспериментальной оценки констант диссоциации комплексов синтезированных соединений с рибосомой использовался метод конкурентного вытеснения флуоресцентно-меченного эритромицина из его сайта связывания в рибосомном туннеле. Способность трипептидных аналогов хлорамфеникола ингибировать пептидилтрансферазную реакцию была проверена как в бесклеточной системе трансляции *in vitro*, так и на бактериальных клетках *E. coli*. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-04-00709) и РНФ (грант № 14-24-00061-П).*

Литература

1. Mamos P. et al., Biochimie, 2013, 95: 1765-72.

ВЛИЯНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ НА АКТИВАЦИЮ КОМПЛЕМЕНТА

Е.С. Умнякова[1], М.Н. Берлов[1,2], Т.В. Овчинникова[3], В.Н. Кокряков[1,2] *[1]Институт экспериментальной медицины; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; [3]Институт биоорганической химии, Москва, Россия*

Система комплемента является важным гуморальным звеном врожденного иммунитета. Она представлена белками плазмы, которые последовательно активируют друг друга в результате ограниченного протеолиза, что приводит к опсонизации патогенов, образованию хемоаттрактантов и лизису патогенных клеток мембрано-атакующим комплексом (МАК). Участвуя в воспалительных и репарационных процессах, комплемент помогает поддерживать иммунный гомеостаз в организме. Однако, если работа этой системы нарушена, могут возникать патологические процессы в различных тканях и органах. В этой связи поиск веществ, которые могут регулировать активность комплемента, является важной задачей. В литературе описывается влияние антимикробных пептидов (АМП) на активность комплемента за счет взаимодействия пептидов с рецепторными молекулами системы комплемента (C1q, MBL). Мы изучали белок-пептидные взаимодействия C1q с АМП беспозвоночных: ареницином-1 (Ar-1) из целомоцитов пескожила *Arenicola marina* и тахиплезином-1 (Tach 1) из мечехвоста *Tachypleus tridentatus*. Оба пептида имеют структуру бета-шпильки, стабилизированной дисульфидными связями. Чтобы оценить способность C1q взаимодействовать с АМП, мы использовали иммуноферментный (ИФА) и рецепторно-ферментный анализы (РФА), а также метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Мы также оценивали эффекты Ar-1 и Tach 1 на активацию комплемента с помощью антитело-зависимого гемолиза эритроцитов барана и продукцией C3a, определяемой с помощью ИФА. В качестве источника комплемента использовалась сыворотка здоровых доноров. С помощью ИФА, РФА и ППР мы показали взаимодействие Ar-1 с C1q и подтвердили литературные данные о взаимодействии Tach 1 с белком C1q. В гемолитических тестах Ar-1 и Tach 1 активировали комплемент в концентрациях 25–50 мкг/мл, но при концентрации 200 мкг/мл эти пептиды полностью ингибировали комплемент-зависимый гемолиз. Существует положительная корреляция между этими данными и концентрациями C3a в той же самой тестовой системе, которые были определены с помощью ИФА. Важно отметить, что пептиды в описанных концентрациях не проявляли цитотоксичности.

БТШ70 СНИЖАЕТ ЛОКАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ПРОДУКЦИИ ИЛ-4, ОКАЗЫВАЕТ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА НЕЙТРОФИЛ/ЭОЗИНОФИЛЬНЫЙ БАЛАНС И ПРЕДОТВРАЩАЕТ РАЗВИТИЕ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЕ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

А.С. Федорина, Е.А. Сервули, К.С. Бондаренко, Е.Н. Чурсанова, Е.Л. Болховитина, А.М. Сапожников, М.А. Шевченко
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Внеклеточный уровень белка теплового шока 70 кДа (БТШ70) значительно повышен в острой фазе аллергического воспаления дыхательных путей. Такое увеличение секреции БТШ70 способствует разрешению воспаления, однако механизм протективного действия не известен. В данной работе мы исследуем эффект БТШ70 на уровень интерлейкина-4 (ИЛ-4) в бронхоальвеолярном лаваже и рекрутирование нейтрофилов в процессе развития аллергического воспаления в легких. *In vivo* эксперименты проводили с использованием мышей линии BALB/c и хорошо охарактеризованную овальбумин-индуцированную модель аллергической астмы, состоящую из многократных инъекций и ингаляций низких доз овальбумина. Для исследования эффекта БТШ70 на секрецию lL-4 и приток нейтрофилов мышам в острой фазе аллергического воспаления – через 24 часа после последней ингаляции аллергена, орофарингеально вводили БТШ70. Долю нейтрофилов в бронхоальвеолярном лаваже определяли при помощи проточной цитометрии. Уровень ИЛ-4 и БТШ70 в лаважной жидкости измеряли при помощи ИФА. У мышей с индуцированным воспалением дыхательных путей значительно повышалось общее количество клеток в бронхоальвеолярном лаваже, в основном эти клетки были представлены эозинофилами. Нейтрофилы присутствовали в лаважных смывах мышей с индуцированным аллергическим воспалением только в острой фазе – 4–12 часов после последней ингаляции аллергена, на более поздние сроки нейтрофилы замещались эозинофилами. Уровни ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13 в лаважных смывах были значительно повышены, что характерно для аллергического воспаления дыхательных путей. Орофаренгиальное введение БТШ70 в острой фазе воспаления приводило значительному снижению уровня ИЛ-4. При этом наблюдали перераспределение клеточного состава бронхоальвеолярного лаважа в пользу нейтрофилов, значительно снижалось количество эозинофилов и общее количество клеток. В дыхательных путях. Эффект сохранялся до 72 часов после последней ингаляции аллергена. Одновременно наблюдалось значительное снижение уровня ИЛ-4. Таким образом, введение БТШ70 в острой фазе аллергического воспаления оказывает влияние на приток нейтрофилов путем снижения уровня секреции ИЛ-4.

ЗНАЧЕНИЕ ТРИПТОФАНОВЫХ ОСТАТКОВ ДЛЯ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛИЗИН-ЗАМЕЩЕННОГО АНАЛОГА ГРАМИЦИДИНА А

А.М. Фирсов[1,2], С.И. Ковальчук[3], Е.А. Котова[1], Ю.Н. Антоненко[1]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и [2]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

Ранее в нашей лаборатории было показано, что некоторые катионные аналоги пентадекапептида грамицидина А (gA) способны формировать в липидной мембране поры большого диаметра, проницаемые для таких красителей как кар-

боксифлуоресцеин и сульфородамин Б. Согласно модели, предложенной и обоснованной в работе [Antonenko et al., Phys.Chem.Chem.Phys., 2015], в случае пептида [Lys3]gA, отличающегося от обычного gA заменой аланина в положении 3 на лизин, пора формируется агрегатом из пяти субъединиц, каждая из которых представляет собой димер грамицидина в виде двойной спирали. Было предположено, что важную роль в формировании такой поры играют катион-π взаимодействия между остатками лизина и триптофана в пептиде. В настоящей работе синтезированы и изучены аналоги [Lys3]gA с одиночными, двойными и тройными заменами триптофанов в положениях 9, 11, 13, и 15 на изолейцины. Для оценки порообразующей активности проведены измерения пермеабилизации липосом по вытеканию флуоресцентного красителя кальцеина под действием данных пептидов. Кроме того, измерены спектры триптофановой флуоресценции пептидов в присутствии липосом, позволившие судить о глубине расположения триптофанов в мембране. Замена любого из триптофановых остатков [Lys3]gA на изолейцин приводила к подавлению порообразующей активности пептида, причем эффект существенно зависел от положения триптофанов в последовательности. Так, пептид с одиночной заменой триптофана в 13-ом положении проявлял гораздо меньшую активность, чем аналоги [Lys3]gA с одиночными заменами в 9-ом, 11-ом или 15-ом положениях. Из пептидов с двойными заменами наиболее сильное подавление вытекания кальцеина наблюдалось при замене триптофанов в 13-ом и 15-ом положениях. В случае тройных замен, когда заменялись все триптофановые остатки, кроме одного, наибольшую активность проявлял пептид, сохраняющий триптофан в 11-ом положении. Согласно полученным спектральным данным, триптофановые остатки в 9-ом и 11-ом положениях наиболее глубоко погружены в гидрофобную толщу мембраны. Сделан вывод о том, что триптофановые остатки в 11-ом и 13-ом положениях вносят наибольший вклад в стабилизацию поры в мембране, тогда как триптофан в положении 9 не так существенен для формирования поры. *Работа поддержана грантами РФФИ №15-04-01755 и №16-34-00088.*

СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ УЧАСТИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ФОРМИРОВАНИИ БЕЛКОВОГО ИНТЕРАКТОМА

А.В. Флоринская, П.В. Ершов, Ю.В. Мезенцев, О.В. Гненденко, Л.А. Калужский, Е.О. Яблоков, О.А. Бунеева, В.Г. Згода, А.Е. Медведев, А.С. Иванов *Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия*

Становится все более очевидным, что основная масса белков в живых системах функционирует не изолированно, а в составе разнообразных белковых комплексов – интерактомов. В связи с этим разработка новых экспериментальных подходов к системному анализу белковых интерактомов и особенностям их функционирования в норме и при патологии представляет важную проблему молекулярной биологии и медицины.

В пилотном эксперименте проверена применимость нового экспериментального подхода к идентификации стабильных нативных белковых комплексов живых систем. Данный подход основан на сочетании гель-хроматографического фракционирования биологического материала с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков во фракциях и биоинформатическим анализом полученных результатов. При фракционировании лизата ткани печени в шести выбранных фракциях обнаружен 981 белок, что составляет около 40% от общего количества известных белков этого органа. Анализ их распределения по фракциям показал, что помимо белков, молекулярная масса которых соответствует средней молекулярной массе фракции, во всех фракциях присутствует много белков с гораздо меньшей массой. Их присутствие обусловлено формированием комплексов, молекулярная масса которых соответствует средней молекулярной массе данных фракций. Часть таких белков специфически взаимодействует с эндогенным регулятором изатином, присутствие которого в лизате влияло на комплексообразование и распределение ряда белков по фракциям. Всю совокупность идентифицированных белков можно разделить на 4 группы в зависимости от их профиля распределения по фракциям: (1) одиночные белки в мономолекулярном состоянии, которые не участвуют в формировании белкового интерактома; (2) белки в виде гомодимеров или гетеродимеров с соразмерными с ними партнерами; (3) белки, находящиеся частично в мономерном состоянии, частично – в составе различных белковых комплексов; (4) белки, не существующие в свободной мономерной форме, а находящиеся только в составе сложных комплексов с числом субъединиц 3 и более. *Работа поддержана РФФИ (гранты 16-04-00057 и 15-04-01545).*

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПЕПТИД ЛАКТАПТИН. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КЛЕТКАМИ

О.А. Чинак[1], А.В. Шернюков[2], Е.А. Голубицкая[1], И.А. Пышная[1], О.А. Коваль[1], Е.В. Кулигина[1], В.А. Рихтер[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [2]Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

Лактаптин – фрагмент к-казеина молока человека, индуцирующий апоптоз раковых клеток в культуре и не влияющий на жизнеспособность нетрансформированных клеток. Ранее мы показали, что лактаптин эффективно проникает в клетки человека частично по пути рафт-зависимого пиноцитоза (преимущественно кавеолин-зависимого) и частично по механизму прямого проникновения через плазматическую мембрану. Такой механизм – непосредственное пересечение плазматической мембраны – описан для пептидов класса CPP (Cell-penetrating Peptides), известных своей способностью доставлять в клетки связанные с ними молекулы. Целью данной работы является исследование структуры лактаптина и его способности обеспечивать доставку нуклеиновых кислот в клетки человека. Согласно литературным данным первичная структура CPP включает большое количество положительно заряженных и, часто, ароматических аминокислот, что позволяет этим пептидам эффективно связываться с поверхностью клеток. Аминокислотная последовательность лактаптина также обогащена ароматическими аминокислотными остатками и аминокислотами, несущими положительный заряд. При исследовании вторичной и третичной структуры лактаптина методами КД- и ЯМР-спектроскопии было показано, что в водной среде лактаптин является нестрого упорядоченным пептидом. В гидрофобном трифторэтаноле, в первом приближении моделирующем цитоплазматическую мембрану, происходит упорядочивание структуры пептида, в частности, доля α-спиралей в структуре увеличивается на 10%. Такое изменение структуры пептида в зависимости от окружения описано и для пептидов класса CPP, что, как полагают, и позволяет им проникать через липидные мембраны клеток. Таким образом, полученные данные о структуре и механизме проникновения лактаптина в клетки позволяют заключить, что этот пептид может быть отнесён к классу CPP. Способность лактаптина доставлять нуклеиновые кислоты в клетки исследовали, используя плазмиду, экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок EGFP. Методом флуоресцентной микроскопии показано, что клетки, трансформированные нековалентным комплексом лактаптина с плазмидой, экспрессируют EGFP, что говорит в пользу того, что лактаптин обеспечивает доставку плазмидной ДНКв клетках. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 14-14-00922.*

ПРЕДСТАЦИОНАРНЫЙ КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ АПУРИНОВОЙ-АПИРИМИДИНОВОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ЧЕЛОВЕКА APE1 НА АКТИВНОСТЬ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ

Д.А. Яковлев[1], О.А. Кладова[1], О.С. Федорова[1,2], Н.А. Кузнецов[1,2] *[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Для эффективного протекания репарации поврежденных оснований в ДНК необходимо последовательное согласованное действие ДНК-гликозилаз и апуриновой-апиримидиновой (АР) эндонуклеазы. Известно, что АР-эндонуклеаза человека APE1 повышает активность ряда ДНК-гликозилаз: UNG, OGG1, MYH, TDG и AAG. Однако детальный молекулярный механизм стимуляции ДНК-гликозилаз АР-эндонуклеазой все еще неизвестен. В связи с этим, основной целью данной работы являлось выяснение природы активации ДНК-гликозилаз эндонуклеазой APE1. Для этого методом остановленной струи был проведен кинетический анализ взаимодействия двух ДНК-гликозилаз человека OGG1 и MBD4 с модельными ДНК-субстратами в присутствии и в отсутствие APE1. Стадии связывания модельных ДНК-дуплексов и последующих каталитических реакций регистрировали по изменению сигнала резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Полученные данные свидетельствуют о том, что, скорее всего, активация ДНК-гликозилаз происходит в результате образования тройного комплекса ДНК-гликозилаза–APE1–ДНК. *Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (№№. 16-04-00037 и 15-04-00467). Исследования предстационарной кинетики MBD4 поддержаны Российским научным фондом (грант № 16-14-10038).*

УЧАСТИЕ БЕЗ ДОКЛАДА

МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ БЕЛОК YB-1 КАК НОВАЯ МИШЕНЬ И РЕГУЛЯТОРНЫЙ ФАКТОР ПРОЦЕССА ПОЛИ(АДФ-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ

Е.Э. Алемасова[1], К.Н. Науменко[2], О.И. Лаврик[1,2] *[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Поли(АДФ-рибоз)илирование – это посттрансляционная модификация белков молекулой «третьей нуклеиновой кислоты» – поли(АДФ-рибозы) (PAR), играющая ключевую роль в регуляции репарации ДНК эукариот. Большая часть PAR клетки синтезируется ферментом поли(АДФ-рибозо) полимеразой 1 (PARP1) при взаимодействии с повреждённой ДНК. Посредством ковалентной модификации полимером PAR и/или нековалентного связывания с поли(АДФ-рибозой) осуществляется регуляция локализации и функций белков, вовлечённых в процесс репарации ДНК, а также ремоделинг хроматина, необходимый для освобождения сайта повреждения. Являясь центральным регуляторным звеном репарации ДНК на различных уровнях, PARP1 выступает в качестве одной из наиболее перспективных мишеней противоопухолевой терапии. В настоящее время основной проблемой на пути лечения онкозаболеваний служит развитие резистентности клеток опухоли к химиопрепаратам и, в частности, к ингибиторам PARP1. Для понимания фундаментальных механизмов этого явления необходимо установление внутриклеточных эффекторов, способных повышать активность PARP1. Мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) ранее был предложен в качестве онкомаркёра, так как содержание этого белка повышено в опухолевых клетках и часто коррелирует с возникновением их устойчивости к химиотерапии. Нами было исследовано взаимодействие YB-1 и PARP1 в процессе поли(АДФ-рибозил)ирования. Было установлено белок-белковое взаимодействие между YB-1 и PARP1, а также показано формирование тройного комплекса этих белков с повреждённой ДНК. Впервые показано поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1, модулирующее ДНК-связывающие свойства этого белка. Установлена способность поли(АДФ-рибозы) конкурировать с ДНК и РНК за связывание YB-1, а также роль PAR-связывающей активности YB-1 в защите полимера PAR от деградации ферментом поли(АДФ-рибозо) гликогидролазой PARG. Открыта способность YB-1 стимулировать активность PARP1, в том числе, в отсутствие ионов магния и в присутствии ингибиторов PARP1. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (14-24-00038) и стипендии Президента РФ для молодых учёных и аспирантов.*

ХРОМОФОРЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ: ОТ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХРОМОФОРЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ: ОТ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ К ПОИСКУ НОВЫХ ФЛУОРОФОРОВ ДЛЯ ЖИВЫХ СИСТЕМ

М.С. Баранов, Н.С. Балеева *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Начиная с девяностых годов прошлого столетия, флуоресцентные белки (ФБ) стали объектом пристального внимания исследователей всего мира. Множество таких белков было найдено в природе, однако большее их количество было получено искусственным путем [1]. Оптические свойства этих белков определяются так называемым хромофором (арилиден-имидазол-5(4H)-он) – соединением, образующимся из трех аминокислотных остатков за счет внутримолекулярной конденсации и окисления. Существенное влияние на свойства этого хромофора оказывает второй аминокислотный остаток, роль которого во всех природных ФБ играет тирозин. Однако его искусственная замена на другие аминокислоты приводит к существенному расширению спектрального разнообразия. Не меньшее влияние на свойства ФБ оказывают также происходящая естественным путем модификация боковой цепи хромофора, которая приводит к образованию ряда красных и оранжевых белков. Синтез модельных хромофоров различных ФБ позволил разобраться в особенностях их строения и пролить свет на механизмы созревания. Однако также было установлено, что в отсутствии белкового окружения все эти соединения совершенно не флуоресцентны. В ходе нашей работы мы показали, что практически во всех случаях данный феномен объясняется конформационной подвижностью арилиденовой части хромофора. С помощью предложенной нами реакции борирования, нами были созданы конформационно-фиксированные и высокофлуоресцентные аналоги хромофоров белков GFP [2], CFP [3], Sirius [3], а также Kaede [4]. Дальнейшая модификация позволила нам создать целое семейство красителей [4,5], которые могут быть использованы в роли флуоресцентных маркеров для окрашивания заданных молекул-мишеней [6], а также в роли различных сенсоров [7,8].

Литература

1. Chudakov D. M. et al // Physiol Rev. 2010, 90, 1103-1163
2. Baranov M.S. et al // J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 6025-6032.

3. Baleeva N.S. et al // Tetrahedron Lett. 2016, 11. 3043-3045.
4. Baleeva N.S. et al // Eur. J. Org. Chem. 2015, 26, 5716-5721.
5. Baranov M.S. et al // Chemistry – A European Journal. 2014, 20, 13234-13241.
6. Frizler M. et al // Org. Biomol. Chem. 2013, 11, 5913-5921.
7. Olsen S.C. et al

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ХРОМОФОРНЫХ ГРУПП РЕТИНАЛЬ-СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ НА ИХ СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Н.Е. Беликов[1], О.В. Демина[1], Л.Е. Петровская[2], В.В. Чупин[3], А.Ю. Лукин[4], П.П. Левин[1], Д.В. Соловьев[3], I. Chizhov[5], А.Н. Шумский[1], С.Д. Варфоломеев[1], А.А. Ходонов[1]

[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [3]Московский физико-технический институт, Долгопрудный; [4]Московский технологический университет, Москва, Россия; [5]Institute for Biophysical Chemistry, Hannover Medical School, Hannover, Germany

Известен целый ряд ретиналь-содержащих белков – бактериородопсин, галородопсин, ксантородопсин, зрительные пигменты, недавно открытый тундрародопсин, а также ядерные рецепторы ретиноевой кислоты, для которых изомеры ретиноидов, как хромофорные группы, необходимы в процессе их функционирования. Изомеризация определенной двойной связи в хромофорной группе вследствие абсорбции кванта света вызывает каскад событий, приводящих к генерации химического или физиологического ответов. В процессе эволюции это свойство ретиноидов стало основой для трансформации энергии кванта света в физиологические ответы у микроорганизмов и высших животных. Хромофорные группы связаны с апобелками через протонированную альдиминную связь с ε-аминогруппой остатка Lys. Для исследования взаимосвязи структура – функции в ретиналь-содержащих белках был разработан ряд новых спектральных и химических методов. Одним из наиболее перспективных из них является исследование свойств искусственных пигментов, полученных из природных апобелков и модифицированных аналогов хромофорной группы.

Объектами настоящего исследования являлись новый уникальный протеородопсин – тундрародопсин (ESR) из психотрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* [1], и хорошо изученный бактериородопсин из экстремального галофила *Halobacterium salinarum*. Нами были использованы следующие типы модификации природного *all-E*-ретиналя: аналоги, модифицированные по кольцу – 4-оксоретиналь, 3,4-дидегидроретиналь и 5,6-дигидро-5,6-эпоксиретиналь; аналоги, модифицированные по полиеновой цепи – 13-дезметилретиналь, аналоги с измененной длиной полиеновой цепи – C25, C22, C15; а также ациклическое производное ретиналя (без иононового кольца).

Для определения различий в механизме функционирования тундрародопсина нами было проведено сравнительное изучение влияния различных типов модификации хромофорных групп, различающихся по электронным и конформационным свойствам, на спектральные свойства пигментов. *Работа была частично поддержана грантом РФФИ (проект № 16-04-01264а).*

Литература

1. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A., FEBS Letters, 2010, 584 (19), 4193.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДНК-ЛИГАЗЫ IIIA С ОСНОВНЫМИ БЕЛКАМИ-ПАРТНЕРАМИ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ТИТРОВАНИЯ

И.А. Васильева[1], М. Чжао[2], Н.А. Моор[1,2], О.И. Лаврик[1,2] *[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Процесс эксцизионной репарации оснований ДНК (ЭРО) координируется взаимодействием ферментов друг с другом и с регуляторными белками. Ранее нами было показано, что XRCC1 и ДНК-полимераза β (Polβ) образуют самый прочный комплекс, являющийся основой для сборки мультибелкового ансамбля, функционирующего в процессе ЭРО по короткозаплаточному пути и обеспечивающего наиболее эффективную репарацию ДНК [1]. ДНК-лигаза IIIα и Polβ взаимодействуют с С- и N-концевыми доменами XRCC1, соответственно, и их сайты взаимодействия не перекрываются с сайтами связывания других участников ЭРО, в том числе ферментов, инициирующих процесс репарации. В данной работе мы впервые количественно охарактеризовали взаимодействие рекомбинантной формы ДНК-лигазы IIIα человека с основными её партнерами в ЭРО – XRCC1 и Polβ в отсутствие и присутствии ДНК, имитирующих интермедиаты разных стадий ЭРО, методами флуоресцентного титрования и резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Меченые флуоресцеином и тетраметилродамином функционально активные белки получены в условиях преимущественной модификации N-концевой аминогруппы по специально отработанной методике. С помощью метода прямого флуоресцентного титрования измерена равновесная константа гомоолигомеризации ДНК-лигазы IIIα. Показано, что белок существует в основном в форме гомодимера. С помощью метода FRET зарегистрировано не опосредованное ДНК взаимодействие ДНК-лигазы IIIα с Polβ и определено донорно-акцепторное расстояние между N-концевыми группами ферментов в комплексе друг с другом. Измерены равновесные константы диссоциации комплексов ДНК-лигазы IIIα с модельными ДНК, имитирующими интермедиаты разных стадий ЭРО. Фермент не проявляет существенной избирательности в отношении поврежденной и не поврежденной ДНК в отсутствии белков-партнеров. С помощью FRET анализа зарегистрированы структурные перестройки двойного комплекса ДНК лигазы IIIα с ДНК с однонуклеотидной брешью только в присутствии потенциальных парнеров Polβ и XRCC1. Результаты указывают на возможную роль динамических взаимодействий Polβ и XRCC1 с ДНК лигазой IIIα в регуляции ЭРО. *Работа выполнена в рамках проекта РНФ 14-24-00038. КП СО РАН, № II.2П/VI.57-4.*

Литература

1. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Antson A.A., Lavrik O.I., Nucleic Acids Res., 2015, 43, 6009-6022.

РЕГУЛЯЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА И АКТИВНОСТИ КАСПАЗЫ-2 АПОПТОТИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ EndoG

Д.Д. Жданов, М.В. Покровская, С.С. Александрова, Ю.А. Гладилина, Н.Н. Соколов
Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Каспаза-2 (Casp-2), фермент регулирующий развитие апоптотических процессов в клетке, подвергается альтернативному сплайсингу, что приводит к потере его каталитической активности. Механизм альтернативного сплайсинга мРНК Casp-2 изучен недостаточно полно, однако, известно участие апоптотических эндонуклеаз в регуляции активности Casp-2. Целью данной работы явилось изучение связи EndoG и Casp-2 и роли EndoG в регуляции альтернативного сплайсинга Casp-2 в Т лимфоцитах человека. Обнаружена корреляция экспрессии EndoG и сплайс-форм Casp-2 в CD4+ и CD8+ Т лимфоцитах человека. Данная корреляция усиливалась при инкубации клеток с ДНК повреждающим агентом этопозидом, который индуцирует экспрессию EndoG. Корреляция была выше в CD4+ Т клетках, поэтому данные клетки трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP. Повышение экспрессии Casp-2S сплайс-варианта обнаружено при сверхэкспрессии EndoG в CD4+ Т клетках, при обработке клеточной цитоплазмы и ядер рекомбинантной EndoG, а также при инкубации ядер с переваренной рекомбинантной EndoG РНК. Альтернативный сплайсинг Casp-2 индуцировался 60-членным РНК-олигонуклеотидом в изолированных клеточных ядрах и при трансфекции клеток. Идентифицирована длинная не кодирующая РНК размером 1016 основания, из которой образуется активный РНК-олигонуклеотид. На основании полученных результатов предложен следующий механизм сплайсинга мРНК. С кодирующей цепи гена Casp-2 синтезируется пре-мРНК, а с матричной цепи синтезируется длинная не кодирующая РНК. EndoG вырезает из длинной не кодирующей РНК 60-членный РНК-олигонуклеотид, комплементарный пре-мРНК Casp-2 в месте соединения экзона 9 и интрона 9, взаимодействие которых вызывает индукцию альтернативного сплайсинга.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ У АГУТИ-МЫШЕЙ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ МЕТФОРМИНОВОЙ ТЕРАПИИ

И.И. Зорина, И.О. Захарова, К.В. Деркач, Л.В. Баюнова, И.В. Романова, В.М. Бондарева, А.О. Шпаков
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Агути-мыши (Ay/a) представляют собой модель генетически-обусловленного ожирения и характеризуются гиперпродукцией агути-сигнального пептида, подавляющего активность меланокортиновых рецепторов 4-го типа (МК4Р). Снижение активности МК4Р в гипоталамических нейронах приводит к гиперфагии и ожирению. Одним из подходов для лечения ожирения и часто ассоциированного с ним метаболического синдрома является использование метформина (МФ), основной мишенью которого является АМФ-зависимая протеинкиназа (AMPK). В настоящее время данные о функциональном состоянии гипоталамических нейронов и их регуляции гормонами и нейротрансмиттерами у агути-мышей в настоящее время отсутствуют. Не изучено и влияние на них МФ. Цель работы состояла в исследовании сигнальных путей, которые регулируют глюкозный гомеостаз, активности AMPK, факторов апоптоза и белков, вовлеченных в биогенез митохондрий, в гипоталамических нейронах агути-мышей, и в исследовании влияния на них обработки МФ (9 суток, 200 мг/кг/сут). Показано, что у агути-мышей повышена масса тела, нарушена толерантность к глюкозе, повышены уровни глюкозы и инсулина. В гипоталамусе агути-мышей отмечали повышение экспрессии генов для анорексигенных факторов (про-опиомеланокортин, POMC), снижение экспрессии генов для орексигенных факторов (нейропептид Y, агути-подобный пептид), повышение экспрессии генов, кодирующих МК3Р и серотониновый рецептор 1В-подтипа, и снижение соотношения дофаминовых рецепторов 1-го и 2-го типов. Наряду с этим, ослаблялись лептиновые сигнальные пути, на что указывает снижение фосфорилирования Akt-киназы, и усиливались митохондриальная динамика и апоптотические процессы. Обработка МФ снижала массу тела, улучшала толерантность к глюкозе, нормализовала экспрессию POMC и митохондриальную динамику, восстанавливала лептиновый сигналинг. Активность AMPK в контроле и у агути-мышей различалась незначительно, в то время как обработка МФ приводила к ослаблению механизмов, вовлеченных в негативную регуляцию фермента. Таким образом, выявлены нарушения функций и гормональной чувствительности гипоталамических нейронов у агути-мышей, которые могут быть ответственны за развитие ожирения, и показано восстановление некоторых из них при обработке животных МФ. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 16-15-10388).*

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА MICA СРЕДИ ЗДОРОВОГО НАСЕЛЕНИЯ РОССИИ И У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Л.М. Каневский[1], Е.В. Абакушина[2], Е.Г. Кузьмина[2], Т.Ю. Мушкарина[2], А.А. Спелков[1], М.А. Стрельцова[1], Е.И. Коваленко[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского радиологического центра, Обнинск, Россия

При опухолевой трансформации клетки нередко наблюдается индукция поверхностной экспрессии белка MICA. Натуральные киллеры (NK-клетки) способны распознавать экспрессирующие MICA клетки с помощью рецептора NKG2D, что приводит к активации NK-клеток и уничтожению трансформированных клеток. Ген MICA отличается высоким полиморфизмом: к настоящему времени описано 87 аллелей MICA, продукты которых различаются по аффинности к NKG2D, уровню поверхностной экспрессии, способу закрепления в мембране и ряду других параметров. Вследствие столь высокого разнообразия аллелей клетки различных индивидов различаются по способности активировать NK-клетки, что, в свою очередь, может влиять на развитие и протекание онкологических заболеваний. В работе представлены предварительные данные по распределению аллелей MICA среди здоровых людей России и выявлены возможные ассоциации между наличием определённых аллелей и развитием опухолевых заболеваний (меланома и неходжкинские лимфомы, НХЛ). Типирование MICA проводили путём секвенирования ПЦР-фрагментов, полученных из геномной ДНК, выделенной из цельной крови доноров и больных с опухолевыми заболеваниями. Был определён генотип аллелей MICA 77 доноров. Среди исследованных образцов из 87 описанных в литературе аллелей MICA выявлены 15. В России наиболее распространённым, как и в большинстве других стран, является аллель *008 (37,7%). В целом, распределение аллелей MICA в России близко к таковому в европейских странах. Частоты других распространённых аллелей составили: *002 (14,3%), *004 (6,5%), *007 (3,9%), *009:01/49 (10,4%), *010:01/69 (7,1%), *011 (3,3%), *012:01 и 03 (2,0%), *016 (2,0%), *017 (2,0%), *018:01 (7,2%), *027 (2,0%). Среди больных

меланомами выявлены положительная ассоциация заболеваемости с аллелем MICA*004, и отрицательная – с аллелем MICA*011. Среди больных НХЛ наблюдались повышенные доли больных с аллелями *002 и *027, и пониженная доля – с аллелем *018. Анализ распределения аллелей MICA в российской популяции может быть использован для выявления предрасположенности людей к различным заболеваниям, включая опухолевые и аутоиммунные болезни, а также вирусные инфекции. *Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 16-04-01867.*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ТЕЛОМЕРАЗЫ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ЦИТОКИНАМИ (IL-7, IL-15) *IN VITRO*

Н.Ю. Кнауэр, Е.А. Блинова, А.Ю. Моренкова, А.Э. Сулутьян, О.А. Чумасова, А.Э. Сизиков, В.А. Козлов
НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

IL-7 и IL-15 являются основными факторами выживания и пролиферации Т-лимфоцитов и ключевыми регуляторами гомеостатической пролиферации (ГП), реализующейся в условиях лимфопении. Негативным последствием ГП является накопление аутореактивных клонов, способствующее развитию аутоиммунной патологии, в частности, ревматоидного артрита (РА). Известно, что IL-7 и IL-15 стимулируют активность теломеразы в лимфоцитах здоровых доноров. В то же время для пациентов с РА показано снижение ее активности при стимуляции антигеном. Также при РА выявлено укорочение теломер как в лимфоцитах, так и в CD34+-предшественниках кроветворения. Таким образом, важным представляется сравнение активности теломеразы у пациентов с РА и здоровых доноров (Д) при стимуляции гомеостатическими факторами IL-7 и IL-15 in vitro. В исследование было включено 5 условно здоровых доноров 35 (27; 49) лет и 5 пациентов со средней и высокой активностью РА 37 (29; 53) лет. Мононуклеары периферической крови (МНК ПК) культивировали с IL-7, IL-15, их комбинацией (по 50 нг/мл) и IL-2 (100 Ед/мл)+aCD3 (1 мкг/мл) в течение 7 дней. В лизатах (дни 0–7) оценивали активность теломеразы модифицированным методом TRAP. В обеих группах наблюдали высокую индивидуальную вариабельность динамики активности теломеразы, в целом активность теломеразы у пациентов была несколько выше. При сравнении активности в разные дни культивирования по сравнению с днем 0 выявлены следующие достоверные различия ($p<0,05$): в отсутствие стимуляции отмечалось повышение активности на 5-7 дни (Д) или в 3, 5–7 дни (РА). При стимуляции IL-7: повышение активности на 5 день (Д) или в дни 1–3, 5, 6 (РА). При стимуляции IL-15: активность теломеразы повышалась по сравнению с 0 днем в дни 3, 4 и 6 (Д) или в дни 3, 4, 5-7 (РА), при этом основной пик был смещен на более ранние сроки по сравнению с донорами. При совместной стимуляции IL-7 и IL-15 у доноров отмечался подъем на день 6, а у пациентов – более высокие значения активности в дни 2–4, 5–7. При стимуляции IL-2 и aCD3: повышение активности в дни 3, 5 и 6 (Д) или в дни 2-4, 6, 7 (РА). Таким образом, нами была описана динамика активности теломеразы в различных вариантах стимуляции в МНК ПК доноров и пациентов с РА, в дальнейшем эти результаты могут внести вклад в понимание патогенеза РА.

КОНСТРУИРОВАНИЕ АНАЛОГОВ НЕЙРОМЕДИАТОРА N-АЦЕТИЛАСПАРТИЛ-ГЛУТАМАТА НА ОСНОВЕ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ РАСЧЕТОВ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С АКТИВНЫМ ЦЕНТРОМ РЕЦЕПТОРА mGluR3

Т.В. Кобыльская, С.В. Шульгин, В.А. Семикин, Г.В. Назаров, А.В. Шантроха *Научный центр «Сигнал», Москва, Россия*

Дипептид N-ацетиласпартилглутамат (Ac-Asp-Glu-OH, NAAG) является одним из важнейших нейромедиаторов в нервной системе млекопитающих, действует как агонист 3 группы метаболотропных глутаматных рецепторов (mGluR3). NAAG позволяет осуществлять быструю передачу сигнала между нейронами или между нейроном и мышцей. Дипептид вовлечен в формирование анальгезии, эмоционального и когнитивного состояния. Компьютерный докинг биологически активной конформации молекулы NAAG с активным центром рецептора mGluR3 позволил изучить молекулярные механизмы лиганд-рецепторного взаимодействия и конструировать новые аналоги лиганда NAAG. Структура активного центра получена из данных комплекса связывания L-глутамата с внеклеточным участком рецептора mGluR3 (2E4U, www.pdb.org). Оптимизацию геометрии комплекса проводили последовательно методом молекулярной механики с применением модельного потенциала BIO+ и полуэмпирическим квантово-химическим методом PM3. При этом фиксировались водородные связи между атомами молекулы Ac-Asp-Glu-OH и атомами аминокислот внеклеточных петель активного центра рецептора mGluR3. Был предложен набор ди- и трипептидов с L-, D-аминокислотами и различными заместителями. Для каждого предложенного соединения рассчитаны квантово-химическими методами энергетические характеристики его комплекса с активным центром рецептора mGluR3. Вычисляемая энергия связывания каждого аналога является важнейшим дескриптором, который характеризует силу его связывания с рецептором. С использованием разработанной модели и рассчитанных энергетических характеристик комплексов пептидов с активным центром рецептора mGluR3, а также на основании аналогичных расчетов структур с известным сродством к данному типу рецепторов и известной активностью спрогнозированы структуры новых предположительно высокоактивных аналогов дипептида NAAG: Ac-Asp-Glu-Glu-NH_2 и Suc-Asp-Glu-NH_2.

РАЗНООБРАЗИЕ ЦИТОХРОМОВ P450 В ПОПУЛЯЦИИ *XANTHOMONAS* SPP СООТВЕТСТВУЕТ ТАКСОНОМИЧЕСКОМУ СПЕКТРУ ПОРАЖАЕМЫХ ПАТОГЕНАМИ РАСТЕНИЙ

Е.И. Кырова, К.А. Кромина, А.Н. Игнатов
Российский университет дружбы народов, Москва; Институт общей генетики, ООО Центр «Фитоинженерия», Рогачево; Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Цитохромы P-450 (cytP450) представляют собой разнообразное 'суперсемейство' ферментов, которые катализируют окисление широкого спектра соединений. Основной особенностью белков cytP450 является использование базовой структуры белка для выполнения широкого ряда функций в организме. Наши знания о функции cytP450 у фитопатогенных бактерий является весьма ограниченным. Бактерии рода Xanthomonas известны как возбудители болезней более 400 видов растений. Известно, что cytP450 (CYP112) имеет важное значение для вирулентности патогена риса *X. oryzicola* (Lu et al., 2015). Мы нашли в доступных базах данных (NCBI, UniProt) и проанализировали 798 последовательностей белков cytP450 бактерий рода *Xanthomonas* spp. и 43 белковых последовательностей, вновь полученных для изолятов *X. campestris* и *X. arboricola* собранных в России. Семейство CYP133B2/B3/B4 (cytP450 BioI) является наиболее представленной группой во многих видах

рода Xanthomonas (70% последовательностей) с межвидовым сходством от 50 до 87% по аминокислотной последовательности. Другие белки cytP450 были подразделены методом кластерного анализа на 24 группы. Некоторые группы содержали последовательности видов вирулентных для одних и тех же семейств растений, но таксономически неродственных (Young et al., 2008). Например, четыре кластера включали белки видов *X. oryzae* и X. *oryzae* pv. oryzicola и *X. translucens*, вирулентные для злаков (сем. Мятликовые). Другая группа последовательностей включала белки видов *X. translucens* и *X. sacchari*, также патогенных для злаков. Мы нашли практически идентичные (>96% сходства) белки семейства cyp133 у *X. arboricola* и *X. campestris*, выделенных из одной и той же группы растений-хозяев (*Brassicaseae*) (Игнатов и соавт., 2010). Этот факт можно объяснить горизонтальным переносом генов между двумя бактериями, которые присутствуют на одном виде растений. Перенос генов, связанный с рекомбинацией мобильных генетических элементов и другими интегративными элементами, является одним из основных факторов бактериального разнообразия (Fereira et al., 2015). Таким образом, мы можем предположить, что состав белков cytP450 может определять диапазон поражаемых фитопатогенными ксантомонадами видов и семейств растений. *Работа была поддержана Грантом № 14.W03.31.0003 Правительства РФ.*

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АРОВ, АССОЦИИРОВАННЫЙ С СИНДРОМОМ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ХОЛЕСТЕРИНА, В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ГОЛШТИНИЗИРОВАННОГО ЧЕРНО-ПЕСТРОГО СКОТА

А.М. Макарова[1,2], К.С. Пантюх[1], И.В. Рукин[1], Е.Н. Зарудная[2] *[1]ООО «Мой Ген», Москва; [2]Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия*

Аполипопротеин В является важным компонентом липопротеинов низкой плотности и хиломикронов, обеспечивающих транспорт холестерола в организме. Синтез АпоВ-100 и АпоВ-48 регулируется геном АРОВ. Генетический дефект голштинского крупного рогатого скота (КРС), связанный с нарушением транспорта холестерола в организме и приводящий к смерти теленка в первые месяцы жизни, был назван синдромом недостаточности холестерина (HCD). Казуальная мутация, связанная с HCD и описанная в 2016 году, представляет собой вставку 1266 п.н. в гене АРОВ. Синтез укороченной на 97% неактивной формы белка апоВ приводит, главным образом, к нарушению синтеза хиломикронов и ЛПНП. Было показано, что казуальная мутация произошла от единственного быка Шторма, рожденного в 1991 году в Голландии, который широко использовался в селекции, что способствовало активному распространению мутации в популяциях голштинского и голштинизированного черно-пестрого КРС по всему миру. В нашем исследовании определялась частота носительства HCD в популяции российского голштинизированного черно-пестрого КРС. Для этого было протестировано на наличие казуальной мутации молекулярно-биологическим методом 450 животных из 20 хозяйств РФ. Мы выявили частоту носительства HCD 8% в общей российской популяции среди 350 проанализированных животных и частоту 20% в выборке потенциальных носителей российской популяции среди 100 проанализированных быков-потомков Шторма. Кроме того, нам удалось обнаружить быков – носителей гаплотипа HCD, для которых не была подтверждена мутация, приводящая к заболеванию, что говорит о поиске казуальной мутации как о более точном методе для анализа популяции на носительство HCD. Также мы определили количество дочерей для идентифицированных носителей мутации, приводящей к HCD, и выявили максимальное количество дочерей 1226 и среднее количество дочерей 262 среди быков. Данные свидетельствуют о широком применении быков-носителей HCD в селекции российского высокопродуктивного молочного скота и о необходимости принятия мер для предотвращения дальнейшего распространения заболевания. Данное исследование является первым, где были проанализированы подобные крупные выборки животных молекулярно-биологическим методом для определения частоты носительства HCD в российской популяции голштинизированного КРС.

ИЗУЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОЗА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Ф.И. Мамедова, Г.И. Азизова, А.Р. Дадашова *Азербайджанский медицинский университет, Баку, Азербайджан*

Апоптоз – строго регулируемый процесс делеции клеток, который играет важную роль в различных сердечно-сосудистых заболеваниях, таких как инфаркт миокарда, реперфузионное повреждение и сердечная недостаточность. Поскольку потеря кардиомиоцитов является наиболее важным фактором, определяющим заболеваемость и смертность пациентов, крайне важно понимание механизмов регуляции апоптотической передачи сигналов. Целью данной работы является изучение маркеров апоптоза (гранзима В) и окислительного стресса – тиолового статуса, а также показателей повреждения эндотелия цистатина С. В исследование включены 114 больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН), которые были разделены на 3 группы: I группа – 41 пациент с ХСН, II группа – 39 пациентов, у которых диагностировали сахарный диабет типа-2 (СД-2), III группа – 34 пациента с метаболическим синдромом (МС). Контрольную группу составили 10 здоровых доноров. Из биохимических показателей в плазме крови определены концентрации: общего холестерина (ОХС), ХС α-липопротеинов, ХС α-липопротеинов, гликолизированного гемоглобина (HbAlc), глюкозы. Биохимические показатели определяли с использованием наборов реактивов фирмы «Human» (Германия), содержание гранзима В и цистатина С – с помощью коммерческих наборов фирмы «USCN Life Science Inc» (China), а тиолового статуса – реагентами фирмы «Immundiagnostik». У исследуемых нами больных содержание гранзима В достоверно увеличивалось в I группе в 1,5 раза ($p<0,001$), во II группе в 2,5 раза ($p<0,001$), в III группе – почти в 2 раза ($p<0,001$) по сравнению с контрольной группой. При исследовании уровня цистатина С было обнаружено, что наибольшее увеличение отмечалось во II группе в 1,8 раза, в то время как в I и III группах показатель увеличился в среднем в 1,4 раза. При исследовании тиолового статуса наблюдалось снижение показателей в I группе на 11%, тогда как в II и III группах – на 17%. Выявленные нарушения тиолового статуса отражают степень оксидативного стресса у больных. Снижение уровня тиолового статуса связано с наличием и тяжестью ХСН. Исследуемые нами показатели в комплексе дают возможность предположить, что осложнения при ХСН обусловлены факторами оксидативного стресса, апоптоза и атерогенеза.

ПЕПТИД ДЕЛЬТА-СНА (DSIP), ЕГО ЭНДОГЕННЫЙ ПРОТОТИП KND И ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ "ДЕЛЬТАРАН": ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

И.И. Михалева, И.А. Прудченко, Л.В. Ономриенко, А.Н. Мурашев
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В ходе многолетних исследований мы установили, что DSIP является полифункциональным нейропептидом с уникальной способностью существенно увеличивать устойчивость организма к действию неблагоприятных стрессовых факторов, уменьшать выраженность стресс-индуцированных патологических процессов и спонтанный канцерогенез. Разработанный на основе DSIP лекарственный препарат дельтаран первоначально в качестве антиалкогольного средства в 1998 году был зарегистрирован Минздравом РФ. Дальнейшие усилия по его клиническому изучению, исследованию механизма действия позволили существенно расширить спектр медицинских показаний к его применению. В конце 2016 года практически новый препарат Дельтаран был зарегистрирован Минздравом РФ вместе с новой инструкцией по его применению для профилактики стресс-индуцированных состояний (реакции на стресс и нарушения адаптации), что предполагает его широкое применение в медицине. В другой серии работ нами был проведен поиск белковых предшественников DSIP в тканях млекопитающих и человека. В итоге впервые выявлено семейство JmjC-домен-содержащих гистоновых деметилаз типа JMJD1B, содержащих DSIP-подобный участок TrpLysGlyGlyAsnAlaSerGlyGlu, названный нами KND, который, как мы полагаем, является эндогенным прототипом DSIP. Метилирование-деметилирование гистонов является чрезвычайно важным механизмом посттрансляционных модификаций и эпигенетической регуляции структуры хроматина и транскрипции генов и отражает процесс динамичной регуляции активности хроматина в ответ на потребности клеток адаптироваться к действию стрессовых стимулов. Далее нами выполнен цикл работ по изучению физиологической активности KND и его аналогов в сравнении с DSIP с целью изыскания новых лекарственных средств на их основе.

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЕПТИДА KND И ЕГО АНАЛОГОВ В СРАВНЕНИИ С DSIP

И.И. Михалева, И.А. Прудченко, Л.В. Ономриенко, А.Н. Мурашев
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Ранее нами было проведено сравнительное изучение in vivo ряда биологических свойств известного пептида дельта-сна (WAGGDASGE, DSIP) и гомологичного ему нового пептида WKGGNASGE – ([K2, N5]DSIP, KND1), который был выявлен нами при компьютерном поиске в белковых и нуклеотидных базах данных как фрагмент 324-332 лизинспецифичной гистоновой деметилазы 3 В человека. Эта деметилаза входит в семейство JmjC-доменсодержащих гистоновых деметилаз, присутствующих в тканях различных млекопитающих, и вовлеченых в осуществление таких регуляторных функций гистонов, как эпигенетическая регуляция структуры хроматина и транскрипции генов в ответ на потребности клеток к адаптации под действием внешних и внутренних стрессовых стимулов. Проведенные исследования показали, что пептид KND обладает функционально сходной с DSIP биологической активностью, причем его антиоксидантные, противосудорожные и поведенческие эффекты KND оказались более выраженными, чем у DSIP. В продолжение этих работ продолжен синтез группы аналогов KND и в экспериментах *in vivo* изучено их детоксицирующее действие на фоне применения цитостатика, а также кардиопротективные эффекты пептидов в условиях экспериментальной ишемии сердца. Установлено, что введение KND и некоторых аналогов позволяет достоверно уменьшить степень снижения массы органов-мишеней при действии цитостатика цисплатина. Выявлены корригирующие эффекты ряда исследуемых пептидов на цисплатин-индуцируемые гематологические отклонения, такие как миелосупрессия и тромбоцитопения, показано уменьшение выраженности гистологических отклонений от нормы в тканях печени, почек и селезенки, а также заметное нефрозащитное действие изучаемых пептидов на фоне введения цитостатика. Обнаружены также отчетливые кардиопротективные свойства KND и некоторых из изученных пептидов, выявленные по существенному сокращению зоны острого инфаркта сердца крыс при реперфузии в опытах с экспериментальной ишемией сердца. Полученные данные о наличии значительно более высокой эффективности KND и его аналогов в сравнении с DSIP в использованных тест-моделях свидетельствуют в пользу нашей гипотезы о том, что KND может быть эндогенным аналогом DSIP.

Литература

1. Mikhaleva I.I// et al.Peptides. 2011, 826–831

УБИКВИТИН КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЕР ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

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

Актуальным направлением теоретических и практических исследований является поиск молекулярных маркеров, характеризующих опухолевую прогрессию. Неотъемлемой частью опухолевого роста является усиленная генерация активных форм кислорода. Но, несмотря на это, опухолевая клетка характеризуется устойчивостью к условиям окислительного стресса, что позволяет ей успешно выживать и «ускользать» от апоптоза. В регуляции клеточного ответа на окислительный стресс важную роль играет убиквитин-зависимая протеасомальная система деградации. Цель – установить взаимосвязь между концентрацией убиквитина и реализацией апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat. Материал и методы. Материалом для исследования служили опухолевые клетки линии Jurkat («Т-лимфобластная лейкемия человека»), полученные из Института цитологии РАН (Россия) и лимфоциты крови. Лимфоциты выделяли из венозной крови здоровых доноров (6 мужчин и 7 женщин в возрасте от 20 до 35 лет) путем градиентного центрифугирования. Культивирование опухолевых клеток линии Jurkat проводили суспензионным методом в полной питательной среде RPMI-1640. Содержание убиквитина определяли методом вестерн-блоттинга с использованием соответствующих первичных моноклональных антител. Методом проточной цитофлюориметрии оценивали количество клеток, вступивших в апоптоз и концентрацию внутриклеточных активных форм кислорода. Статистическую обработку полученных результатов выполняли при помощи программы Statistica 6,0. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Уилки. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Среди опухолевых клеток линии Jurkat нами было получено в 4,45 раза ($p<0,05$) меньше аннексин-положительных клеток относительно лимфоцитов крови. В

опухолевых клетках линии Jurkat содержание активных форм кислорода в 6,19 раза ($p<0,05$) и убиквитина в 18,33 раза ($p<0,05$) превышало аналогичные показатели в лимфоцитах крови. Выводы. Убиквитин является одним из возможных факторов «ускользания» опухолевых клеток линии Jurkat от апоптоза в условиях окислительного стресса, что позволяет считать этот белок потенциальным маркером опухолевого роста. *Исследование выполнено в рамках гранта Президента Российской Федерации №МК-1742.2017.7.*

УЧАСТИЕ СТРЕССОВЫХ БЕЛКОВ-ДЕГИДРИНОВ В ФОРМИРОВАНИИ КРИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ РОДА *BETULA* L.

А.А. Перк, Т.Д. Татаринова, В.В. Бубякина, А.Г. Пономарев, И.В. Васильева
Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия

Исследована роль высокогидрофильных стрессовых белков-дегидринов в механизмах адаптации растений к низким температурам. Ранее показано, что эти белки *in vitro* могут выполнять криопротекторную, антифризную, антиоксидантную и металлосвязывающую функции, которые определяются наличием в их структуре консервативных K-, Y- и S-сегментов. Предполагается участие дегидринов SKn- и K-типа в акклимации растений к холоду. Нами исследовались следующие представители рода Береза (*Betula* L.): *B. pendula* Roth и ее разновидности, *B. pubescens* Ehrh., *B. fruticosa* Pall. и *B. nana* L. Сбор растительного материала отдельно по органам (побеги, почки) и тканям (кора, ксилема) проводили в контрастных по климатическим условиям регионах России: Центральная и Южная Якутия, Предбайкалье, Северо-Запад Евразии. Для идентификации дегидринов использовали поликлональные антитела против их консервативного K-сегмента (EKKGIME/DKIKEKLPG). Анализ полиморфизма и сезонных изменений дегидринов показал, что у всех изученных экземпляров *Betula* L. независимо от видовой, органо-тканевой и географической принадлежности, круглогодично представлены белки с мол. м. 66 и 69 кДа. В то же время, уровень низкомолекулярного 17 кДа дегидрина достигает максимальных значений, когда растения подвергаются воздействию сочетания короткого фотопериода и низкой температуры, что коррелирует с развитием их устойчивости к холоду. Последнее также подтверждается уменьшением электролитической утечки из тканей и увеличением импеданса побегов. Стабильно высокое содержание дегидринов в зимний период может свидетельствовать об их участии в общих механизмах формирования криотолерантности растений в разных природно-климатических условиях, а также предполагает возможность использования 17 кДа дегидрина в качестве маркера морозоустойчивости у представителей рода Betula L. *Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания ИБПК СО РАН (№ АААА-А17-117020110054-6) и гранта РФФИ (№ 09-04-98556 р_восток_а).*

ЦИТОКИНОВЫЙ СЕКРЕТОМ КЛЕТОК ЛИНИИ SH-SY5Y ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕПТИДА DAMGO

Н.Ю. Роговская, Я.А. Дубровский, Д.В. Криворотов, В.А. Кузнецов, В.Н. Бабаков, А.С. Радилов
НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Опиоидные анальгетики проявляют заметный иммуносупрессивный эффект и модулируют работу клеток иммунной системы. В клетках ЦНС активация MOR1 рецептора может усилить экспрессию ряда цитокинов путем активации транскрипционного фактора NF-kB, а секретируемые цитокины, в свою очередь, также могут модулировать работу нервной системы. В настоящей работе анализировали изменения в секреции цитокинового секретома клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y при действии пептидного агониста MOR1 рецептора DAMGO и его антагониста налмефена. Клетки линии SH-SY5Y являются гомогенной линией с нейробластным фенотипом, клетки экспрессируют специфичные нейрональные маркеры, такие как тирозин- и дофамингидроксилазу, мускариновые, опиатные рецепторы и рецептор нейронального фактора роста. Клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) культивировали в среде DMEM-F12 содержавшую 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и смесь антибиотиков пенициллин/стрептомицин в атмосфере 5% CO_2. Клетки инкубировали 4 дня с ежедневным отбором 50 мкл среды. Для количественной оценки уровня экспрессии цитокинов/хемокинов в кондиционных средах использовали многопараметрической иммунофлуоресцентный анализ для определения 27-цитокинов по технологии Luminex xMAP с помощью набора Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex. Ранее нами было установлено, что эта культура экспрессирует все из изучаемых 27 цитокинов и совокупность секретируемых белков в кондиционных средах составляет «цитокиновый секретом». Инкубация клеток с 1 мкМ DAMGO приводит к увеличению секреции следующих цитокинов в кондиционных средах относительно контроля: IL1β, IL1ra, IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL9, IL10, IL12(p70), IL13, GM-CSF, IFN-γ, IP10, MCP-1(MCAF, CCL2), MIP1a, MIP1b, PDGFbb, TNFα. Налмефен отменяет повышенную секрецию этих цитокинов, однако сам способствует секреции IL17 и FGF. Все цитокины, секреция которых усиливается при действии DAMGO контролируются транскрипционным фактором NF-κB. Таким образом, исследование активности транскрипционного фактора NF-κB в культуре клеток нейробластомы линии SH-SY5Y и изменение экспрессии контролируемых им белков, могут стать основой для клеточной тест-системы, проясняющей механизмы действия опиоидных анальгетиков и перспективной для скрининга новых антагонистов.

ПЕПТИДЫ ЭПИФИЗА РЕГУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ СИРТУИНА-6 И ГЛИКОПРОТЕИНА CD98HC В ФИБРОБЛАСТАХ КОЖИ ПРИ СТАРЕНИИ

Т.С. Салль[1], Н.С. Линькова[1,2], Н.В. Фридман[1], С.В. Трофимова[1] *[1]Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

На клеточном уровне старение кожи проявляется в нарушении синтеза фибробластами белков и пептидов, вследствие чего их количество становится недостаточным для пролиферации и дифференцировки клеток. Поиск веществ, стимулирующих процессы регенерации кожи, является актуальной задачей геронтокосметологии. Известно, что тетрапептид AEDG и полипептидный комплекс эпифиза (ППЭ) способствуют достоверному увеличению продолжительности жизни, замедлению старения у животных. При этом молекулярно-клеточные аспекты геропротекторного действия пептидов эпифиза в отношении фибробластов кожи изучены недостаточно. Целью работы явилось изучение влияние пептида AEDG и ППЭ на экспрессию Sirtuin-6, CD98hc при старении фибробластов в культуре. Материалом исследования явились первичные диссоциированные культуры клеток кожи крыс линии Wistar. Клетки выделяли и выращивали в среде M199 в CO_2-инкубаторе до 3-го («моло-

дые» культуры) и 14-го («старые» культуры) пассажа. Культуры клеток разделили на три группы: 1 – контроль, 2 – пептид AEDG (100 нг/мл), 3 – ППЭ (1000 нг/мл). В работе использовали первичные антитела к Sirtuin-6 («Abcam», 1:200) и CD98hc («Novocastra», 1:125) и вторичные антитела, конъюгированные флуорохромом Alexa Fluor 488 или 647 (1:1000, Abcam). Sirtuin-6, CD98hc являются маркерами процессов обновления клеток кожи и репарации ДНК и получили название «молекул молодости». Результаты иммуноцитохимического окрашивания оценивали морфометрически по показателю площади экспрессии. Площадь экспрессии Sirtuin-6 и CD98hc снижалась при старении фибробластов кожи пассажами, что согласуется с данными литературы. Пептид AEDG повышал экспрессию Sirtuin-6 на 19% в «молодых», а ППЭ – на 91% в «старых» культурах фибробластов кожи. В «старых» культурах фибробластов под действием пептида AEDG и ППЭ экспрессия CD98hc повышалась, соответственно, на 54% и в 2,3 раза. Такими образом, важным молекулярным аспектом геропротекторного действия пептида AEDG и ППЭ является активация «белков молодости», участвующих в поддержании функциональной активности фибробластов кожи. Пептид AEDG и ППЭ могут быть рекомендованы для изучения в качестве веществ, замедляющих процессы старения кожи у человека.

СВЯЗЬ ДЕГИДРИНОВ С АДАПТАЦИЕЙ *LARIX CAJANDERI* К СВЕРХНИЗКИМ ЗИМНИМ ТЕМПЕРАТУРАМ КРИОЛИТОЗОНЫ

Т.Д. Татаринова, А.Г. Пономарев, А.А. Перк, И.В. Васильева, В.В. Бубякина
Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия

Лиственница Каяндера (*Larix cajanderi* Мауг.) является доминирующим лесообразующим видом в условиях Северо-Востока Сибири и относится к самым морозоустойчивым древесным растениям в мире. Особый интерес представляет изучение механизмов биохимической адаптации лиственницы к резко континентальному климату Якутии с характерными сверхнизкими зимними температурами на фоне многолетней мерзлоты. В формировании криотолерантности растений важная роль отводится стрессовым белкам-дегидринам, функции которых связаны с участием в защите клеточных структур от повреждений, вызванных холодовым воздействием. Впервые в побегах *L. cajanderi* в условиях криолитозоны с использованием специфических антител обнаружены мажорные дегидрины с мол. м.: 14–15, 17–18, 20, 33, 37, 39, 42 и 73 кДа. Высокое разнообразие дегидринов лиственницы превышает таковое у изученных нами других видов древесных растений, в частности, сосны и березы. Наибольшие качественные и количественные различия дегидринов, представленных 3–6 минорными вариантами, между разными экземплярами лиственницы отмечались в области 21–37 кДа. Ход сезонных изменений этих стресс-белков характеризовался их накоплением в период осенней подготовки растений к покою (август-сентябрь). Уровень отдельных дегидринов при этом заметно возрастал (от 3 до 22 раз) и оставался стабильно высоким в течение зимних месяцев, когда отмечались сверхнизкие отрицательные температуры и растения достигали максимальной морозоустойчивости. Весной и в начале вегетации (апрель-май) в побегах происходил обратный процесс снижения уровня дегидринов, причем некоторые из них исчезали почти полностью. Таким образом, выявленные особенности сезонной динамики и значительная представленность дегидринов в якутской популяции лиственницы, вероятно, связаны с формированием уникальной устойчивости *L. cajanderi* к экстремально низким температурам в условиях криолитозоны. *Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания ИБПК СО РАН (№ АААА-А17-117020110054-6).*

СВОЙСТВА ОДИНОЧНОГО КАНАЛА OmpF ПОРИНА *YERSINIA RUCKERI*

Д.К.Чистюлин[1], О.Д. Новикова[1], Ю.Н. Антоненко[2] *[1]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Реконструкция OmpF порина *Y. ruckeri* (10 нг/мл в буфере, pH 7.0, содержащем 1M KCl) приводила к активному ступенчатому увеличению проводимости бислойной липидной мембраны (БЛМ) из дифитаноилфосфатидилхолина (ДФФХ). При потенциале 50mV каналы, образованные порином, имели широкий спектр значений проводимости (от 1,5 до 3,5 nS), что сравнимо с проводимостью каналов поринов иерсиний и меньше таковой OmpF *E. coli*. Для OmpF *Y. ruckeri* характерна типичная для поринов небольшая асимметрия проводимости. Изучена динамика образования пор при подкислении раствора белка до значений pH 4,8 и 2,8. При pH среды 4,8 скорость встраивания каналов незначительно замедлялась, однако это практически не влияло на проводимость одиночного канала. При низких значениях pH (2,8) скорость встраивания новых каналов падала значительно, однако уменьшения суммарной проводимости уже встроенных каналов не наблюдалось. Обнаружено, что в кислой среде порин необратимо утрачивает способность встраиваться в БЛМ, поскольку при нейтрализации раствора белка его функциональная активность не восстанавливалась. Полученные результаты свидетельствуют о том, что молекулы OmpF порина *Y. ruckeri* при экстремально кислых значениях pH среды претерпевают значительные конформационные изменения, лишающие их способности образовывать в мембране проводящие каналы. Однако липидное окружение предохраняет белок от потери функциональной активности. Одним из широко известных свойств порообразующих белков грамотрицательных бактерий является способность переходить в закрытое состояние при увеличении прикладываемого к мембране потенциала. Этот процесс происходит ступенчато и отражает поочерёдное закрытие мономеров в тримерном канале. Наши эксперименты показали, что вся гетерогенная популяция каналов OmpF порина *Y. ruckeri* имела слабую тенденцию к закрытию только при высоких значениях прикладываемых потенциалов (-150 и +150 mV). По этим показателям исследуемый белок значительно отличается от поринов других грамотрицательных бактерий, каналы которых быстро закрываются при высоких значениях потенциалов. Механизм потенциал-зависимого поведения пориновых каналов изучен недостаточно, поэтому обнаруженные различия открывают перспективу для исследования взаимосвязи между структурой и функцией этих мембранных белков.

ПЕПТИДНЫЙ СИНТЕЗ. БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

ЦИКЛОТЕХНОЛОГИЯ: НОВАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СИНТЕЗА ПЕРОРАЛЬНО АКТИВНЫХ ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ 2, 5-ДИКЕТОПИПЕРАЗИНОВ

В.И. Дейгин[1,2], О.Б. Ксенофонтова[1], В.И. Шмыгарев[1], О.Н. Яцкин[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Одним из основных ограничений к широкому внедрению пептидных лекарственных препаратов в медицинскую практику является их низкая устойчивость к ферментативному расщеплению при введении в организм. В настоящее время известны различные методы и приемы, увеличивающие стабильность молекул при введении в организм, в том числе получение различных циклических производных. Для низкомолекулярных пептидных препаратов (до 800–1000 D) нами предложен подход, позволяющий создавать стабильные при пероральном приеме соединения, путем «включения» биологически активного фрагмента в структуру 2,5-дикетопиперазинового производного [1]. Получены семейства новых пептидомиметиков – производных дикетопиперазинов, обладающих различными видами биологической активности, как при системном, так и при пероральном введении животным. Приводятся примеры соединений, проявляющих гемотропную, адъювантную, анальгетическую и нейропротективную активность [2–3]. Одним из перспективных направлений применения циклопептидов является их использование в качестве адъювантов при создании пептидных синтетических вакцин. На примере синтеза пептидной вакцины для иммунотерапии болезни Альцгеймера (БА) показана эффективность комбинации пептидного антигена с химически присоединённым циклопептидным адъювантом для защиты животных от развития БА. Исследования проводили в трех экспериментальных моделях БА – на бульбэктомированных мышах линии NMRI, а также на трансгенных мышах двух типов – тритрансенного типа (Triple transgenic mice (PS1/APPswe and tau) и дитрансгенного типа (Double transgenic mice (APPswe/PS1). Полученный препарат защищал экспериментальных животных от развития БА и накопления бета-амилоида и тау-белка в мозге. В докладе обсуждаются подходы к синтезу и исследованию влияния тонкой химической структуры на биологические свойства полученных веществ.

Литература

1. Vladislav I. Deigin, European patent # 2046778 B1, “Multifunctional bioactive compounds”, Date of filing 01.08. 2007
2. Deigin V., Ksenofontova O., Khrushchev A., Yatskin O., Goryacheva A., Ivanov V. Chemical platform for preparation of synthetic orally active Peptidomimetics with hemoregulating activity // Journal ChemMedChem. -2016. - V.11. - P.1-5.
3. Deigin V. Novel Branched diketopiperazines as a universal scaffold for preparation of orally active small peptide derivatives / V. Deigin // Journal of peptide science. — 2012. — V.18. — Supp.1. — P.S33.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЕПТИДНЫХ ТОКСИНОВ ИЗ ЯДА СКОРПИОНОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ И РАЗРАБОТКИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

О.В. Некрасова[1], К.С. Кудряшова[1], А.Д. Волынцева[2], В.Н. Новоселецкий[2], С.А. Якимов[1], М.П. Кирпичников[1,2], А.В. Феофанов[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Многие пептидные токсины из яда скорпионов являются высокоаффинными блокаторами калиевых потенциалзависимых каналов (Kv) и представляют собой незаменимые молекулярные инструменты для исследования физиологических функций и фармакологических свойств калиевых каналов. Кроме того, пептидные блокаторы рассматриваются как перспективные молекулярные шаблоны для создания нового поколения лекарственных средств. Мы представляем новый биоинженерный подход к высокопродуктивному получению рекомбинантных дисульфид-богатых пептидных токсинов, их мутантных форм, а также химерных белков, в которых пептидные токсины слиты с N-концевым флуоресцентным белком. Подход основан на супер-экспрессии пептидных токсинов в *E.coli* в составе гибридов с мальтоза-связывающим белком, выделении и последующем расщеплении гибридных белков TEV протеазой с образованием полностью свернутых и функционально активных пептидных токсинов, сохраняющих нативный N-концевой аминокислотный остаток. Были изучены условия культивирования, способствующие супер-экспрессии гибридных белков, эффективность гидролиза TEV протеазой неканонических сайтов расщепления, а также возможность коррекции условий реакции протеолитического расщепления с учетом чувствительности пептидов к действию восстанавливающих реагентов. Метод был успешно апробирован для получения различных пептидов, содержащих три или четыре дисульфидных связи, а выход пептидов составил от 12 до 22 мг с 1 литра культуры. Система экспрессии рекомбинантных пептидов была модифицирована с целью получения генетически кодируемых флуоресцентных пептидов (genetically encoded fluorescent peptides, GEFP), которые могут быть использованы в качестве флуоресцентных зондов Kv каналов. Кроме того, с помощью GEFP был разработан быстрый и эффективный метод экспрессии и выделения пептидных токсинов, основанный на флуоресцентной детекции. Полученные рекомбинантные пептиды были использованы нами для изучения аффинности известных и новых пептидных блокаторов Kv1 каналов, для выявления молекулярных детерминант, контролирующих связывание пептидов с поровым доменом Kv1 каналов, а также для создания пептидных блокаторов с повышенной селективностью к целевым Kv1 каналам.

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ТВЁРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА АМИДНОЙ ФОРМЫ ПЕПТИДА HLDF-6

В.Н. Азев[1], Е.Ю. Горбунова[1], Л.Г. Мустаева[1], И.А. Чулина[1], А.К. Сурин[2], М.В. Молчанов[3], А.П. Богачук[4], В.М. Липкин[4]
[1]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино; [2]Институт белка РАН, Пущино; [3]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино; [4]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Амидная форма пептида HLDF-6 (TGENHRa) проявляет широкий спектр нейропротекторной, ноотропной и антианксиолитической активностей. Соединение TGENHRa успешно прошло доклинические исследования и в настоящее время организуются его клинические испытания. Необходимо было разработать эффективный химический синтез целевого пептида. Твёрдофазные методы химического синтеза пептидов имеют преимущества перед синтезом в растворе, которые заключаются в возможности автоматизации и в скорости осуществления процесса синтеза. В настоящей работы представлены результаты поиска подходящего твёрдофазного метода химического синтеза целевого пептида. Была оценена эффективность двух основных методологий ТФПС на основе нескольких параметров. Однако, оказалось, что самыми важными факторами оценки эффективности той или иной методологии, явились химическая природа и количество примесей в образцах синтезированного продукта. Представлены данные о строении побочных продуктов (модификации боковых цепей аминокислот при использовании Boc/Bzl методологии и, соответственно, образование продуктов "внедрения аминокислот" во Fmoc/tBu), о вероятных механизмах их образования и о попытках подавления побочных реакций, которые были успешными лишь частично. Фундаментальной проблемой, однако, является то, что наблюдаемые побочные реакции являются скорее химическими свойствами присущими той или иной методологии и, следовательно, протекание этих побочных реакций не может быть полностью исключено. Таким образом, мы продемонстрировали, что обе широко-используемые методологии ТФПС имеют серьёзные ограничения для их масштабирования в создании процесса получения пептида TGENHRa. Ввиду наличия фундаментальных химических причин эти ограничения не могли быть устранены и использование ТФПС было бы экономически неэффективным. Поэтому для масштабировния процесса получения целевого пептида следовало воспользоваться иным методом. Следует также обратить внимание на тот факт, что хотя твердофазные методы синтеза являются в общем случае идеальными для получения пептидов в относительно короткий промежуток времени, иногда возникают задачи синтеза пептидов, решение которых с помощью методов ТФПС может оказаться нетривиальным, а порой нерациональным, особенно применительно к синтезу фармацевтических субстанций.

ИСКУССТВЕННЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ 10 ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА III ТИПА: КОНСТРУИРОВАНИЕ И ОТБОР МЕТОДОМ БАКТЕРИАЛЬНОГО ДИСПЛЕЯ

Л.Е. Петровская[1], С.Ш. Гапизов[1,2], А.В. Злобинов[1,2], Л.Н. Шингарова[1], Е.А. Крюкова[1], Е.Ф. Болдырева[1], Е.В. Свирщевская[1], Д.А. Долгих[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

10 домен фибронектина человека III типа (10Fn3) является одним из наиболее популярных каркасных белков. Небольшой размер, высокая растворимость и исключительная термостабильность облегчают конструирование и использование искусственных связывающих белков на его основе. Объединение таких белков с другими функциональными модулями позволяет расширять сферу использования полученных терапевтических и диагностических реагентов. Нами разработан новый класс гибридных флуоресцентных белков, содержащих mCherry и αvβ3-интегрин- или VEGFR2-связывающие белки, для визуализации маркеров неоангиогенеза на поверхности клеток. С целью увеличения времени циркуляции в организме получен ряд гибридов αvβ3-интегрин-связывающего белка с альбумин-связывающим доменом (ABD) и изучены их свойства. Для отбора новых вариантов связывающих белков разработана и оптимизирована система дисплея 10Fn3 на поверхности клеток *E. coli* с использованием аутотранспортера *Psychrobacter cryohalolentis* K5T. *Работа проводится при поддержке грантов РФФИ № 16-04-00717, НШ-8384.2016.4 и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

СТРУКТУРНО-ОПОСРЕДОВАННЫЕ МНОЖЕСТВЕННЫЕ ВЫРАВНИВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО РАЗНООБРАЗНЫХ СЕМЕЙСТВ БЕЛКОВ КАК ИНСТРУМЕНТ В БЕЛКОВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Д.А. Суплатов, К.Е. Копылов, Н.Н. Попова, В.В. Воеводин, В.К. Швядас
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Химический факультет, Факультет вычислительной математики и кибернетики, Научно-исследовательский вычислительный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Сравнительный анализ родственных ферментов одного суперсемейства, объединяющего представителей с разными свойствами в рамках общей структурной организации, представляет большой интерес и является вычислительно сложной процедурой, основанной на последовательном и взаимосвязанном исполнении различных методов биоинформатики. Нами был разработан оригинальный протокол для построения и анализа множественных выравниваний функционально разнообразных семейств белков. Использование современных гибридных вычислителей позволило реализовать этот подход в виде свободно доступной платформы в сети интернет, использование которой не требует глубоких навыков в области компьютерной биологии. В докладе будет рассказано о семействе оригинальных методов, которые позволяют в автоматическом режиме строить структурно-опосредованные множественные выравнивания семейств белков с использованием всей доступной информации об их структурах и последовательностях в публичных базах данных (сервис Mustguseal – https://biokinet.belozersky.msu.ru/mustguseal), проводить анализ полученных выравниваний для поиска вариабельных позиций в структурах белков, ответственных за изменение их функциональных свойств (сервис Zebra – https://biokinet.belozersky.msu.ru/zebra), аннотировать и классифицировать функциональные и регуляторные центры связывания лигандов (сервис pocketZebra – https://biokinet.belozersky.msu.ru/pocketzebra). Использование этих подходов в повседневной лабораторной практике помогает изучать механизмы действия белков, создавать препараты ферментов с улучшенными свойствами для практического применения и селективные модуляторы активности белков дикого типа. Работа выполнена с использованием вычислительных систем «Графит», «Ломоносов-1» и «Ломоносов-2» суперкомпьютерного комплекса МГУ им. М.В. Ломоносова. *Исследования поддержаны Российским научным фондом (грант #15-14-00069) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант #17-07-00751).*

СИСТЕМЫ СТАБИЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ МИНИШАПЕРОНОВ

А.Н. Федоров, О.А.Шарапова, В.А. Зенин, М.С. Юркова
ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

Изучение и использование многих белков часто ограничено из-за гидрофобности и нерастворимости в нативных буферах. Улучшение характеристик растворимости и стабильности для таких белков является актуальной задачей. В данной работе для решения этой задачи была создана система слитых белков на основе апикального домена шаперона GroEL. Апикальный домен GroEL, также часто называемый минишапероном, может быть экспрессирован в виде отдельного белка и представляет собой растворимый мономер, сохраняющий свою структуру и функцию связывания белков-субстратов. В данной работе был использован GroEL из термофильного организма; кроме того, в его полипептидной цепи остатки метионина были заменены на изолейцин, для возможности последующего получения целевого белка при помощи химической обработки под действием бромциана. Апикальный домен измененного таким образом GroEL (GrAD) был использован для создания слитых конструктов с двумя исходно нерастворимыми белками, белком E6 вируса папилломы человека 16 типа и N-концевым фрагментом белка E2 вируса гепатита С. Оба слитых белка экспрессировались в составе телец включения, но затем ренатурировали в нативном буфере и сохраняли растворимость при нагревании, концентрировании, замораживании/оттаивании и лиофилизации. Кроме того, белок E6 в составе слитого белка сохранял свойственную ему функцию связывания с ДНК (белок E2 не имеет выраженной функциональности). Для расширения возможностей созданной системы был применен подход создания пермутаций. Для этого N- и С-концы GrAD были соединены между собой и созданы новые N- и С-концы с таким расчетом, чтобы целевой белок имел стерическую возможность оптимальным образом взаимодействовать с субстрат-связывающей поверхностью GrAD. Были созданы две пермутированные формы GrAD. Их свойства были проанализированы как сами по себе, так и в составе слитых конструктов с вышеописанными исходно нерастворимыми белками. Все эти конструкты после ренатурации в нативном буфере сохраняли растворимость при различных манипуляциях, хотя степень их растворимости и стабильность несколько различались. Этот результат подтверждает гибкость системы и возможность выбора оптимальных условий взаимодействия целевого белка с GrAD.

БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ

А.А. Пометун[1,3], И.С. Каргов[2,3], С.А. Зарубина[2,3], С.Ю. Клейменов[4], П.Д. Паршин[2,3], С.С. Савин[1,3], В.И. Тишков [1,2,3]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; [2]Кафедра химической энзимологии, Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]ООО "Инновации и высокие технологии МГУ"; [4]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

В нашей лаборатории проводится систематическое изучение взаимосвязи структура-функция-стабильность формиатдегидрогеназы (ФДГ, КФ 1.2.1.2.). Для этого были клонированы гены ФДГ из бактерий Pseudomonas sp.101, Moraxella sp.C1, *Staphylococcus aureus*, дрожжей *Candida boidinii*, *Ogataea parapolymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, высших растений *Arabidopsis thaliana* и *Glycine max* и мха *Physcomitrella patens*. Ферменты были экспрессированы в клетках *E.coli*, очищены и охарактеризованы. Для большинства ФДГ были получены кристаллы апо- и холо-форм фермента и с помощью РСА определена трехмерная структура. Температурную стабильность исследовали с помощью двух подходов – 1) по кинетике инактивации и 2) дифференциальной сканирующей колориметрии (ДСК). Практически все ФДГ при повышенной температуре необратимо инактивируются по мономолекулярному механизму за исключением фермента из *S.cerevisiae*. Было показано, что ФДГ из растений уступают бактериальным и дрожжевым ферментам по стабильности. Сравнительный анализ известных аминокислотных последовательностей и пространственных структур ФДГ позволил выявить ряд положений, играющих важную роль в стабильности белка. Было проведено моделирование аминокислотных замен для повышения термостабильности с использованием таких подходов как заполнение полости внутри белковой глобулы, введение дополнительных остатков пролина, создание ионных пар, замена гидрофобного остатка на поверхности белка и отобраны наиболее перспективные замены. Всего получено более 30 мутантных ФДГ из различных источников, многие из которых обладали более высокой температурной стабильностью по сравнению с ферментами дикого типа. Показано, что в некоторых случаях всего лишь одна аминокислотная замена приводит к увеличению температурной стабильности более чем в 100 раз при практически неизменных каталитических свойствах. В данной работе будет проведен детальный сравнительный анализ результатов аминокислотных замен в ФДГ из различных источников и показано, какие именно особенности структуры оказывают наибольшее влияние на температурную стабильность этого фермента. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-14-00043 и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 17-04-01469а).*

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

ПОБОЧНЫЕ РЕАКЦИИ, ПРОТЕКАЮЩИЕ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ В ПЕПТИДЕ НА ПОЛИМЕРНОЙ ПОДЛОЖКЕ И АММОНОЛИЗЕ ПЕПТИДИЛ-ПОЛИМЕРА С ДИСУЛЬФИДНЫМ МОСТИКОМ

В.Н. Азев[1], Е.Ю. Горбунова[1], Л.Г. Мустаева[1], Л.К. Байдакова[1], М.В. Молчанов[2]
[1]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино; [2]Институт белка РАН, Пущино, Россия

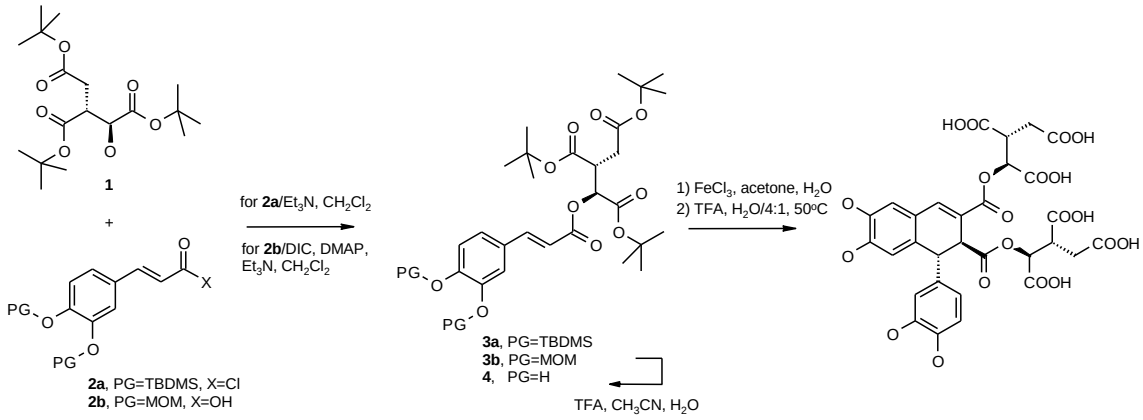
Ряд пептидных медицинских препаратов имеют с своём строении дисульфидный мостик в составе либо цистина, либо иной неприродной аминокислоты. Актуальной задачей является улучшение методов получения таких макроциклических дисульфидов. В настоящей работе представлены данные о протекании двух побочных реакций в синтезе циклического декапептида содержащего бета-меркаптопропионовую кислоту в составе дисульфидного мостика. Ключевым превращением в запланированном способе получения целевого продукта являлось образование дисульфидного мостика на полимерной подложке (в условиях псевдоразбавления). Для окисления свободных тиольных групп использовался кислород, а для удаления пептида с полимерной подложки -- аммиак. В масс-спектре реакционной смеси помимо целевого продукта, было обнаружено некоторое количество неокисленного дитиола наряду с продуктами, для которых значения m/z могут быть описаны как M+n*16, где M является m/z для неокисленного дитиола (аддукты с кислородом). Самому интенсивному пику в масс-спектре

было приписано строение циклического пептида с остатком аминокислоты лантионина. Факт образование аддуктов тиольных групп с кислородом явился неожиданным результатом, однако в литературе описано образование таких аддуктов при окислении алкилмеркаптанов кислородом в органических растворителях. Реакции экструзии атома серы с образованием лантионина также неожиданна. Элиминирование серы из цистина принципиально известно более 100 лет в условиях использования сильных оснований. Однако, существует литературный прецедент успешного проведения аммонолиза цистин-содержащего пептидил-полимера. Возможно, реакция экструзии является субстрат-зависимой. Таким образом, окисление сульфгидрильных групп пептидов в циклические дисульфиды может сопровождаться образованием побочных продуктов реакции тиолов с кислородом, по крайней мере в органических растворителях. Насколько нам известно, эта побочная реакция не была описана на пептидах в качестве субстратов. Также, в противоположность описанной реакции по успешному аминолитическому удалению окситоцина с полимерной подложки, возможно протекание побочной реакции экструзии атома серы из дисульфидного мостика пептида. В настоящее время происходит дальнейшее изучение закономерностей описанных побочных реакций.

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СЕВАНОЛА, НОВОГО ЛИГНАНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЧАБРЕЦА *THYMUS ARMENIACUS*

О.А. Белозерова[1], Д. И. Осмаков[1], М.А. Дубинный[1], В.И. Дейгин[1,2], В.С. Кублицкий[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

На протяжении многих лет исследователи занимаются поиском биологически активных веществ, выделяемых из различных природных источников. Важным классом таких соединений являются лигнаны, полифенольные молекулы, обладающие широким спектром биологической активности [1]. «Севанол» – представитель данной группы веществ. Он был выделен из компонентов, отвечающих за противовоспалительную и анальгетическую активность в чабреце Thymus Armeniacus. Севанол является одним из первых низкомолекулярных природных соединений, который активен в качестве эффективного блокатора ASIC3 каналов [2]. Биологические свойства Севанола убедительно показывают его перспективу в качестве кандидата для создания оригинального фармакологического средства. В связи с этим стала целесообразна разработка метода синтеза этого соединения и его аналогов.



Выбранный нами ретросинтетический путь включал в себя параллельный синтез двух молекул: тритретбутилового эфира изолимонной кислоты и соответствующе защищенной кофейной кислоты. Далее проводилась димеризация двух молекул эфира кофейной кислоты в окислительных условиях. Последующее удаление защитных групп (PG) и стадия очистки на препаративной HPLC привели к целевому продукту в виде смеси двух диастереомеров с суммарным выходом 2%. Для подтверждения биологической активности синтетического севанола были проведены электрофизилогические эксперименты на ооцитах Xenopus laevis, экспрессирующих канал ASIC3 человека. Синтетический аналог продемонстрировал идентичную природному образцу активность при концентрации 0.2 мМ [2–3].

Литература

1. J. Zhang, J. Chen, Z. Liang, C. Zhao, Chemistry&Biodiversity, 2014, 11, 32-33
2. M.A.Dubinnyi, D.I. Osmakov, S.G. Koshelev, S.A. Kozlov, Ya. A. Andreev, N.A. Zakaryan, I.A. Dyachenko, D.A. Bondarenko, A.S. Arseniev, Eu.V. Grishin, J. Biol. Chem. 2012, 287, 32993-33000
3. Д.И. Осмаков, С.Г. Кошелев, О.А. Белозерова, В.С. Кублицкий, Я.А. Андреев, Е.В. Гришин, С.А. Козлов, Биоорганическая химия 2015, 41, 5, 606-611

ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ 30S ИНИЦИАТОРНОГО КОМПЛЕКСА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ТРАНСЛЯЦИОННЫХ ФАКТОРОВ МЕТОДАМИ МИКРОТЕРМОФОРЕЗА И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ ФЛУОРИМЕТРИИ

Д.С. Виноградова[1,4], П.С. Касацкий[1], Е.М. Максимова[1,2], Jelica Gencel[3], Pohl Milón, А.Л. Коневега[1,2]
[1]Петербургский институт ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт», Отделение молекулярной и радиационной биофизики, Гатчина; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия; [3]School of Medicine, Faculty of Health Sciences, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas – UPC, Lima, Peru; [4]Нанотемпер Технолоджис Рус, Санкт-Петербург, Россия

Ключевые слова: 30S инициаторный комплекс, микротермофорез, дифференциальная сканирующая флуориметрия С образования 30S инициаторного комплекса (30SIC) начинается процесс перевода генетической информации с матричной РНК (мРНК) в белки. Во время инициации специализированная транспортная РНК (fMet-tRNAfMet) связывается с инициаторным кодоном мРНК в Р-сайте 30S субъединицы рибосомы. За точность и эффективность данного процесса отвечают инициатор-

ные факторы IF1, IF2, IF3. В данной работе для изучения образования инициаторного комплекса (30SIC) и стабильности трансляционных факторов впервые были применены методы микротермофореза (МТФ) и дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ). Метод МТФ позволяет измерять аффинности между макромолекулами, используя изменения подвижности молекул в микроградиенте температуры. При образовании комплекса изменяется размер, заряд и степень гидратирования макромолекул. МТФ показывает зависимость образования 30SIC от всех лигандов, а также выделяет ключевую роль GTP в селекции fMet-tRNAfMet. Наиболее стабильной формой тройного комплекса IF2-GxP-fMet-tRNAfMet является форма IF2-GDP-fMet-tRNAfMet. Аффинность IF2 к инициаторной тРНК в присутствии GTP и GDP, измеренная методом МТФ, KD ≈ 11 μM и KD ≈ 16 μM соответственно. Температура плавления наименее стабильной GTP формы IF2 отличается на 30C по сравнению с ppGpp-формой, которая, является наиболее термостабильной. Термостабильность элонгационного фактора EF-G практически не зависит от его связывания с каким-либо нуклеотидом. Мы рассматриваем новое применение метода МТФ для изучения молекулярного механизма биосинтеза белка. Кроме того, данная технология может быть использована для селекции новых ингибиторов инициации трансляции (потенциальных антибиотиков), действующих на образование 30SIC. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-14-01416.*

ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ВОСПАЛЕНИЯ И НЕОАНГИОГЕНЕЗА

С.Ш. Гапизов[1,2], Л.Е. Петровская[1], Л.Н. Шингарова[1], Е.А. Крюкова[1], С.А. Якимов[1], Е.В. Свирщевская[1], Д.А. Долгих[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Хронические воспалительные и онкологические заболевания представляют собой серьезную проблему для современной медицины. Оба процесса характеризуются неоангиогенезом в очагах патогенеза, который сопровождается повышенной экспрессией на поверхности эндотелиальных клеток αvβ3-интегрина. Вследствие этого, происходит формирование новых кровеносных сосудов, которые вносят существенный вклад в дальнейшее усиление воспаления и опухолевого роста благодаря дополнительному поступлению питательных веществ и клеток иммунной системы. Препараты для нейтрализации αvβ3-интегрина и других медиаторов воспаления и неоангиогенеза могут быть получены на основе каркасного белка 10 домена фибронектина III типа человека (10Fn3). С целью увеличения времени циркуляции в организме нами сконструированы гибриды искусственного αvβ3-интегрин-связывающего белка (IBFn3) с альбумин-связывающим доменом (ABD). Проведена оптимизация экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E. coli*. Варианты с различным расположением партнеров и различной длиной линкера очищены методом Ni-аффинной хроматографии. Продемонстрировано, что увеличение длины линкера между белками-партнерами способствует лучшей растворимости гибридов и повышению уровня связывания с человеческим сывороточным альбумином (HSA). Гель-фильтрационный анализ показал, что полученные гибриды представлены в мономерной форме. Методом иммуноферментного анализа было установлено, что гибрид IBFn3-ABD лучше связывается с альбумином человека (HSA), чем ABD-IBFn3. Образование комплексов данных гибридов с HSA также продемонстрировано методами гель-фильтрационного анализа и металл-аффинной хроматографии с последующим электрофорезом. Проводится сравнение времени циркуляции полученных гибридов в кровотоке мышей, а также исследование их биораспределения по органам, для чего будет получена флуоресцентная производная. *Работа проводится при поддержке программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ СКЛОННОСТИ АМИНОКИСЛОТ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ

Дж. А. Кереселидзе, Г. Микучадзе
Тбилисский государственный университет им. И. Джавахишвили, Тбилиси, Грузия

С целью количественного описания образования пептидной связи между парами аминокислот была построена формула для параметра склонности образования пептидной связи (Kp), которая является функцией шести переменных: длин и порядков CO и NH (RCO, RNH, PCO, PNH), энергия активации (ΔE #) и разность между зарядами атома углерода карбонильной группы и атома азота аминогруппы (Δq). Эти параметры были рассчитаны современным методом квантовой химии теории функционала плотности (ТФП).

ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКА АМИКУМАЦИНА А НА РАЗЛИЧНЫЕ ЭТАПЫ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА НА ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ РИБОСОМАХ

Е.М. Максимова[1,2], Д.С Виноградова[1,2], Е.В. Полесскова[1], П.С.Касацкий[1], И.А. Остерман[3], О.А Донцова[3], П.В. Сергиев[3], А.Л. Коневега[1,2]
[1]Петербургский институт ядерной физики, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; [3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Антибиотик амикумацин А обладает широким спектром действия. Так, для него были выявлены антимикробные, противовоспалительные и даже противоопухолевые эффекты. Однако, молекулярный механизм его действия до сих пор не был изучен. Согласно данным рентгеноструктурного анализа рибосомного комплекса с амикумацином А, антибиотик связывается в Е сайте 30S субчастицы рибосомы, образуя контакты с 16S рРНК и мРНК, но не взаимодействуя с тРНК [1]. Кроме того, были выявлены мутации (ins544K, G542V и G581A) в IV домене элонгационного фактора EF-G, катализирующего транслокацию рибосомы, которые компенсируют ингибирующее действие антибиотика. В нашей работе мы показали, что, на этапе инициации, амикумацин А значительно снижает эффективность образования 30S инициаторного комплекса, препятствуя встраиванию инициаторной тРНК и нарушает ассоциацию рибосомных субчастиц. Амикумацин А не меняет скорость связывания аминоацил-тРНК в А сайт рибосомы и не оказывает влияние на образование пептидной связи, однако, изменяет конформацию связанной аминоацил-тРНК в А сайте рибосомы. На этапе транслокации он значительно снижает скорость перемещения пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы и оказывает влияние на положение акцепторного конца пептидил-тРНК в районе пептидилтрансферазного центра. Кроме того, присутствие антибиотика в рибосоме приводит к увеличению аффинности деацилированной тРНК к Е сайту. Также изучены кинетические аспекты компенсаторного механизма мутаций ins544K, G542V и G581A элонгационного фактора EF-G на присутствие амикумацина А в рибосоме. Как оказалось, указан-

ные мутации приводят к существенному замедлению движения D-петли пептидил-тРНК при ее перемещении из A в P сайт рибосомы и не влияют на передвижение ее акцепторного конца в пептидилтрансферазном центре. В присутствии антибиотика, наличие таких мутаций в элонгационном факторе EF-G способствует сохранению эффективности синтеза белка, в то время как наличие только интактной формы EF-G значительно ее понижает. Таким образом, механизм ингибирования трансляции бактериальной рибосомы амикумацином A, вероятно, связан со стабилизацией мРНК на 30S субчастице, которая приводит к нарушению образования инициаторного комплекса и к нарушению передвижения мРНК-тРНК комплекса при транслокации. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-14-01416.*

Литература

1. Polikanov et al., Mol. Cell, 56, 531-540 (2014).

КОНКУРС МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКИ АНТИТЕЛ С ЗАДАННЫМИ СВОЙСТВАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИТОХРОМА B5 В КАЧЕСТВЕ БЕЛКА СЛИЯНИЯ

Д.О. Дормешкин, А.А. Гилеп, С.А. Усанов
Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Несмотря на существование широкого разнообразие экспрессионных систем для получения фрагментов антител в бактериальной системе, данная задача по-прежнему остается актуальной, в виду отсутствия универсального подхода, позволяющего эффективно экспрессировать функционально-активные фрагменты антител различной природы, осуществлять мониторинг этого процесса в реальном времени и характеризовать полученные фрагменты антител в сложных смесях. Целью данной работы являлось создание сшитого белкового комплекса, который бы позволял одновременно визуализировать процесс экспрессии фрагментов антител в бактериальной системе и увеличить их выход за счёт повышения растворимости. В качестве белка слияния нами был использован гемопротеин красного цвета - цитохром b5, который обладает высокой растворимостью, малым размером (14 кДа) и хорошо экспрессируется в бактериальной системе *Escherichia coli*. Полученные белки слияния Fab и scFv фрагментов антител с цитохромом b5 имеют характеристический спектр поглощения гемопротеина с максимум на 413 нм в окисленной ($Fe3^+$) форме при высоком значение коэффициента молярной экстинкции $\varepsilon 413=117\ mM^{-1}cm^{-1}$ и обладают устойчивым красным цветом. Было отмечено троекратное увеличение выхода рекомбинантных антител (до 6 мг/л) в случае использования цитохрома b5 как белка слияния, по сравнению с экспрессией аналогичных фрагментов в тех же условиях. Полученные scFv-b5 и Fab-b5 белки слияния сохраняют антиген-связывающую активность. Регистрация дифференциального спектра поглощения (A424-413) делает возможным количественно определять содержание белка слияния независимо от его природы и аминокислотного состава. Измерение разностного спектра позволяет минимизировать вклад других хромофорных групп, которые могут поглощать в этом же регионе. Используя эту технику становится возможным определять концентрацию антител, независимо от их природы, в сложных смесях и мутных растворах – лизатах, мицеллах и даже живых клетках. Так как максимум поглощения в регионе Соре зависит от окислительно-восстановительного состояния гемопротеина в белке антитело-цитохром b5, использование данной системы позволяет оценивать относительной окислительно-восстановительный потенциал окружения фрагмента антитела измерением соотношения оптического поглощения на 413 нм и 424 нм.

УЛУЧШЕННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ П-НИТРОАНИЛИДОВ ПЕПТИДОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОГО ПЕПТИДНОГО СИНТЕЗА

Н.А. Казьмина[1,2], А.В. Колесниченко[1,2], А.А. Чистов[1,3], С.С Кузнецова[1], А.В. Таланова[1], Р.Г. Вахренев[4], М.В. Мельникова[1]
[1]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; [2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [4]Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Разработан способ получения п-нитроанилидов пептидов с помощью твердофазного пептидного синтеза, отличающийся от описанного в литературе применением адсорбционной хроматографии на полистирол-дивинилбензольном носителе Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad Laboratories) вместо высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе. п-Нитроанилиды ряда пептидных субстратов протеаз получали твердофазным синтезом на тритил-замещенной смоле с присоединенным остатком п-фенилендиамина. Снятые со смолы п-аминоанилиды пептидов окисляли в мягких условиях смесью сульфата и надсульфата калия (Oxone©), после чего полученные п-нитроанилиды очищали от окислителя адсорбционной хроматографией на Bio-Beads SM-2. Выходы пептидов на стадии хроматографии на Bio-Beads SM-2 составляли 65–75%, что превышает выходы тех же пептидов при очистке ВЭЖХ (около 50%). Показано, что необходимым условием хорошей адсорбции пептидов на Bio-Beads SM-2 является наличие в пептидах незамещенной фенильной группы. Были получены 6 п-нитроанилидов пептидов в виде высокоочищенных препаратов (степень чистоты не ниже 95% по данным аналитической ВЭЖХ с УФ- и масс-спектрометрической детекцией), из них 3 – субстраты тромбина, для ферментативного гидролиза которых были определены кинетические константы Км и kcat и сопоставлены с имеющимися в литературе. Разработанный способ очистки п-нитроанилидов пептидов позволяет удешевить и ускорить получение этих хромогенных субстратов протеаз с помощью твердофазного синтеза, а также проводить их множественный параллельный синтез для исследования субстратной специфичности ферментов. *Работа выполнена в рамках Государственного задания, тема № 0518-2014-0003 «Поиск фармакологических мишеней и создание биологически активных соединений».*

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ. ВЗАИМОСВЯЗЬ ‘СТРУКТУРА–ФУНКЦИЯ’

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

KINETICS OF PROTEIN AGGREGATION

T.P.J. Knowles[1,2]
Department of Chemistry and Centre for Protein Misfolding Diseases, University of Cambridge, Lensfield Road, CB2 1EW, Cambridge, UK;
[2]Cavendish Laboratory, University of Cambridge JJ Thomson Avenue, CB3 0HE, Cambridge, UK

Filamentous protein aggregation underlies a number of functional and pathological processes in nature. This talk focuses on the formation of amyloid fibrils, a class of beta-sheet rich protein filament. Such structures were initially discovered in the context of disease states where their uncontrolled formation impedes normal cellular function, but are now known to also possess numerous beneficial roles in organisms ranging from bacteria to humans. The formation of these structures commonly occurs through supramolecular polymerisation following an initial primary nucleation step. In recent years it has become apparent that in addition to primary nucleation, secondary nucleation events which are catalysed the the presence of existing aggregates can play a significant role in the dynamics of such systems. This talk describes our efforts to understand the nature of the nucleation processes in protein aggregation as well as the dynamics of such systems and how these features connect to the biological roles that these structures can have in both health and disease. A particular focus will be on the development of new microfluidics approaches to study heterogeneous protein self-assembly and their application to explore the molecular determinants of amyloid formation from peptides and proteins.

ОЛИГОМЕРЫ – СТРОИТЕЛЬНЫЕ БЛОКИ ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ ФИБРИЛЛ

О.В. Галзитская, Н.В. Довидченко, А.В. Глякина, А.К. Сурин, М.Ю. Суворина, О.М. Селиванова
Институт белка, РАН, Пущино, Россия

Как показали недавние исследования – амилоидообразование в некоторых случаях является патологическим процессом (образование бляшек в мозгу при болезни Альцгеймера), в то время как в других случаях может являться адаптационной особенностью организма. По упрощенной схеме процесс формирования фибрилл проходит в три основные стадии: измененное состояние мономера, формирование олигомерной структуры и образование зрелых фибрилл. Самый загадочный момент в этой схеме – процесс перехода олигомера в зрелую фибриллу. Вопрос о размере зародыша фибрилл остается открытым. Изучение амилоидных структур и процесса их формирования были проведены для синтетических и рекомбинантных препаратов Aβ40 и Aβ42. Стоит отметить, что размеры ядер (как первичной, так и вторичной нуклеации) для агрегатов Aβ42 пептида оказались больше, чем для агрегатов Aβ40 пептида. Так, ядро фибриллы Aβ42 равно 3 мономерам, а ядро вторичной нуклеации 2, в то время как для фибрилл Aβ40 размеры ядер равны 2 и 1 мономерам. Одним из аспектов изучения амилоидогенеза является определение участков белковой цепи, формирующих остов амилоидной фибриллы. Нами были теоретически предсказаны амилоидогенные участки пептида Aβ40, способные формировать амилоидную структуру – это участки 16–21 и 32–36 а.о. При помощи метода тандемной масс-спектрометрии эти участки были определены экспериментально. Показано, что участки пептида Aβ40 с 16 по 22 и с 28 по 40-й а.о. устойчивы к воздействию протеаз, т.е. есть входят в остов амилоидной фибриллы. Полученные нами результаты хорошо коррелируют с результатами теоретического предсказания. Детали механизма формирования фибрилл оказались довольно необычными в выбранных нами экспериментальных условиях. Оказалось, что мономером фибриллы служит не одиночный пептид, а олигомер, состоящий из нескольких пептидов, уложенных в виде кольца (4-6 молекул). Такой первичный олигомер является основой для образования более крупного олигомера. В свою очередь олигомер, состоящий из нескольких первичных олигомеров, является основным строительным блоком для формирования зрелых фибрилл. Именно такие кольцевые олигомеры и зрелые фибриллы, состоящие из кольцевых олигомеров, наблюдаются с помощью метода электронной микроскопии.

ПОВЕРХНОСТЬ РАЗДЕЛА ФАЗ ВОДА–СТЕКЛО КАК ВОЗМОЖНОЕ МЕСТО ОБРАЗОВАНИЯ ЗАРОДЫШЕЙ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ

В.А. Балобанов, А.И. Турчина, И.А. Елисеева, В.Е. Бычкова
Институт белка РАН, Пущино, Россия

Амилоидная агрегация белков является одним из наиболее исследуемых направлений молекулярной биологии и биофизики. Ключевым событием процесса амилоидообразования является появление первых зародышей амилоидной структуры. Существуют определённые аналогии между процессами амилоидной агрегации и кристаллизации. В обоих случаях раствор является пересыщенным, и появление затравки новой фазы приводит к лавинообразному переходу растворённого белка в кристаллы или амилоидные фибриллы. Спонтанное появление новой фазы имеет малую вероятность. Однако, неоднородности в среде способны инициировать это событие. В условиях экспериментов по исследованию амилоидной агрегации белков такой неоднородностью может служить поверхность раздела фазы раствора и стенки кюветы или пробирки, в которой он находится. В данной работе проведено спектральное и микроскопическое исследование агрегации А-бета пептида на поверхности стекла. Экспериментально показано, что стеклянная поверхность может сорбировать молекулы А-бета пептида и тем самым приводить к увеличению их способности к агрегации, в том числе и амилоидной. Появление фазы сорбированного белка на поверхности может влиять на агрегацию пептидов в толще раствора. Таким образом, поверхность раздела фаз вода-стекло может служить местом инициации роста амилоидных фибрилл и условиях исследования *in vitro*. *Работа поддержана грантом РНФ 14-24-00157.*

ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ НОВЫХ ТРАНСАМИНАЗ IV ФОЛДА, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ РАЗВЕТВЛЕННЫХ L-АМИНОКИСЛОТ И R-АМИНОВ

А.Ю. Николаева[1,2], Е.Ю. Безсуднова[1], К.М. Бойко[1,2], Д.В. Диброва[3], Т.В. Ракитина[2], В.О. Попов[1,2]
[1]Институт биохимии им. Баха, ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН; [2]Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт"; [3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

R-селективные трансаминазы являются перспективными биокатализаторами стереоселективного аминирования кетонов для получения оптически чистых (R)-аминов, являющихся строительными блоками в синтезе ряда фармпрепаратов. С целью идентификации новых потенциально R-селективных аминотрансфераз в геномах термофильных бактерий и архей в нашей лаборатории был проведен биоинформатический анализ, в ходе которого были выявлены последовательности, кодирующие трансаминазы IV фолд-типа с нарушением характеристических мотивов, определяющих субстратную специфичность трансаминаз. Синтетические гены двух отобранных последовательностей – из термофильной бактерии *Thermobaculum terrenum* и археи *Methanoccocus vannielii* были клонированы в *E. coli*. Продукты экспрессии полученных генов были выделены и биохимически охарактеризованы. Проведено определение pH- и температурного оптимума реакции трасаминирования, субстратной специфичности, а также R-селективности в отношении (R)-альфа-метилбензиламина. Показано, что оба фермента активны с разветвленными L-аминокислотами, проявляют невысокую активность с ароматическими аминокислотами и неактивны с D-аланином. В качестве кето- акцепторов оба фермента способны утилизировать альфа-кетоглутарат, кето-аналоги разветвленных аминокислот и триптофана, а также пируват и оксибутират. Активность в отношении (R)-MBA при 50°C pH 9,0 составляет 0,5 Е/мг мин для *Thermobaculum terrenum* и 0,06 Е/мг мин для *Methanoccocus vanielli*. Данное значение ниже такового для известных эукариотических R-селективных трансаминаз (1,83 Е/мг для *Aspergilius terreus*), но существенно выше классических BCAT–трансаминаз. Соответствующая активность в отношении (S)-MBA не превышает 10 Е/мг для обоих ферментов. Для обоих ферментов методом рентгеноструктурного анализа была установлена пространственная структура с разрешением 1.5 Å. В настоящее время ведется работа по получению мутантных форм фермента из *Thermobaculum terrenum* с целью увеличения его активности с (R)-MBA. *Работа выполнена при частичной поддержке гранта РНФ 14-24-00172.*

МЕТОДЫ ЯМР В ИЗУЧЕНИИ ЦИНК-ЗАВИСИМОЙ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ ФРАГМЕНТОВ БЕТА-АМИЛОИДА

В.И. Польшаков[1], А.Б. Манцызов[1], В.А. Митькевич[2], С.А. Козин[2], А.А. Макаров[2]
[1]Центр магнитной томографии и спектроскопии, Факультет фундаментальной медицины, МГУ им.М.В. Ломоносова; [2]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Цинк-индуцируемая олигомеризация β-амилоидного пептида (Aβ) является отличительной молекулярной особенностью развития болезни Альцгеймера (БА). Взаимодействие ионов цинка с Aβ опосредуется N-концевым доменом Aβ(1-16). Мутации и модификации в области металлсвязывающего домена Aβ(1-16) кардинально влияют на способность Aβ к цинк-зависимой олигомеризации путем изменения интерфейса взаимодействия пептидных цепей. Взаимодействие ионов цинка с металлсвязывающими доменами нескольких изоформ Aβ было изучено методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Спектроскопия ЯМР позволяет определить центры хелатирования ионов металла, стехиометрию взаимодействия цинк-пептид, структуру образующихся комплексов, динамические процессы, сопровождающие образование комплексов. Обнаружена цинк-индуцированная димеризация нативной изоформы Aβ(1-16) и фрагментов, несущих семейную английскую (H6R) и тайваньскую (D7H) мутации. Цинк-индуцированное взаимодействие пептидных цепей контролируется конформационными изменениями минимального сайта связывания ионов цинка 6-HDSGYEVHH-14. Открыта новая топология биядерного взаимодействия ионов цинка с пептидными цепями фрагментов D7H-Aβ и определена структура высокого разрешения в растворе образующихся димеров. Обнаружен новый сайт связывания ионов цинка в пептиде, содержащим фосфорилированный остаток Ser8 (pS8). Для выявления механизма устойчивости крыс к болезни Альцгеймера определена структура металлсвязывающего домена бета-амилоида крысы в комплексе с ионами цинка. Показано, что цинк-индуцированная олигомеризация всех изученных фрагментов Aβ протекает по одному и тому же молекулярному механизму: (i) образование димера пептида с участием первичного цинк-связывающего сайта 11-EVHH-14; (ii) структурная перестройка аминокислотных остатков H6, H13, H7, pS8 и E3 в различных изоформах Aβ, приводящая к формированию второго цинк-зависимого интерфейса в каждой пептидной цепи; (iii) образующийся димер становится зародышем последующей цинк-зависимой олигомеризации. Поиск низкомолекулярных соединений, способных связываться с цинк-зависимым интерфейсом взаимодействия фрагментов Aβ может привести к созданию препаратов для лечения БА. *Работа была поддержана Российским научным фондом (гранты 14-24-00100 и 14-14-00598).*

ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)-ПОЛИМЕРАЗА 1 И ЕЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С НУКЛЕОСОМАМИ: АНАЛИЗ МЕТОДОМ FRET-МИКРОСКОПИИ ОДИНОЧНЫХ ЧАСТИЦ

А.В. Феофанов[1,2], Д.Ч. Султанов[1], Н.С. Герасимова[1], К.С. Кудряшова[1,2], Н.В. Малюченко[1], Е.Ю. Котова[3], В.М. Студитский[1,3], М.П. Кирпичников[1,2]
[1]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [3]Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA

Реорганизация ДНК в нуклеосомах в процессах репарации, репликации и транскрипции происходит при участии различных белковых факторов. Исследование структуры белок-нуклеосомных комплексов является сложной задачей, которая может быть частично решена с помощью нового экспериментального подхода, основанного на использовании Фёрстеровского резонансного переноса энергии в комбинации с микроскопией одиночных частиц (spFRET-микроскопии) и флуоресцентно-меченых нуклеосомных наночастиц. Нуклеосомные наночастицы формируются на основе коровых гистонов и короткой ДНК с высокоаффинной нуклеосом-позиционирующей последовательностью. Флуорофоры (донор и акцептор) вводятся в соседние витки нуклеосомной ДНК в проксимальной, медиальной или дистальной областях нуклеосомы. spFRET-анализ проводится в сильно разбавленных растворах путем измерения флуоресценции от свободно диффундирующих одиночных нуклеосом, пересекающих фокальной объем микроскопа, и выявления таким способом изменений в упаковке ДНК. Поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP1) взаимодействует с нуклеосомами в процессе репарации ДНК и транскрипции, но механизм этого процесса неизвестен. Мы докладываем о структурных особенностях комплексов PARP1 с нуклеосомами,

выявленных с помощью spFRET-микроскопии. Связывание PARP1 с двухцепочечным разрывом вблизи коровой части нуклеосомы вызывает увеличение расстояния между соседними витками нуклеосомной ДНК, которая обнаруживается и в проксимальной, и в медиальной, и в дистальной частях нуклеосомы. Это дестабилизирующее нуклеосому воздействие PARP1, которое происходит без потери гистонов, ослабляется, но сохраняется во время процесса поли(АДФ)-рибозилирования PARP1. Структура нуклеосом восстанавливается после диссоциации авто-поли(АДФ)-рибозилированного PARP1. Связывание противоопухолевого агента олапариба в каталитическом центре PARP1 не мешает образованию комплексов нуклеосома-PARP1 и не изменяет PARP1-индуцированной реорганизации нуклеосомы. В тоже время, олапариб блокирует NAD+-опосредованную диссоциацию PARP1 путем ареста комплекса нуклеосома-PARP1 с перестроенной нуклеосомной структурой. *Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН и грантом РФФИ 17-54-33045.*

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ ТРАНСКРИПЦИИ ХРОМАТИНА

О.С. Соколова[1], О.И. Волох[1], Н.С. Герасимова[1], Г.А. Армеев[1], А.К. Шайтан[1], В.М. Студитский[1,2]
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия; [2]Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA

Формирование хроматина является способом компактизации и естественной регуляции ДНК эукариот, обеспечивающим нормальное протекание клеточных процессов, и, как следствие, существование организма в целом. В результате нарушения процессов транскрипции хроматина могут происходить нарушения клеточного равновесия, сопряженного с патологическими изменениями в различных системах организма, что часто приводит к развитию онкологических заболеваний и преждевременному старению. Установление механизмов регуляции транскрипции на стадии элонгации позволяет выявить ключевые стадии, на которых происходят нарушения, установить роль различных компонентов-участников процесса транскрипции хроматина, включая белки-шапероны, в развитии патологий, понять причины их возникновения и предложить новые эффективные способы коррекции этих патологий. Мы использовали электронную микроскопию макромолекул для изучения структуры интермедиатов, образующихся при транскрипции нуклеосомной ДНК. Были впервые получены трехмерные структуры элонгационных комплексов РНК полимеразы E. Coli, остановленных в положениях (+24), (+39) и (+42) при транскрипции нуклеосомной ДНК. Также мы исследовали влияние введения однонитевого разрыва в нематричную цепь ДНК на трехмерную структуру элонгационных комплексов. Для интерпретации полученных структур, с помощью метода компьютерного моделирования были построены модели исследуемых комплексов. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031). Электронная микроскопия проводилась с использованием уникальной научной установки "Трёхмерная электронная микроскопия и спектроскопия" биологического факультета МГУ в составе ЦКП МГУ «Электронная микроскопия в науках о жизни». Расчеты проводили с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра «Ломоносов» в МГУ.*

МАДУМИЦИН II ИНГИБИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ, ПРИВОДЯ ПЕПТИДИЛТРАНСФЕРАЗНЫЙ ЦЕНТР В НЕАКТИВНОЕ СОСТОЯНИЕ

И.А. Остерман[1,2], Н.Ф. Хабибуллина[3], Е.С. Комарова (Андреянова)[4], П. Касацкий[5], В.Г. Карцев[6], А. Богданов[1], О.А. Донцова[1,2], А.Л. Коневега[5], П.В. Сергиев[1,2], Ю.С. Поликанов[3,7]
[1]Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, [2]Институт науки и технологий Сколково, Московская область, Россия; [3]Отдел биологических наук, Иллинойский университет, Чикаго, США; [4]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [5]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина; [6]Interbioscreen Ltd, Черноголовка, Московская обл.; [7]Отдел медицинской химии и фармакогнозии, Иллинойский университет, Чикаго, США

Появление бактерий с множественной лекарственной устойчивостью ограничивает эффективность широко используемых антибиотиков, что вызывает интерес к пересмотру более старых и слабо изученных лекарств. Стрептограмины А представляют собой класс ингибиторов синтеза белка, которые воздействуют на пептидилтрансферазный центр на большой субъединице рибосомы. В этой работе мы изучили механизм действия мадумицина II, аланинсодержащего стрептограмина А, в контексте функциональной 70S рибосомы, содержащей тРНК. Мадумицин II ингибирует образование первой пептидной связи. В его присутствии возможно исходное связывание тРНК в А- и Р-сайтах рибосомы, но предотвращено правильное размещение их ССА-концов, что делает невозможным образование пептидной связи. Мы также обнаружили ранее невидимую перегруппировку нуклеотидов U2506 и U2585 23S рРНК, что привело к образованию вобл пары U2506 • G2583. Представленные структурные и биохимические данные расширяют наши знания о фундаментальных механизмах, с помощью которых ингибиторы пептидилтрансферазы модулируют каталитическую активность рибосомы. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-24-00061*.

СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА 11-ГЕМОВОГО ЦИТОХРОМА С, ВОВЛЕЧЕННОГО ВО ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ НА НЕРАСТВОРИМЫЕ АКЦЕПТОРЫ У ТЕРМОФИЛЬНОЙ ГРАМ-ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *CARBOXYDOTHERMUS FERRIREDUCENS*

Е.М. Осипов, Т.В. Тихонова, С.Н. Гаврилов, И.М. Елизаров, Н.И. Дергоусова, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.О. Попов
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Микробные сообщества активно используют нерастворимые оксиды металлов в качестве терминальных акцепторов электронов при росте в анаэробных условиях. Механизм переноса электронов от клетки на нерастворимый внеклеточный акцептор – оксид металла подробно изучен для грам-отрицательных микроорганизмов, для которых показана ключевая роль в этом процессе цитохромов С, связанных с внешней клеточной мембраной. Грам-положительные микроорганизмы имеют иное устройство клеточной оболочки, в которой отсутствуют периплазма и внешняя мембрана и, по-видимому, имеют отличную от грам-отрицательных бактерий организацию цепей переноса электронов на нерастворимые внеклеточные акцепторы. К настоящему времени механизмы диссимиляторного восстановления нерастворимых соединений металлов грам-положительными бактериями почти не изучены. В настоящей работе мы представляем структурную характеристику 11-гемового цитохрома с из термофильной грам-положительной Fe(III)-восстанавливающей бактерии *Carboxydothermus ferrireducens*, имеющей типичную для грам-положительных бактерий клеточную стенку, окруженную S-слоем. Предполага-

ется, что исследуемый цитохром является одним из ключевых белков, обеспечивающих перенос электронов от респираторной электрон-транспортной цепи на внеклеточные акцепторы, такие как оксид Fe(III). 11-Гемовый цитохром был выделен и закристаллизован, пространственная структура была решена методом MAD с использованием аномального сигнала от атомов Fe и уточнена с разрешением 2,5 Å. Белок имеет неописанную ранее укладку полипептидной цепи, состоит из 5 доменов и содержит 11 гемов, образующих электрон-транспортную цепь длиной до 70 Å. Второй гем в электрон-транспортной цепи координирован N-концевой NH2-группой и может быть отнесен к типу f. Шесть гемов образуют 2 копланарные группы по три гема в каждой, похожие на каталитические центры некоторых гем-содержащих оксидаз. Один гем в каждом триплете имеет свободную аксиальную позицию, доступную из растворителя. На поверхности около 7го гема имеется небольшая полость со связанным ионом Fe. В структуре белка был идентифицирован домен, отвечающий за связывание с S-слоем, окружающим клеточную стенку. Роль 11-гемового цитохрома с во внеклеточном электронном транспорте обсуждается. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-24-00172.*

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

В.З. Плетнев, Е.А. Горячева, И.В. Артемьев, С.Ф. Архипова, Н.В. Плетнева
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Зеленые флуоресцентные белки (GFP) из морских организмов и их синие, желтые, красные и дальне красные генно-инженерные варианты проявляют экстраординарную способность спонтанно генерировать флуоресценцию. Благодаря этому свойству GFP-подобные флуоресцентные белки (ФБ) нашли широкое применение в клеточной биологии, биотехнологии и биомедицине в качестве биомаркеров для визуализации процессов в живых организмах. В 2008 г была присуждена Нобелевская премия по химии за «Открытие и развитие способов применения зеленого флуоресцентного белка». И хотя основной научный интерес связан с применением ФБ в качестве светящихся репортеров внутриклеточных процессов, также исключительно важным является изучение механизмов синтеза хромофоров и их взаимодействий с аминокислотным окружением, которые и определяют разнообразие спектральных свойств ФБ. В большинстве случаев, практическое применение ФБ требует разработки мутантных мономерных вариантов с эмиссией в дальне-красной области спектра, обладающих высоким квантовым выходом, высокой скоростью созревания хромофора и фотостабильностью. В этой связи, важно понять каким образом особенности стереохимии белка определяют его фотофизические свойства. Эти знания необходимы для разработки рационального подхода по созданию улучшенных вариантов белков, удовлетворяющих требуемым критериям для практического использования. Рентгеноструктурные исследования пространственной организации ФБ на атомном уровне дают важный вклад для успешного решения этой задачи. *Работа поддержана фондом РНФ (проект 17-74-20100).*

ДВА РАКУРСА ПРОБЛЕМЫ СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКА

А.В. Финкельштейн[1], А.Я. Бадретдинов[2], О.В. Галзитская[1], Д.Н. Иванков[1,3,4], Н.С. Богатырева[1,3,4], С.А. Гарбузинский[1]
[1]Институт белка РАН, Пущино, Московская область, Россия; [2]National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; [3]Bioinformatics and Genomics Programme, Centre for Genomic Regulation (CRG), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain; [4]Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain

Способность белков спонтанно формировать свои пространственные структуры - давняя загадка молекулярной биологии. Измеренные скорости сворачивания однодоменных белков лежат в диапазоне от микросекунд до часов: разница – 9–10 порядков величины – та же, что между продолжительностью жизни комара и возрастом Земли. В этом докладе описаны физические теории оценки времени преодоления свободно-энергетического барьера, разделяющего глобулярные нативные (N) и развернутые (U) состояния белковых цепей, – преодоления как в направлении "от U к N", так и "от N к U. Важную роль в теории играет точка термодинамического (и кинетического) равновесия между нативным и развернутым состоянием цепи: здесь она получает простейший вид. Как ни парадоксально, теоретическую оценку времени сворачивания (перехода "от U к N") легче получить из анализа разворачивания белка (перехода "от N к U"), потому что легче наметить хороший путь разворачивания любой структуры, чем хороший путь, ведущий к стабильной укладке, которая пока неизвестна самой белковой цепи. А так как скорости прямых и обратных реакций равны в точке равновесия (что следует из физического принципа детального равновесия), то, найдя время перехода "от N к U", легко найти и время сворачивания (перехода "от U к N") - в хорошем согласии с опытом. Комплементарный (к теории скоростей переходов) анализ объема укладок цепи, который нужно, идя "от U к N", просканировать – на уровне формирования и упаковки вторичных структур – в поисках наиболее стабильной структуры белка, очерчивает верхний предел времен сворачивания и приводит к аналогичным, хотя и менее точным результатам. Показано, что обе теории (базирующиеся как "от N к U", так и "от U к N" переходах) хорошо очерчивают наблюдаемый диапазон скоростей сворачивания однодоменных глобулярных белков. Кроме того, они предсказывают максимальный размер белковых доменов, складывающихся под термодинамическим (а не кинетическим) контролем, и объясняют наблюдаемый максимальный размер самоорганизующихся белковых доменов. *Первая часть этой работы (исследование переходов "от N к U") была поддержана грантами Мед. института Говарда Хьюза (США), РФФИ и Программы "Молекулярная и клеточная биология" Президиума РАН, а её вторая часть (исследование переходов "от U к N") – грантом № 14-24-00157 РНФ.*

КОЛЛЕКТИВНЫЕ КОНФОРМАЦИОННЫЕ ДВИЖЕНИЯ И ДИНАМИКА ФОЛДИНГА

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

В связи с проблемой конструирования самоорганизующихся пространственных структур на основе макромолекулярных цепей обсуждаются принципы формирования энергетического ландшафта системы с выделенным глобальным минимумом энергии. Методами ланжевеновской динамики и статистического корреляционного анализа изучена динамика процессов сворачивания полипептидов в альфа-спиральные структуры в зависимости от вязкости среды. Показано, что при эффективной вязкости среды близкой к вязкости воды за счет сил трения имеет место высокая степень корреляции поворотов по торсионным углам основной цепи. Развит метод визуализации динамики матрицы корреляции двугранных углов полипептидной цепи для контроля эффектов динамической корреляции конформационных степеней свободы. Анализ динамики матри-

цы корреляций показывает, что повороты по одноименным типам углов (φ−φ и ψ−ψ) происходят преимущественно в одном направлении. Повороты по разным типам углов (φ−ψ) преимущественно осуществляются в противоположных направлениях. Значительное уменьшение эффективной вязкости среды приводит к нарушению корреляции и стохастизации поворотов, в результате чего нарушается формирование регулярной (спиральной) вторичной структуры. Эффекты корреляции конформационных движений являются следствием действия сил вязкостного трения, что находится в согласии с изложенными с принципом минимума скорости диссипации энергии [1] и равнораспределением скоростей диссипации энергии по конформационным степеням свободы [2].

Литература

1. Шайтан К.В. // Биофизика. 2015. т.60. с.843.
2. Шайтан К.В.// Биофизика. 2017. т.62. с.5.

ОБЪЕМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ ПРИ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДАХ И СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОКАЛОРИМЕТРИЯ ПРИ ВЫСОКОМ ДАВЛЕНИИ

С.А. Потехин
Институт белка РАН, Пущино, Московская обл., Россия

Доклад посвящен использованию метода сканирующей микрокалориметрии при высоком давлении для изучения объемных изменений макромолекул при конформационных и фазовых переходах. В докладе обсуждаются термодинамические основы воздействия высокого давления на такие переходы. Представлены результаты, полученные при исследовании переходов в белках, липидах и модельных полимерах. Показано, что плавление липидов с двумя насыщенными гидрофобными “хвостами” в термодинамическом плане аналогично плавлению алканов и полиэтилена. Продемонстрированы общие закономерности плавления липидов этого структурного класса. Особое внимание в докладе уделено природе объемных изменений при переходах. Сопоставление результатов, полученных ранее на модельных полимерах, липидах и белках, позволяет оценить возможные энергетические и объемные изменения при последовательных переходах нативный белок – “сухая расплавленная глобула” – гидратированное развернутое состояние. Продемонстрировано, что использование модели переноса гидрофобных групп из неполярной жидкости в воду для оценки денатурационных объемных эффектов, вероятно, некорректно.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОПТИМИЗАЦИИ СТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКА

Н. Маркова
Malvern Instruments

Динамические взаимодействия биомолекул определяют и регулируют все биологические процессы. Стабильность и структура имеют решающее значение для функции белка. Низкая стабильность в конечном итоге приводит к ухудшению результатов экспериментов и затрудняет проведение научных исследований, а также разработку безопасных и эффективных лекарственных препаратов с коммерчески жизнеспособным сроком годности[1]. По причине сложной природы белка для характеризации и оптимизации стабильности используется ряд взаимодополняющих биофизических методов. Изучение термической стабильности биомолекул методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК)[2-4], и стабильности коллоидных систем методом динамического рассеяния света (ДРС)[5,6] и мультидетекторной гель-проникающей хроматографии (ГПХ)[7] широко применяется на ранних и поздних этапах исследований.

Метод ДСК основан на термоденатурации биомолекул. Он используется для исследования стабильности белка, оптимизации буфера и подтверждения молекулярных взаимодействий. ДСК является одним их основных методов анализа термостабильности, используемых в биофармацевтических разработках, для выбора структуры, оценки технологичности, оптимизации биопроцессов, биоподобия и сопоставимости результатов исследований.

Технологии дифференциальной сканирующей калориметрии и изотермической титрационной калориметрии[8], динамическое светорассеяние и анализ дисперсии Тейлора[9] могут быть использованы для разработки новых белковых и биоподобных лекарственных препаратов.

Литература

1. Baker M. Is There a Reproducibility Crises? Nature. 2016. V. 533, pp. 452-454
2. Johnson C. “DSC. Theory and Practice”. Malvern Whitepaper.
3. Arthur KK et al. J. Pharm. Sci.. (2015) 104: 1548–1554.
4. Markova N. Value of DSC in characterization and optimization of protein stability as compared to other thermal stability assays. Recorded Malvern webinar
5. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. Malvern Technical Note
6. Zetasizer Nano Series. Research Performance, Operational Simplicity, Application Versatility. Malvern Brochure
7. Stenson et al. Investigation of biosimilars and innovator monoclonal antibodies using multi-detection sec. Malvern poster
8. Markova N and Velazquez-Campoy A. “ITC. Theory and Practice”. Malvern Whitepaper
9. Lavoisiera A. & Schlaeppia J-M. Early Developability Screen of Therapeutic Antibody Candidates Using Taylor Dispersion Analysis and UV Area Imaging Detection. mAbs. 2015. V 7:1, pp. 77-83

КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ШАПЕРОН GroEL/ES (Hsp60/Hsp10) АССИСТИРУЕТ СВОРАЧИВАНИЕ БЕЛКОВ *IN VITRO*

Г.В. Семисотнов, Н.Ю. Марченко, В.В. Марченков
Институт белка РАН, Пущино, Россия

Белки теплового шока клеток *Escherichia coli* GroEL(Hsp60) и GroES(Hps10) и их аналоги других клеток широко известны как молекулярные шапероны, ассистирующие разнообразные клеточные процессы (такие как сворачивание и сборка белков, их деградация и трансмембранный транспорт). Взаимодействуя с ненативными (нежестко упакованными) конформационными состояниями белков, присутствующими в клетке как после завершения биосинтеза так и в результате воздействия различных клеточных стрессов и мутаций, эти шапероны препятствуют неспецифической агрегации этих состояний, фатальной для их сворачивания в нативное (функционально активное) состояние. В работе исследовано взаимодействие GroEL с денатурированными состояниями различных белков и влияние на это взаимодействие лигандов (ионов Mg, АТФ, АДФ) и кошаперона GroES. Исследовано также влияние GroEL на скорость сворачивания ряда белков in vitro. Показано, что наряду с гидрофобными взаимодействиями для образования прочного комплекса GroEL с денатурированными белками важны и элек-

тростатические взаимодействия. Взаимодействие GroEL с ранними кинетическими промежуточными состояниями в процессе сворачивания белков замедляет формирование нативной структуры этих белков, ингибируя стадию жесткой упаковки боковых групп. Лиганды (АТФ и АДФ) заметно ослабляют, а ко-шаперонин GroES практически полностью ингибирует взаимодействие GroEL с денатурированными белками. Верхняя оценка времени пребывания денатурированного белка в комплексе с GroEL в присутствии лигандов и ко-шаперона GroES определена равной 4 сек, что в 3 раза меньше времени АТФазного цикла GroEL/ES. Полученные данные свидетельствуют о том, что формирование нативной структуры денатурированных белков, взаимодействующих с GroEL, происходит не во внутренней полости комплекса GroEL с GroES, а в свободном состоянии, т.е. вне комплекса с GroEL. *Авторы благодарны Российскому научному фонду (грант № 14-24-00157) за финансовую поддержку*.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АДАПТАЦИЯ БЕЛКОВ К УСЛОВИЯМ МЕМБРАННОГО ОКРУЖЕНИЯ

А.С. Кузнецов[1,2], К.В. Смирнов[2], Р.Г. Ефремов[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [2]НИУ Высшая школа экономики, Москва, Россия

Клеточные мембраны, помимо традиционно приписываемой им барьерной роли, выполняют и не менее важную задачу – обеспечивают эффективную аккомодацию многочисленных внешних агентов, включая мембранные белки (МБ). Молекулярные механизмы подобных процессов плохо изучены, однако недавно было показано, что важнейшим свойством липидных бислоев является их динамический гетерогенный характер – работа этих сложнейших мезоскопических систем критическим образом зависит от их локальных (до ~1 нм) особенностей структуры, гидрофобных и электрических свойств и т.д. Более того, при анализе мембран необходимо учитывать параметры их динамического поведения на временах от 10 пс, включая стохастические явления. Совокупность указанных факторов представляет собой т.н. «мембранный ответ», т.е. активную реакцию водно-липидной среды на взаимодействующие с ней внешние молекулы. Таким образом, изучение белок-мембранных систем возможно лишь в случае учета взаимного влияния (адаптации) партнеров на молекулярном уровне. Одним из наиболее информативных методов решения таких задач является атомистическое компьютерное моделирование. Разработан вычислительный подход к анализу структурно-динамических параметров всех компонентов модельных мембран – МБ, липидов, воды и ионов. Установлено что локальные перестройки мембранного окружения играют важную роль в связывании мембрано-активных пептидов и периферических МБ, вызывая специфическую кластеризацию липидов и инициируя образование дефектов в мембране. Впервые показано, что липиды вносят значительный вклад в свободную энергию спонтанной димеризации МБ. Детальный баланс различных энергетических вкладов сильно зависит от состава мембраны и аминокислотной последовательности белка. Сделано предположение о том, что процесс ассоциации ТМ спиралей в липидных бислоях имеет преимущественно энтропийный характер. Таким образом, МБ и их водно-липидное окружение в равной степени определяют характер биологического поведения клеточных мембран, взаимно сильно влияя друг на друга и согласованно реагируя на внешние воздействия. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 16-04-00578), Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Программы развития ВШЭ «5-100». Расчеты проводили с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра «Политехнический» в СПбПУ.*

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ РТК, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ КЛЕТКИ

Э.В. Бочаров, Д.М. Лесовой, К.С. Минеев, О.В. Бочарова, С.А. Гончарук, К.Д. Надеждин, П.Е. Брагин, Г.В. Шаронов, П.Е. Волынский, А.А. Полянский, Р.Г. Ефремов, А.С. Арсеньев
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Рецепторные тирозинкиназы (РТК), будучи мембранными рецепторами типа I, принимают непосредственное участие в управлении развития и гомеостаза всех тканей организма человека, играя ведущую роль в процессах клеточного роста, дифференцировки и адгезии. Необходимым условием передачи биохимического сигнала через плазматическую мембрану является димеризация (и/или олигомеризация) РТК, как лиганд-зависимая, так и независимая, сопровождаемая конформационными перестройками всех доменов рецептора, включая α-спиральные трансмембранные домены (ТМД). В работе рассматриваются основные аспекты структурно-функциональной взаимосвязи для молекул РТК из подсемейств рецепторов эпидермальных факторов роста, факторов роста фибробластов и эфринов. В течение последних лет с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения в комбинации с МД-релаксацией в явно заданной мембране мы исследовали гомо- и гетеродимеризацию ТМД данных рецепторов в мембраноподобных средах (детергентных мицеллах и липидных бицеллах). Наблюдаемая при альтернативной димеризации ТМД взаимная адаптация межмолекулярных полярных и гидрофобных контактов предполагает, что физико-химические свойства липидного бислоя могут управлять специфическими спираль-спиральными взаимодействиями ТМД и, таким образом, переключать состояние рецептора. При этом патогенные мутации, обнаруженные для данных рецепторов, как правило сосредоточены в определенных участках (так называемых «горячих точках») димеризационных интерфейсов ТМД, что указывает на важность межмолекулярных взаимодействий внутри мембраны для дисфункции РТК в организме человека. Таким образом, из совокупности биофизических и биохимических данных следует, что функционирование РТК обусловливается не только белок-белковыми взаимодействиями, но и состоянием локального липидного окружения как одного из главных компонентов самосогласованной сигнальной системы. Новый липид-опосредованный механизм передачи межклеточного сигнала через мембрану дополняет молекулярные схемы функционирования РТК, предложенные ранее, и объясняет ряд парадоксов, наблюдаемых при активации рецепторов дикого типа и рецепторов с патогенными трансмембранными мутациями. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №15-04-07983-а).*

ПАРВАЛЬБУМИН, КЛАССИЧЕСКИЙ КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ

Е.А. Пермяков, С.Е. Пермяков
Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, Россия

Парвальбумин (ПА), небольшой цитозольный $Ca2^+$-связывающий белок суперсемейства EF-руки, содержится в быстрых мышцах и некоторых типах нейронов позвоночных. ПА состоит из трех структурных доменов типа EF-рука, но лишь два из них связывают ионы кальция. Нами обнаружены два уникальных структурных мотива, имеющиеся во всех известных семействах белков EF-руки, включая ПА. Эти мотивы создают два кластера из трех аминокислотных остатков каждый и являются поддерживающим каркасом для кальцийсвязывающей последовательности D×D×DG EF-руки. Микрокалориметрические измерения апо-форм двух ПА щуки не обнаруживают пиков теплопоглощения, характерных для тепловых переходов первого рода, в то время как спектральные методы регистрируют наличие индуцируемых теплом изменений белковой структуры, что является признаком фазового перехода второго рода. Нестабильность апо-ПА и наличие в них разупорядоченных областей определяются энергетически невыгодными заряд-зарядовыми взаимодействиями в $Ca2^+$-связывающих петлях белков. Механизм тепловой денатурации ПА полностью определяется связыванием катионов металлов: ПА может быть нативно разупорядоченным белком (апо-форма), упорядоченным белком мезофильной (Na^+-форма), термофильной ($Mg2^+$-форма) или даже гипертермофильной ($Ca2^+$-форма) природы. Детальное исследование влияния N-концевого ацетилирования на структурные и функциональные свойства ПА показало, что интактный и рекомбинантный дикого типа αПА крысы практически не отличаются друг от друга, в то время как интактный и рекомбинантный αПА щуки обнаруживают заметные различия в их структурных и функциональных свойствах. Ряд экспериментальных фактов показывают, что ПА может участвовать во внутриклеточных окислительных процессах. Поскольку антиоксидантная емкость ПА в условиях *in vivo* достигает уровня емкости восстановленного глутатиона, сделано предположение о том, что ПА может модулировать внутриклеточные редокс равновесия кальцийзависимым образом.

ОСОБЕННОСТИ УЗНАВАНИЯ 8-oxoG В ДНК С ПОМОЩЬЮ 8-oxoG-clamp: СТРУКТУРНАЯ ДИНАМИКА КОМПЛЕКСА hOGG1 С ДНК

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

Среди широкого спектра воздействий, которым подвержены молекулы ДНК и многих заболеваний, вызванных этими воздействиями, особенно широко представлены воздействия на ДНК активных форм кислорода, образующихся при аэробном метаболизме. Появление в генетическом материале клетки окисленных оснований приводит к дестабилизации генома. Удаление остатков 8-оксогуанина из ДНК эукариот осуществляет фермент 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза hOGG1. Показано, что каждая клетка человека содержит около 50 тысяч молекул OGG1, которые защищают геномную ДНК от накопления продуктов окисления пуринов. Лиганд 8-oxoG-clamp, изменяющий свою флуоресценцию при связывании с ДНК, содержащей 8-oxoG, ранее был предложен как сенсор для определения окисленных пуринов. В работе проведено моделирование фермент-субстратного комплекса hOGG1 с ДНК. С использованием молекулярного моделирования определены критически важные точки узнавания 8-oxoG с помощью 8-oxoG-clamp.

Полученная 3D-структура комплекса hOGG1 с ДНК и 8-oxoG-clamp и её динамика позволяют установить структурные особенности взаимодействия в фермент-субстратном комплексе в процессе узнавания повреждения. *Работа поддержана РФФИ (16-34-00771) и Министерством образования и науки РФ (Конкурс совместных лабораторий НГУ – ННЦ СО РАН) и по программе повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров (Проект 5-100). Работа выполнена в Лаборатории структурной биоинформатики и молекулярного моделирования НГУ с использованием вычислительных мощностей Сибирского суперкомпьютерного центра СО РАН www2.sscc.ru .*

НОВЫЕ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ НАНОБИОГИБРИДНЫХ СТРУКТУР: БЕЛОК–НАНОЧАСТИЦА

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

Тенденцией развития инструментов для изучения биологических систем стало получение максимальной информации о каждой локальной наноразмерной области объекта и составление трехмерных карт распределения различных физико-химических параметров (метод корреляционной микроскопии, КМ).

Мы представляем новый подход, в котором для получения структурных данных высокого разрешения использована зондовая сканирующая микроскопия, данные о составе и физико-химических параметрах основаны на применении методов оптической микроспектроскопии, для реконструкции трехмерного распределения этих данных применена механическая ультрамикротомография. Подход реализован в виде уникальной научной установки "Система зондово-оптической 3D корреляционной микроскопии" (ИБХ РАН) [1]. Идеология разработанного инструмента позволяет реализовать современные методы микроскопии и микроспектроскопии высокого и сверхвысокого разрешения. В частности, путем использования микроскопии ближнего поля (БОМ), спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) с пространственным разрешением, включая гигантское усиленное на острие КР. Анализируются пути совмещения методов КР, ГКР, БОМ с другими методами КМ, рассматриваются современные возможности КМ.

Возможности нового инструмента продемонстрированы на примере установления корреляций между флуоресцентными поляризационными свойствами жидкокристаллической среды, содержащей полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы (квантовые точки, КТ) и особенностями 3-D распределения КТ в жидкокристаллической матрице [2]. Показана возможность получения оптической информации методом SNOM с разрешением, сопоставимым с разрешением атомно-силового микроскопа [3]. Представлены данные по структуре элементов жидких биочипов для многомерной детекции диагностических маркеров: полимерных микросфер с внедренными в них КТ, органическими красителями и магнитными наночастицами.

Методы КР/ГКР использованы для изучения воздействия серебряных наночастиц (AgНЧ) на мембранный светочувствительный белок бактериородопсин (БР). Обнаружен эффект "замораживания" состояния молекул БР, локализованных в ГКР-активных областях. Показано, что вне этих областей, AgНЧ существенно изменяют параметры фотоцикла БР. Предложено объяснение эффектов, основанное на изменении распределении внутри-мембранного потенциала [4]. *Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ проект 15-04-05922 и Программы Президиума РАН №I "Наноструктуры".*

Литература

1. http://ckp-rf.ru/usu/486825/.
2. Mochalov K.E., et al. (2013) ACS Nano, 7(10), 8953-8962.
3. Ефимов А.Е. и др. (2016) Письма в ЖТФ, 42(4), 9-15.
4. Олейников В.А. и др. (2016) Оптика и спектроскопия, 2016, 121(2), 227–237.

УНИКАЛЬНЫЕ КОМБИНАЦИИ П-МОДУЛЕЙ С βαβ-ЕДИНИЦАМИ, β-ШПИЛЬКАМИ, S- И Z-ОБРАЗНЫМИ β-ЛИСТАМИ В БЕЛКАХ

А.В. Ефимов
Институт белка РАН, Пущино Московской области, Россия

В общем виде структура П-модуля может быть представлена как β-тяж – переходная петля – β-тяж, элементы которого образуют в пространстве укладку цепи, напоминающую букву «П» или скобу. В отличие от β-шпильки, β-тяжи П-модуля водородных связей между собой не образуют, но образуют их с дополнительными β-тяжами, которые располагаются между β-тяжами П-модуля в общем β-слое. Таким образом, П-модуль можно рассматривать как β-шпильку, расщеплённую одним, двумя или большим количеством β-тяжей. Переходная петля, которая соединяет два β-тяжа П-модуля, проходит над одним или более β-тяжами, расположенными в центре слоя и обеспечивает поворот цепи на ~180°. П-модули могут быть правыми и левыми. Если смотреть на П-модули со стороны переходных петель, которые проходят над центральными β-тяжами β-слоёв, то в правых П-модулях ход цепи от N- к С-концу осуществляется по часовой стрелке, а в левых – против часовой стрелки.

По-видимому, сам по себе П-модуль нестабилен, однако в комбинациях с βαβ-единицами, β-шпильками, S- и Z-образными β-листами он образует замкнутые компактные структуры с повышенной кооперативностью и стабильностью. Эти структуры имеют уникальные укладки полипептидной цепи и могут быть зародышами и/или готовыми структурными блоками в процессе сворачивания белков. В работе проведен детальный анализ, который позволил установить необходимые условия образования этих структурных мотивов: в определенных ключевых позициях их аминокислотных последовательностей должны находиться гидрофобные и гидрофильные остатки, а также глицины и пролины. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 17-04-00242).*

РЕЦЕПТОР, ПОДОБНЫЙ РЕЦЕПТОРУ ИНСУЛИНА IRR: ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

И.Е. Деев[1], О.В. Серова[1], А.А. Можаев[1], Н.А. Чачина[1], Е.С. Жевленев[1], Е. Бертелли[2], А.Г. Петренко[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [2]Университет Сиены, Сиена, Италия

Рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR), является членом семейства рецепторов инсулина (IR), который работает как внеклеточный щелочной сенсор. Это свойство определяется его эктодоменом. IRR специфично экспрессируется в альфа- и бета-клетках островков Лангерганса. Известно, что система поджелудочной железы, содержащая щелочной сок, может соприкасаться с эндокринными клетками островков поджелудочной железы. Используя иммуногистохимию, мы обнаружили, что те островковые клетки, которые находятся в контакте с выделительными протоками, также являются клетками, экспрессирующими IRR. Мы проанализировали влияние внеклеточной щелочной среды на линию бета-клеток поджелудочной железы MIN6. Мы показали, что эндогенный IRR активируется в этих клетках и активация может быть ингибирована линситинибом, синтетическим ингибитором рецеторных тирозинкиназ из семейства рецептора инсулина. Фосфорилирование IRR приводило к линситиниб-чувствительной активации субстрата 1 рецептора инсулина (IRS-1) и вызвало изменение актинового цитоскелета в этих клетках. Также после щелочной обработки клеток MIN6 наблюдалась сверхэкспрессия нескольких генов раннего ответа. Ранее мы продемонстрировали основную роль доменов L1C, FnIII-2 и FnIII-3 при pH активации рецептора IRR. Чтобы дополнительно исследовать механизм активации IRR щелочью, мы провели сайт-направленный мутагенез в фибронектиновых доменах III типа (FnIII) рецептора IRR. Для этого мы мутировали на аланин консервированные остатки в IRR и также сделали химерный рецептор с заменого участка (646–716) в IRR на гомологичный участок IR. Мутация T582 и замена участка (646–716) показали сильное снижение активности IRR. Далее мы проанализировали важность гликозилирования IRR для его активации. Замена сразу двух доменов FnIII-2 и FnIII-3 в IRR на соответствующие участки IR резко уменьшала pH чувствительность химерных рецепторов, а также смещала массу бета-субъединицы от 68 кДа для IRR до примерно 100 кДа для химеры из-за значительного гликозилирования. Мутация аспарагиновых остатков, потенциальных сайтов гликозилирования в доменах FnIII-2 и FnIII-3 этого химерного белка приводила к частичному восстановлению активности pH-чувствительности. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-50-00131).*

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСНОВ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТАЛЛОКАРБОКСИПЕПТИДАЗ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОСТРУКУТРНОГО АНАЛИЗА

В.Х. Акпаров, В.И. Тимофеев, И.Г. Халиуллин, В. Швядас, И.П. Куранова
Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, Россия

Проведено систематическое изучение взаимосвязи между организацией активного центра ряда металлокарбоксипептидаз и субстратной специфичностью ферментов. Методами генной инженерии получены мутанты карбоксипептидазы Т из *Thermoactinomyces vulgaris* (КПТ) и панкреатической карбоксипептидазы В (КПВ) по остаткам активного центра Asp260, Thr262, Asp263, Leu211, Leu254, Thr253, Tyr200, Thr275, Thr247, Gly215, Ala251, Thr257 (нумерация по КПТ). Получены КПТ с имплантированным S1'- субсайтом КПВ (Акпаров и др., 2007) и КПВ с имплантированным субсайтом КПТ. С использованием рентгеноструктурного анализа определены структуры высокого разрешения комплексов КПТ и КПВ, а также их мутантов с ингибиторами-аналогами основного и переходного состояния глутамил- , лейцил- , аргинил и фенилаланил-содержащих субстратов (Акпаров и др., 2017, Akparov et al., 2015a, Akparov et al., 2015, Тимофеев и др. 2013). Кинетические

параметры действия ферментов и их мутантов по отношению к соответствующим субстратам различной природы, а также константы ингибирования ферментов соответствующими аналогами субстратов определяли экспериментально. Анализ полученных структурных и кинетических данных показал, что важнейшую роль в определении субстратной специфичности родственных ферментов играет подвижная петля активного центра, включающая остатки Leu254 и Tyr255, а остаток Leu254 определяет распознавание отрицательно заряженных субстратов. Консервативные остатки Asp263 и Leu211, присутствующие в КПА, КПВ и КПТ, являются факторами дискриминации заряженных и гидрофобных субстратов, соответственно (Akparov et al., 2015). Показана роль фиксированных молекул воды в дискриминации Arg/Leu -содержащих субстратов. Эффективность катализа зависит от продуктивности связывания субстрата, которая может быть характеризована длиной водородных связей между атомами расщепляемой связи в тетраэдрическом переходном комплексе, и остатком Glu277. Дистантной детерминантой субстратной специфичности КПТ являются также структурные ионы кальция. С учетом полученной информации созданы мутанты микробной КПТ, превосходящие по селективности панкреатическую КПВ и пригодные для конверсии рекомбинантного проинсулина в инсулин. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-14-01256.*

АНАЛИЗ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ГЕТЕРОГЕННЫХ БЕЛКОВЫХ СИСТЕМ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ

П.В. Конарев[1,2], В.В. Волков[1], Д.И. Свергун[3]
[1]Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН; [2]Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва, Россия; [3]Европейская молекулярная биологическая лаборатория, Гамбургский филиал, Гамбург, Германия

Малоугловое рентгеновское и нейтронное рассеяние позволяет изучать структуру биологических макромолекул в растворе и структурные отклики на изменения условий среды, такие как температура, давление, концентрация белка, состав буферного раствора, добавление лигандов и другие. Для таких равновесных и изменяющихся систем обычно измеряется набор кривых рассеяния, причем большинство этих кривых содержит вклады от нескольких типов частиц (компонент), что существенно усложняет их анализ. Разработанные нами ранее алгоритмы позволяют определять минимальное число независимых компонент с использованием сингулярного векторного разложения (программа SVDPLOT из пакета ATSAS для анализа малоугловых данных), а также оценивать объемные доли компонент в случаях, когда их форма и структура известны (программа OLIGOMER, пакет ATSAS). Однако, в ряде случаев форма промежуточного состояния при эволюции системы является неизвестной, тогда как начальные и конечные состояния системы могут быть оценены с хорошей точностью. Поэтому нами был разработан новый алгоритм, который позволяет восстанавливать форму неизвестной промежуточной компоненты и одновременно оценивать объемные доли всех компонент для каждого экспериментального условия (например, для серии временных измерений). Метод, реализованный в виде программы DAMMIX, сочетает в себе *ab initio* восстановление формы с использованием схемы симулированного отжига и процедуру линейной минимизации для анализа вкладов от многокомпонентной системы. DAMMIX может быть также применен для анализа двухкомпонентных равновесных олигомерных систем или сложных самособирающихся систем (смесей вирусоподобных частиц). Возможности метода представлены на ряде теоретических и экспериментальных примеров. Новый метод позволяет восстанавливать объемные доли и форму промежуточных состояний системы при протекании временных реакций, процессах образования фибрилл и самосборки, а также для равновесных олигомерных смесей, измеренных при разных условиях.

КАК НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА ПОВЫШАЮТ УСТОЙЧИВОСТЬ БЕЛКА К ТЕПЛОВОЙ АГРЕГАЦИИ

О.Д. Бекасова, В.А. Штейн-Марголина, Б.И. Курганов
Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Широкое применение наночастиц благородных металлов в биотехнологии связано с их уникальными оптическими свойствами. Повышенный интерес в последние годы наблюдается к биоконъюгатам фотоактивных молекул с наночастицами золота и серебра. Цель работы состояла в исследовании влияния наночастиц Ag^0 на устойчивость к тепловой агрегации фотоактивного белка – R-фикоэритрина, м.в. 290 кДа, методами электронной микроскопии, спектроскопии и динамического светорассеяния. R-фикоэритрин – фотосинтетический пигмент красных водорослей, растворим в воде, не токсичен, применяется в фотодинамической терапии и в качестве флуоресцирующего красителя в иммунологии. Биоконъюгат получали путем синтеза наночастиц Ag^0 в туннельной полости R-фикоэритрина без экзогенного восстановителя. Свежеприготовленный биоконъюгат R-фикоэритрина с наночастицей Ag^0 (Ag^0·R-PE) сохранял желтый цвет и размер 10 нм в течение месяца. При нагревании Ag^0·R-PE с постоянной скоростью 1°C/мин начальная температура агрегации (T_0) равна 58 °C, тогда как для R-фикоэритрина T_0 = 51°C. При созревании наночастиц биоконъюгат самоорганизуется в устойчивые структуры длиной до 170 нм, диаметром 6–15 нм, становится красно-вишневого цвета, а интенсивность рассеяния света усиливается в 25 раз. Ag^0·R-PE оставался стабильным в течение 9 месяцев наблюдений. При повышении температуры интенсивность светорассеяния постепенно снижалась, но упорядоченные структуры Ag^0·R-PE сохранялись до 90 °C. В интервале температур 90–100 °C, где интенсивное рассеяние света не наблюдалось, биоконъюгат распадался, образуя структуры, подобные амилоидным фибриллам, и частицы серебра диаметром 0.3□1.5 мкм. Итак, химическая модификация R-фикоэритрина путем внутримолекулярной сшивки в процессе синтеза наночастицы Ag^0 повышает устойчивость R-фикоэритрина к тепловой агрегации. Однако ключевую роль играет резкое усиление рассеяния, вследствие возбуждения локализованных плазмонов на поверхности наночастиц Ag^0, взаимодействующих со светом. *Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА ЯДЕРНОГО ЭКСПОРТА NS2 (NEP) ВИРУСА ГРИППА А

Э.В. Штыкова[1,2], Е.Н. Богачева[2], Л.А. Дадинова[1], С.М. Джеффрис[3], Н.В.Федорова[4], А.О. Головко[5], Л.А. Баратова[4], О.В. Батищев[6]
[1]Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва; [2]Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва; [3]Европейская молекулярно-биологическая лаборатория, Гамбург, Германия; [4]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и [5]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

Белок NEP (NS2) вируса гриппа А влияет на транскрипцию/репликацию вирусного генома [1], имеет решающее значение для ядерного экспорта vRNP [2], а также может играть определенную роль на более поздних стадиях жизненного цикла вируса. Комплексный структурный анализ белка ядерного экспорта был проведен с помощью предсказательных методов биоинформатики и по данным малоуглового рентгеновского рассеяния. Исследовалось поведение молекул NEP в растворе, их агрегация, олигомеризация и диссоциация в зависимости от состава буфера. Было показано, что ассоциаты образуются даже в обычном водно-солевом растворе при физиологическом значении pH. Эти ассоциаты практически монодисперсны и устойчивы до такой степени, что разделить их на индивидуальные макромолекулы не удается даже при помощи гель хроматографии. Мы показали, что использование таких разделяющих белковые макромолекулы веществ, как мягкие детергенты (CHAPS) и соли аргинина, также не дают нужного результата. Будучи транспортным белком, NEP, таким образом, проявляет свои функциональные свойства: его задачами являются (i) взаимодействие с различными вирусными и клеточными белками и (ii) экспорт вирусного генома из ядер инфицированных клеток, то есть белок принципиально нацелен на образование ассоциатов и самоассоциатов. Однако можно считать удачей то, что впервые удалось получить димеры NEP в растворе, проанализировать их структуру и сравнить полученные с помощью метода молекулярной тектоники модели с пространственной структурой белка, предсказанной нами методами биоинформатики. Можно предположить, что именно димер белка NEP является той функциональной структурной единицей, которая существует в нативных условиях. Результаты работы дают перспективы нового понимания структурных особенностей белка ядерного экспорта NS2 (NEP) вируса гриппа А, крайне важного для развития вирусной инфекции. *Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, проект 15-54-74002.*

Литература

1. Robb NC, Smith M, Vreede FT, Fodor E (2009) NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. J Gen Virol 90:1398–1407.
2. Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. EMBO J 19: 6751–6758.

СТРУКТУРНАЯ МОДЕЛЬ ТЕЛОМЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА ДРОЖЖЕЙ И РОЛЬ N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ В РАБОТЕ ФЕРМЕНТА

Е.В. Родина[1], О.А. Петрова[1], А.Б. Манцызов[1], С.В. Ефимов[2], J. Hakanpää[3], А. Лебедев[4], C. Hackenberg[3], А.Н. Малявко[1,5], Т.С. Зацепин[1,5], М.Э. Зверева[1], В.С. Ламзин[3], В.И. Польшаков[1], О.А. Донцова[1,5]
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва;[2]Казанский федеральный университет, Казань, Россия; [3]European Molecular Biology Laboratory, Hamburg, Germany; [4]Rutherford Appleton Laboratory, Didcot, United Kingdom; [5]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Теломераза – это рибонуклеопротеидный комплекс, работающий как уникальный вид обратной транскриптазы (RT). Теломераза синтезирует теломерные повторы на 3'-концах эукариотических хромосом. Активация теломеразы является причиной иммортализации клеток в большинстве известных видов рака, поэтому структурные исследования теломеразы имеют фундаментальное и прикладное значение. В отличие от других RT, теломераза использует в качестве матрицы для синтеза ДНК короткий участок теломеразной РНК. После синтеза каждого теломерного повтора теломеразная РНК должна быть транслоцирована, чтобы ее матричный участок опять оказался в активном центре. Это свойство определяет процессивный характер катализа теломеразой; структурные основы процессивности пока не выяснены. Каталитическая субъединица теломеразы, TERT, образует четыре домена, из которых N-концевой домен (TEN) структурно обособлен, в то время как оставшиеся домены сгруппированы в компактную торообразную структуру (TERT ring). В центральном туннеле этой структуры, предположительно, связывается гетеродуплекс, образованный ДНК-праймером и матричным участком теломеразной РНК. Согласно данным литературы, во многих организмах процессивный характер синтеза теломерных повторов определяется именно TEN доменом, несмотря на его значительную удаленность от активного центра. Чтобы выяснить механизм процессивности, необходимо иметь представления о взаимодействиях между компонентами теломеразы, включая TERT ring, TEN, ДНК-праймер, теломеразную РНК и их гетеродуплекс. В нашей работе с помощью ЯМР-титрования олигонуклеотидами обнаружено, что TEN из дрожжей *Ogataea polymorpha* специфически узнает вилку на конце ДНК/РНК дуплекса. Идентифицированы белковые остатки, взаимодействующие с вилкой. На основании полученных данных построена модель полноразмерной TERT в комплексе с гетеродуплексом ДНК/РНК. Согласно предложенной модели, TEN может быть вовлечен в ограничение длины гетеродуплекса и тем самым облегчать разделение цепей РНК и ДНК, что необходимо для транслокации РНК и процессивного катализа теломеразой. Консервативность структурных элементов TEN, обнаруженная в работе, позволяет предположить, что такая модель применима и для теломеразы человека. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант РФФИ-EMBL № 15-54-74005_а).*

СТОЛКНОВИТЕЛЬНАЯ ФРАГМЕНТАЦИЯ, H/D ОБМЕН И СУПЕРМЕТАЛЛИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСА БАРНАЗА-БАРСТАР

Ю.И. Костюкевич, А.А. Шульга, А.С. Кононихин, И.А. Попов, Е.Н. Николаев, С.М. Деев
Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

Комплекс барназа–барстар является одним из самых стабильных белок-белковых комплексов и имеет очень широкий диапазон возможных применений. В настоящей работе мы демонстрируем применение метода top-down масс-спектрометрии для исследования структуры этого комплекса, его ионизации методом электрораспыления и фрагментации. Было обнаружено, что асимметрия зарядового распределения ионов мономера белка увеличивается с ростом заряда фрагментируемого комплекса. Для исследования 3D структуры иона комплекса, был применен метод дейтеро/водородного обмена в источнике ионизации [1]. Кроме того, были получены и исследованы [2] ионы комплекса, суперметаллизированные ионами Zn. Было обнаружено, что увеличение количества металлов, связанных с комплексом приводит к изменению устойчивости комплекса

и изменению распределения заряда между мономерами. Анализ продуктов фрагментации суперметаллизированного комплекса [bn-b*+5Zn]10+ показал, что этот ион присутствует в различных конформациях, имеющих различное пространственное распределение заряда и металла. Так как Zn не может мигрировать, такие структуры должны быть сформированы в процессе ионизации. *Разработка методов синтеза белков была поддержана РНФ Грант №. 14-24-00106. Исследование белков методом масс-спектрометрии было поддержано РНФ Грант 14-24-00114.*

Литература

1. Kostyukevich, Y., et al., In ESI-source H/D exchange under atmospheric pressure for peptides and proteins of different molecular weights from 1 to 66kDa: the role of the temperature of the desolvating capillary on H/D exchange. Journal of Mass Spectrometry, 2015. 50(1): p. 49-55.
2. Kostyukevich, Y., et al., Supermetallization of peptides and proteins during electrospray ionization. Journal of Mass Spectrometry, 2015. 50(9): p. 1079-1087.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПЕПТИДОВ С РЕГУЛИРУЕМОЙ ФРАГМЕНТАЦИЕЙ ИОНОВ

И.В. Назимов, Р.А. Бубляев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

Предложен новый способ регулируемой масс-спектрометрической фрагментации пептидов путем изменения разности потенциалов между соплом и скиммером источника ионов, приводящий к образованию информативных пиков фрагментов пептида. Дансилирование N-концевой аминокислоты позволяет предотвратить циклизацию коротких фрагментов, получить интенсивные пики b-ионов фрагментов пептида (включая самые короткие ионы b1 и b2), преобладающие в масс-спектрах и определять полную аминокислотную последовательность пептидов, содержащих до 15 аминокислот. Обсуждаются особенности фрагментации пептидов в ходе анализа их структуры в зависимости от состава, аминокислотной последовательности и длины пептидов.

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЫСТРОПРОТЕКАЮЩИХ СТАДИЙ БЕЛКОВО-НУКЛЕИНОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Н.А. Кузнецов, О.С. Федорова

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

Основной целью данной работы являлось определение кинетических и термодинамических закономерностей специфического узнавания повреждений ДНК и образования каталитически активных комплексов в процессах, катализируемых про- и эукариотическими ДНК-гликозилазами и АР-эндонуклеазами. Для этого методом остановленного потока с регистрацией изменений интенсивности флуоресценции остатков Trp в ферментах и флуорофоров в ДНК проводили анализ конформационных изменений биополимеров в процессе их взаимодействия. На основании полученных данных установлены механизмы узнавания поврежденных участков ДНК важнейшими ферментами репарации человека и *E. coli*, и определены ключевые стадии ферментативных процессов, обеспечивающие высокую субстратную специфичность и ответственные за дискриминацию поврежденных нуклеотидов. Полученные термодинамические данные позволили не только значительно уточнить и детализировать природу процессов, происходящих на стадиях узнавания специфических сайтов рассмотренными ферментами репарации, но и выявить общие закономерности, характерные для ферментов разных структурных классов. Показано, что ферменты контролируют субстратную специфичность путем многостадийного механизма образования специфических связей, который сопряжен с конформационными перестройками и в ферменте, и в ДНК-субстрате. Обнаружение специфических повреждений, расположенных внутри двойной спирали, происходит путем последовательной компактизации структуры белково-нуклеиновых комплексов, которая необходима для увеличения числа межмолекулярных контактов. Однако такое изменение структуры ферментов и ДНК требует дополнительных затрат энергии, которая компенсируется за счет роста энтропии системы вследствие удаления молекул воды из области контактов. *Работа поддержана бюджетным финансированием по проекту No VI.57.1.2 (0309-2016-0001), программой «Молекулярная и клеточная биология» No II.2П/VI.57-6 (0309-2015-0025) и грантами РФФИ (16-04-00037 и 15-04-00467). Часть работы, включающая анализ данных, полученных для АР-эндонуклеазы, поддержана грантом РНФ № 16-14-10038.*

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ДВУХ ДОМЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЦИНКОВЫМИ ПАЛЬЦАМИ, ИЗ *D. MELANOGASTER*. НОВЫЕ ДАННЫЕ О СПЕЦИФИЧНОСТИ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ZAD-БЕЛКОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ АРХИТЕКТУРУ ГЕНОМА

К.М. Бойко[1,2], А.Ю. Николева[2], А.Н. Бончук[3], Г.С. Качалова[2], П.Г. Георгиев[3], В.О. Попов[1,2]

[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; [2]Курчатовский комплекс НБИКС-технологий, НИЦ «Курчатовский институт», Москва; [3]Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Пространственная организация генома эукариот контролируется набором специализированных белков, называемых архитектурными. Эти белки отвечают за установление дальних взаимодействий в геноме за счет формирования различных белковых комплексов. Большинство архитектурных белков имеют сложную мультидоменную структуру, включающую домены типа «цинковые пальцы», необходимые для связывания с ДНК, а также дополнительные «эффекторные» домены, с различными функциями. Одним из представителей «эффекторных» доменов являются домены, ассоциированные с цинковыми пальцами (ZAD-домены), широко представленные в белках дрозофилы, имеющих цинковые пальцы C2H2 типа. Гены, кодирующие такие белки, специфичны для членистоногих и широко распространены в их геномах. При этом продуктам лишь нескольких генов, кодирующих ZAD-домены, приписана известная функция, и роль ZAD-доменов активно обсуждается. Известно, что ZAD-домены способны к димеризации, и предполагается, что они ответственны за формирование специфических белковых комплексов, обеспечивающих дальние взаимодействия в геноме. Аминокислотные последовательности ZAD-доменов имеют крайне низкую степень идентичности, что ставит под вопрос наличие у них сходной пространственной укладки. К настоящему моменту была известна лишь одна пространственная структура ZAD-домена белка Grauzone (GrauZAD). Нами впервые установлены две новые пространственные структуры ZAD-доменов транскрипционного активатора Serendipity-d (SerdZAD) и белка CG2712 из D.melanogaster. Структуры были решены с использованием метода MAD и уточнены до разрешения 3.0Å и 2.0 Å, соответственно. Обе структуры являются гомодимерами в кристалле и имеют сход-

ную пространственную укладку. Тем не менее, сравнение этих структур и GrauZAD позволило выявить некоторые уникальные структурные особенности, которые могут отражать специфичность белок-белковых взаимодействий, имеющих место у этих белков. *Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (Соглашение 14.616.21.0066, уникальный идентификатор проекта - RFMEFI61616X0066).*

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ХОЛОДОВАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ ИНТЕГРАЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ?

А.С. Парамонов, М.Ю. Мышкин, Л.Н. Шингарова, Е.Н. Люкманова, А.С. Арсеньев, З.О. Шенкарёв
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Понимание механизмов сворачивания (фолдинга) белка *in vitro* является одной из ключевых проблем молекулярной биофизики. В настоящее время разработано множество теорий, адекватно описывающих фолдинг глобулярных (водорастворимых) белков. В то же время фолдинг интегральных мембранных белков (ИМБ) изучен значительно хуже. Холодовая денатурация – один из наиболее интригующих эффектов, свойственных глобулярным белкам. При понижении температуры взаимодействие отдельных групп белка с молекулами воды становится энергетически более выгодным, в результате, ядро белковой глобулы дестабилизируется, и белок полностью разворачивается при достижении критической температуры (ТС). Для большинства белков значения ТС лежат в отрицательных температурах, и они подвергаются лишь небольшой дестабилизации при охлаждении. Термодинамически холодовая денатурация связана с увеличением теплоемкости системы белок/растворитель ($\Delta C_pU>0$) при разворачивании полипептидной цепи. Из-за особенностей структуры фолдинг ИМБ можно изучать только в мембраноподобных средах, при этом для разворачивания белка используются жесткие анионные детергенты. В работе методами ЯМР-спектроскопии исследовали обратимое разворачивание потенциалочувствительного домена (ПЧД) канала KvAP (четыре трансмембранные спирали, 150 а.о.). ПЧД сохраняет нативную структуру в мицеллах цвиттерионного детергента DPC и разворачивается при добавлении анионного детергента LPPG. Структура развернутого ПЧД напоминает состояние «расплавленной глобулы» растворимых белков, и характеризуется близкой к нативной вторичной структурой, разрушенными третичными межспиральными контактами и увеличенной подвижностью основной цепи в пс-нс диапазоне при сохранении общей компактной организации белка. Данные, полученные в смесях LPPG/DPC, выявили обратимое разворачивание ПЧД при понижении температуры (ТС~35°С при LPPG/DPC 1:1). Наблюдаемый эффект характеризуется увеличением теплоемкости системы (ΔC_pU~0.7 kcal/mol/K) и связан с температурной зависимостью взаимодействия белок/липид. Результаты указывают на то, что термодинамические параметры фолдинга спиральных ИМБ близки к таковым у глобулярных белков. Холодовая денатурация белков, видимо, представляет более распространенный феномен, чем предполагалось ранее. *Работа поддержана РНФ (№16-14-10338).*

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФЕНОКСАНА СПЕКТРАЛЬНЫМИ И КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

О.М. Алексеева[1], Ю.А. Ким[2], Е.А. Ягольник[3]
[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, [2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино; [3]Тульский государственный университет, Тула, Россия

Исследовали влияние антиоксиданта феноксана на структуру белков. Свободный белок - бычий сывороточный альбумин (БСА). Связанные мембранные белки – белковые микродомены в цитоскелете теней эритроцитов. Феноксан – калиевая соль фенозана, экранированного фенола [β-4-окси-(3,5-дитретбутил-4-оксифенил) калий пропионат], синтезирован в ИХФ РАН [Nikiforov G.A., 2005]. Фенозан – пространственно затрудненный фенол, амфифил, мембранотропное вещество, преимущественно распределяется во внешнем листке липидного бислоя мембран, влияет на организацию бислоев мультиламмелярных липосом из фосфатидилхолина: увеличивает толщину бислоя и снижает уровень регулярности мембран в мультислое. Спектральным методом (по интенсивности флуоресценции 2 триптофановых остатков в молекуле БСА), показано, что феноксан 10^{-4} М снижает интенсивность флуоресценции и сдвигает длину волны эмиссии. Это указывает на гидрофилизацию окружения триптофановых остатков при больших концентрациях феноксана, в результате разрыхления глобулы молекулы БСА и тушения кислородом, растворенном в воде. Феноксан 10^{-17}–10^{-6} М увеличивает интенсивность флуоресценции БСА по сравнению с контролем, что объясняется защитой триптофановых остатков адсорбированным феноксаном. Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) показано смещение температуры денатурации белковых микродоменов теней эритроцитов в присутствии феноксана 10^{-5} М. Белки мембранного скелета эритроцитов тесно взаимодействуют друг с другом и образуют мембранные домены, денатурация которых формирует структурные тепловые переходы: 5 идентифицированных структурных переходов белков семейства спектрина, анкирина, белков полос 4,1 и 4,2 и белка полосы 3, представлены в составе мембранного скелета практически всех клеток организма. Концентрация феноксана 10^{-5} М выбрана на основании данных по влиянию феноксана на липидные микродомены, из которых ясно, что эта концентрация вызывает перестройки, но разрушения регулярной структуры еще не происходит. По термограммам теней эритроцитов определено смещение температуры переходов, без изменения формы термограмм. Это указывает на то, что феноксан 10^{-5} М вызывает перестройки в организации белковых доменов, однако сами домены сохраняются.

СВЯЗЫВАНИЕ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОГО АНТИБИОТИКА С ТИМИДИНФОСФОРИЛАЗОЙ ИЗ *SALMONELLA TYPHIMURIUM* ПО РЕЗУЛЬТАТАМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

В.В. Балаев, А.А. Лашков, И.И. Прокофьев, А.Г. Габдулхаков
ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

Пиримидинфосфорилазы – ферменты, принимающие участие в синтезе нуклеиновых кислот и, являющиеся, таким образом, крайне важными для жизнедеятельности клетки. В работе [1] показано, что взаимодействие бактериостатического антибиотика триметоприма (ТОР) с чумной палочкой сопровождается активностью ее тимидин-специфичной пиримидинфосфорилазы (ТР). Структурное сходство ТОР и субстрата ТР тимидина указывает на возможное взаимодействие ТОР с сайтами

связывания ТР. Для установления возможного механизма взаимодействия ТР с ТОР проведено компьютерное моделирование связывания ТОР с тимидинфосфорилазой из *Salmonella typhimurium* (StTP) в активном центре и дополнительном сайте связывания нуклеозидов (дНСС1), обнаруженном при рентгеноструктурном анализе StTP [2]. Использована программа Glide (Schrodinger Suite). Значения оценочной функции программы GlideScore также рассчитаны для молекулы тимидина (ТНМ) в комплексе StTP с тимидином (PDB код 4YEK). Значение оценочной функции ТОР в активном центре ниже значения для тимидина (-5,28 ккал/моль у ТОР в сравнении с -6,18 ккал/моль у ТНМ), а в дНСС1 выше (-2,95 ккал/моль у ТОР в сравнении с -1,95 ккал/моль у ТНМ). Полученный результат указывает на то, что ТОР может связываться с дНСС1 и буферизироваться им. Следствием буферизации ТОР, является снижение эффективной концентрации этого препарата внутри бактерии. В результате этого уменьшается число молекул ТОР, ингибирующих бактериальную дигидрофолатредуктазу - фармакологическую мишень этого антибиотика. *Работа выполнена за счет базового бюджетного финансирования ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН и при финансовой поддержке гранта президента РФ № МК.9246.2013.3.*

Литература

1. Kravchenko, A.N., Mishan'kin, B.N. [Thymidine phosphorylase activity and its relationship to trimethoprim in initial strains and thymidine-, thymine-dependent and trimethoprim-resistant mutants of plague microbe] // Antibiot Khimioter. – 1992. – 37 (1). – 17-20.
2. Balaev, V.V., Lashkov, A.A., Gabdulkhakov, A.G., Dontsova, M.V., Seregina, T A., Mironov, A.S., Betzel, C., Mikhailov, A.M. Structural investigation of the thymidine phosphorylase from Salmonella typhimurium in the unliganded state and its complexes with thymidine and uridine // Acta Crystallogr F Struct Biol Commun. – 2016. – 72 (Pt 3). – 224-233.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ МУТАЦИЙ НА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА APP КАК КЛЮЧ К ПОНИМАНИЮ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

О.В. Бочарова, А.С. Урбан, К.Д. Надеждин, П.К. Кузьмичев, П.Е. Волынский, Э.В. Бочаров, А.С. Арсеньев
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Отсутствие значительного прогресса в раскрытии первых стадий патогенеза болезни Альцгеймера (БА) вызвано не только большой сложностью этого процесса, но и трудностью получения и работы с белками, имеющих трансмембранный (ТМ) домен. Сложный многоступенчатый протеолиз белка-предшественника бета-амилоида (APP, amyloid precursor protein) альфа-, бета- и гамма-секретазами высвобождает растворимые экто- и интрадомены, участвующие в развитии и функционировании нейронов, а также Ab-пептиды различные по длине и патогенности. Что является триггерным фактором, приводящим к изменению процессинга APP, не понятно до сих пор в целом. Обнаружение наследственных мутаций в гене APP помогает изучению молекулярных механизмов аномального процессинга APP. Более половины всех известных семейных мутаций APP приходится на области ТМ и примембранных доменов. В настоящее время считается, что эти патогенные мутации влияют на латеральную димеризацию APP в мембране, изменяя конформацию димера и/или его стабильность. Это считается возможной причиной альтернативного расщепления APP гамма-секретазой. Мы обратили внимание на три семейные мутации в С-концевой части ТМ домена APP, а также на две его укороченные формы Ab15-46 и Ab15–49, соответствующие начальным стадиям протеолиза гамма-секретазой. Исследования с помощью спектроскопии ЯМР высокого разрешения показали, что мутанты V717G и V717I сохраняют альфа-спиральную структуру и остаются стабильными в течение недели. Напротив, ТМ домен APP с мутацией L725P и фрагменты Ab15–46 и Ab 15–49 агрегирует в течении нескольких часов: сначала они претерпевают конформационный переход в растворимые олигомерные бета-структуры, а затем в агрегаты более высокого порядка. При этом на начальных этапах С-концевая часть ТМ домена L725P подвергается значительному разворачиванию альфа-спирали и увеличению доступности воды. В свою очередь, внеклеточный петлевой участок, соединяющий примембранную спираль APP с ТМ доменом опускается в мембрану, делая амидные группы остатки на N-конце ТМ спирали менее доступными для молекул воды. Эта конформационная лабильность может влиять на аномальное расщепление гамма-секретазой, которая приводит к австралийской форме БА. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-04-02045-а).*

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ НЕОГЛИКОЛИПИДОВ

И.С. Васкан, А.А. Чистяков, Д.О. Соловьева, Е.Ю. Корчагина, Н.В. Бовин, В.А. Олейников
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Благодаря стремительному прогрессу в области нанобиотехнологий в последнее время резко возрос интерес к исследованиям в области наномедицины. В частности, значительное внимание уделяется разработкам наноразмерных систем доставки лекарств и средств ранней диагностики таких тяжелых заболеваний, как рак. Благодаря своим размерозависимым физико-химическим свойствам, наноносители обладают потенциалом для многократного улучшения терапевтической эффективности и безопасности лекарств. Однако применяющиеся в настоящее время системы доставки на основе обычных или функционализированных полиэтиленгликолем липосом и мицелл обладают рядом недостатков, среди которых низкая или наоборот чрезмерная стабильность, низкая таргетная эффективность, иммуногенность. Для преодоления этих недостатков большие усилия исследователей направлены на поиск новых молекулярных инструментов, на основе которых в будущем будут созданы высокоэффективные системы доставки нового поколения. Данная работа направлена на исследования физико-химических свойств ассоциатов неогликолипидов на предмет возможности их использования в качестве новых таргет-специфичных, pH-чувствительных и безопасных систем доставки.

Основными физико-химическими параметрами, определяющими возможность использования наночастиц в качестве систем доставки являются тип ассоциатов (липосомы, мицеллы) их форма, размер и распределение размеров. Для получения этих сведений ассоциаты неогликолипидов были исследованы методами атомно-силовой микроскопии (АСМ), динамического рассеяния света (ДРС), малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и молекулярной динамики (МД). Методом АСМ был установлен размер и распределение размеров высушенных ассоциатов. Далее полученные данные были сопоставлены с данными ДРС о размерах ассоциатов в физиологических условиях, и было выявлено хорошее соответствие результатов. Структура ассоциатов была получена после обработки МУРР спектров, и установлено, что в результате ассоциации неогликолипидов образуются мицеллы. На следующем этапе структуру мицелл определяли путем крупнозернистого моделирования процесса ассоциации методом МД в пакете GROMACS. Данные о форме и размерах мицелл, полученные в результате моделирования хорошо согласуются с экспериментальными. Полученные данные свидетельствуют о возможности примене-

ния неогликолипидов в качестве молекулярных инструментов для создания новых эффективных систем доставки. *Эксперименты выполнены с использованием УНУ «Система зондово-оптической 3D корреляционной микроскопии». Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

УСТОЙЧИВОСТЬ РЕШЕНИЙ ПРОГРАММЫ MIXTURE ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПОЛИДИСПЕРСНЫХ СИСТЕМ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ

А.Е. Крюкова, П.В. Конарев, В.В. Волков
Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

Метод малоуглового рассеяния (МУР) является структурным методом, позволяющим исследовать: монодисперсные системы (растворы белков), полидисперсные системы (смеси белков, наноэмульсии, наночастицы), произвольные конденсированные системы (нанокомпозиты, гели, аэрозоли, полимеры, сплавы, мезопористые материалы и т.п.). Для анализа растворов микроэмульсий, вирусоподобных белков и наночастиц была разработана программа MIXTURE [1], которая входит в пакет программ ATSAS [2]. Данная программа позволяет моделировать многокомпонентные системы, содержащие различные типы полидисперсных частиц с помощью приближения простыми геометрическими телами, такими как: двухслойные сферы и цилиндры, эллипсоиды, “гантелеобразные” частицы. В программе реализован алгоритм, использующий нелинейные методы минимизации с ограничениями на параметры. С помощью программы MIXTURE можно находить средние размеры частиц, степень полидисперсности и объемные доли компонентов, а также учитывать межчастичные взаимодействия для сильноконцентрированных образцов в приближении Перкуса– Йевика. Имеется модифицированная версия программы, в которую добавлена оптимизация профиля электронной плотности липидного бислоя. Для оценки качества работы программы MIXTURE было проведено исследование на устойчивость решения задачи определения структурных параметров наночастиц для теоретических данных малоуглового рассеяния, рассчитанных от различных модельных систем [3]. Использовались системы, состоящие из сферических частиц двух типов, имеющих перекрывающиеся и неперекрывающиеся объемные распределения по размерам. Кроме того, к наборам данных добавлялся шум двух типов (гауссовский и пуассоновский) с различным относительным уровнем и исследовалась степень отклонения найденного решения от заданной теоретической модели. По результатам проведенного моделирования предложены практические рекомендации для поиска распределений сложных полидисперсных систем и возможной модернизации алгоритма программы.

Литература

1. Konarev P.V., Volkov V.V. et.al. // Journal of Applied Crystallography. 2003. V. 36. P. 1277–1282.
2. Petoukhov M.V., Franke D. et.al. // Journal of Applied Crystallography. 2012. V. 45. P. 342-350
3. Kryukova A.E., Konarev P.V., Volkov V.V. // Crystallography Reports. 2017. (В печати).

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГОМОЛОГИЧНЫХ ТРЕХПЕТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА Lypd6 И Lypd6b

Д.С. Кульбацкий[1,2], Е.В. Локтюшов[1,2], А.В. Царев[1,3], А.С. Парамонов[1], М.Л. Бычков[1], М.А. Шулепко[1,2], Д. Бертран[4], З.О. Шенкарев[1,3], Д.А. Долгих[1,2], М.П. Кирпичников[1,2], Е.Н. Люкманова[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, [2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия; [4]HiQScreen Sàrl., Женева, Швейцария

Белки человека Lypd6 и Lypd6b являются представителями семейства Ly6/uPAR, для которого характерна «трехпетельная» структура, стабилизированная четырьмя дисульфидными связями. Lypd6 играет важную роль в эмбирогенезе, модулируя активность канонического сигнального пути Wnt. Было установлено, что Lypd6 взаимодействует с белками Lrp6 и Frizzled8 – компонентами рецепторного комплекса Wnt на поверхности мембраны. Также известно, что Lypd6 может модулировать вызванные никотином кальциевые токи в нейронах тройничного ганглия у мышей, однако точная мишень действия этого белка до сих пор неизвестна. Lypd6b – белок гомологичный Lypd6 (степень гомологии по первичной последовательности ~ 54%), который способен модулировать токи через α3β4 никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) в ооцитах *Xenopus*. Lypd6 и Lypd6b связаны с мембраной с помощью GPI-якоря, что значительно затрудняет функциональные и структурные исследования таких белков. Для решения этой проблемы нами была разработана система рекомбинантной продукции Lypd6 и Lypd6b в растворимой форме (без GPI-якоря). На первичной культуре нейронов гиппокампа и коры головного мозга мыши была исследована локализация Lypd6 и нАХР α7 типа, а также субъединиц $ГАМК_A$-рецепторов α5 и γ2 типов. Было установлено отсутствие солокализации для Lypd6 и обоих типов рецепторов. Отсутствие влияния Lypd6 на ацетилхолин-индуцированные токи на α7-нАХР, экспрессированные в ооцитах *Xenopus*, подтвердило данные конфокальной микроскопии. С использованием системы бактериальной продукции были получены миллиграмовые количества препаратов Lypd6 и Lypd6b и их аналогов, меченных 13C и 15N изотопами. Пространственная структура и динамика основной цепи Lypd6 и Lypd6b были изучены с помощью спектроскопии ЯМР высокого разрешения. Было установлено, что оба белка имеют характерную трехпетельную структуру, имеющую ряд уникальных особенностей: наличие дополнительных дисульфидов и спиральных участков в первой и третьей петлях. *Данная работа была поддержана грантами РФФИ #15-04-99517 и РНФ #16-14-00102.*

ПРОИЗВОДНЫЕ ТРИПТАМИНА – НОВЫЕ ЛИГАНДЫ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИЗ ЯДА СЕРОЙ ЖАБЫ *BUFO BUFO*

Д.С. Лебедев, Е.В. Крюкова, И.А. Иванов, В.Г. Старков, В.И. Цетлин, Ю.Н. Уткин
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Кожный секрет паротидных желёз (яд) амфибий рода Bufo содержит значительное количество биологически активных соединений. К соединениям, выделенным из этого секрета, можно отнести буфодиенолиды, содержащие в своей структуре лактонное кольцо и являющиеся мощными сердечными гликозидами, а также буфотенины, имеющие серотонино-подобную структуру и воздействующие на серотониновый рецептор 5-НТ3 типа. В результате хроматографического разделения яда Bufo bufo были получены два основных компонента: N-метилированные аналоги серотонина – буфотенин (N,N- диметилсеротонин) и буфотенидин (N,N,N-триметилсеротонин). Эти фракции конкурировали с радиоактивным I125-меченым бунгаро-

токсином за связывание с никотиновым ацетилхолиновым рецептором (нАХР) мышечного (IC_{50} составила 105 мкМ и 270 мкМ для буфотенина и буфотенидина соответственно) и α7 типов (426 нМ и 4,16 мкМ соответственно). Методами электрофизиологии на ооцитах *Xenopus laevis* и кальциевого имиджинга было показано, что буфотенин действует на нАХР α7 типа в качестве агониста (EC_{50}=2,7 мкМ), и проявляет ингибирующее действие в отношении нАХР мышечного типа (IC50 = 30 мкМ), ускоряя его десенситизацию. Также буфотенин действует на α3β2 нАХР в качестве частичного агониста (EC_{50}=23 мкМ). Нами были синтезированы метилированные аналоги триптамина – диметилтриптамин (ДМТ) и триметилтриптамин (ТМТ) и исследована функциональная активность этих соединений в отношении мышечного и нейрональных α7 и α3β2 нАХР. Оба соединения оказались агонистами нейронального α7 АХР, причем ТМТ проявил значительно большую активность (EC5 = 0,24 и 25 мкМ для ТМТ и ДМТ, соответственно). Во взаимодействии гетеромерными нейрональными α3β2 нАХР. ТМТ оказался частичным агонистом (EC_{50}=21 мкМ), а ДМТ не проявил активности. Было показано также, что ТМТ являясь частичным агонистом мышечного нАХР и способен индуцировать токи низкой амплитуды в концентрациях 10–100 мкМ, а при совместной аппликации с ацетилхолином ингибирует ответы со значением IC_{50}=9,6 мкМ. Его диметилированный аналог – ДМТ был не активным. Исследование показало, что наличие четвертичного атома азота и 5-гидроксигруппы в производных триптамина и серотонина (5-гидрокситриптамина) влияет на активность соединений в отношении ряда нАХР.

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИТОХРОМА CYP2A6 ЧЕЛОВЕКА

А.Я. Лущик, А.А. Гилеп *Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Целью работы было установление структурно-функциональных характеристик цитохрома CYP2A6 человека для выяснения механизмов возникновения отклонений на молекулярном уровне. Недавние исследования показали, что ряд полиморфных замен приводит к снижению активности CYP2A6 и связан с табакокурением и изменением метаболического профиля противоопухолевых препаратов. CYP2A6 является мембранным белком с гидрофобным N-концевым доменом, что затрудняет получение стабильной водорастворимой формы препарата данного белка. Для получения растворимого гомогенного препарата CYP2A6 нами были использованы генетические конструкции на базе вектора pCW-LIQ, содержащие кодирующую последовательность CYP2A6 в которой была удалена часть гидрофобного мембранного домена. В качестве экспрессионного штамма использовались клетки E.coli BL21. Для очистки проводилась металл-афинная хроматография и хроматография на гидроксиапатите. С помощью сайт-направленного мутагенеза были получены мутантные формы CYP2A6 человека H160L и S224P, связанные с изменением каталитической активности. Данные мутантные формы CYP2A6 характеризовались разностным спектром поглощения с низкомолекулярным лигандом (CO) с максимум поглощения в 420 нМ, что характерно для денатурированной формы. Для получения представления о молекулярной организации мутантных форм фермента методом гомологичного моделирования построены пространственные структуры. Проведен скрининг лигандов активного центра фермента и выявлено взаимодействие CYP2A6 дикого типа с тестостерон пропионатом, дезоксикортикостероном, прогестероном, станазололом, туринаболом.

ВРЕМЕНА ЖИЗНИ СОБСТВЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КАРБОКСИАНГИДРАЗЫ Б КАК ИНФОРМАТИВНЫЙ ПАРАМЕТР О СТАДИЯХ ДЕНАТУРАЦИИ В РАВНОВЕСНЫХ УСЛОВИЯХ

Е.В. Немцева[1,3], О.О. Лащук[1], Н.Е. Карузина[1], М.А. Герасимова[1], Б.С. Мельник[2] *[1]Сибирский федеральный университет, Красноярск; [2]Институт белка РАН, Пущино; [3]Институт биофизики, Красноярский научный центр СО РАН, Красноярск, Россия*

Важной задачей является развитие экспериментальных методов, позволяющих регистрировать стадийность процесса сворачивания/разворачивания белков. Считается, что при многостадийной денатурации белка переходы между промежуточными состояниями можно наблюдать только по кинетическим измерениям, регистрируя изменение интенсивности флуоресценции или другого оптического параметра с момента начала денатурации. При этом метод равновесной денатурации зачастую не несет информации о накоплении промежуточных форм белка. В данной работе был проведен анализ стадий разворачивания карбоксиангидразы быка (BCAII) по временам жизни собственной флуоресценции данного белка. Были исследованы дикий тип BCAII и два мутанта: одиночный L139A и двойной A53C/A76C. Для регистрации флуоресценции белков при стационарном и импульсном возбуждении использовали спектрофлуориметр Fluorolog 3–22 (Horiba Jobin Yvon, США). Спады интенсивности флуоресценции регистрировали методом счета фотонов с временной корреляцией (источник возбуждения – импульсный диод NanoLED с максимум излучения около 296 нм). Измерения проводили в диапазоне 305–419 нм. Равновесную денатурацию проводили мочевиной (концентрация 0–8,5 М). Спады флуоресценции описывали как сумму экспоненциальных компонент, определяя таким образом времена жизни флуоресценции белка. Для каждого из трех белков были получены три времени жизни при различных концентрациях мочевины: τ1=4,9–5,5 нс, τ2=1–2 нс и τ1<0,3 нс. Установлено, что кривые перехода, построенные по изменению τ1 и τ2, отличаются от переходов, регистрируемых по параметрам стационарной флуоресценции (I335, I320/I360). Но при этом найденные по временам жизни середины переходов находятся в хорошем соответствии с кинетическими данными, согласно которым разворачивание карбоксиангидразы проходит через образование двух промежуточных состояний.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММНОГО ПАКЕТА ATSAS

М.В. Петухов[1,2,3], D. Franke[3], П.В. Конарев[1,4], A. Panjkovich[3], A. Tuukkanen[3], H.D.T. Mertens [3], А.Г. Кихней[3], N.R. Hajizadeh[3], C.M. Jeffries[3], Д.И. Свергун[3]
[1]ФИЦ«Кристаллография и фотоника» РАН, Москва; [2]Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва и Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия; [3]European Molecular Biology Laboratory, Hamburg, Germany; [4]НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия

Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) – структурный метод низкого (1–2 нм) разрешения, позволяющий изучать разупорядоченные и слабоупорядоченные нанообъекты в широком диапазоне размеров и молекулярных весов. Метод актив-

но используется в физике, материаловедении, а также для изучения строения биологических макромолекул в растворе [1]. В последнее время метод эффективно развивался благодаря прогрессу в оснащении исследовательских станций, а также появлению новых методов компьютерного моделирования [2]. При отсутствии априорной информации о структуре, МУРР позволяет определить исключительно по кривой рассеяния максимальный размер частицы, ее радиус инерции, исключенный объем, а также молекулярный вес. Кроме того, возможно *ab initio* определение формы частиц, например с помощью подхода конечных объемных элементов. При наличии структур высокого разрешения, полученных другими методами, например из рентгеновской кристаллографии или ЯМР, МУРР применяется для выявления возможных отличий кристалл-раствор, определения олигомерного состояния, проведения анализа конформаций гибких макромолекул. Комплексный программный пакет ATSAS для обработки и интерпретации данных малоуглового рассеяния, полученных от разбавленных растворов частиц, уделяет особое внимание структурному анализу белков и их комплексов. Он содержит приложения для первичной обработки и оценки данных, моделирования формы *ab initio*, проверки и скрининга моделей, а также программы для моделирования методом молекулярной тектоники, для характеристики гибких макромолекул и количественного анализа равновесных смесей. Программный пакет использует сложные статистические методы и методы оптимизации (такие как simulated annealing, генетический алгоритм, конформационный анализ с помощью нормальных колебаний). ATSAS находится в свободном доступе для академических пользователей по URL-адресу: https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html. *Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ, грант 16-03-00375.*

Литература

1. Svergun DI, Koch MH, Timmins PA, May RP (2013) Small Angle X-ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules. Oxford University Press, London.
2. Petoukhov MV, Franke D, Shkumatov AV, Tria G, Kikhney AG, Gajda M, Gorba C, Mertens HDT, Konarev PV, Svergun DI (2012) J Appl Cryst 45: 342-350.

СРАВНЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛА A5 И A17 С ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СУБСТРАТАМИ

С.О. Пипия[1], Ю.А. Мокрушина[1], И.В. Смирнов[1,2], А.Г. Габибов[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Использование каталитических антител для нейтрализации фосфорорганических токсинов является перспективной альтернативой существующим методам терапии отравлений. Антитела A5 и A17 были отобраны ранее по способности к ковалентному взаимодействию с фосфонатом X. Для антитела A17 была показана способность гидролизовать пестицид параоксон по механизму индуцированного соответствия. Знание субстратной специфичности и механизма реакции позволило с помощью компьютерного моделирования получить мутант в 170 раз более специфичный к параоксону, чем исходное антитело A17. В настоящем исследовании определены структурные и функциональные особенности антитела A5, проведено сравнение его свойств с антителом A17. Известно, что изотип легкой цепи каталитического антитела может оказывать влияние на его структурно-функциональные характеристики, поэтому в исследовании использовали антитела с обоими вариантами изотипа. Была установлена исключительная специфичность антитела A5 к фосфонату X, в отличие от антитела A17 активности с параоксоном не обнаружено. Методами стационарной кинетики определили, что реакционная способность для антител с лямбда изотипом незначительно меньше, чем с каппа, при этом основное влияние на различия оказывает стадия нековалентного взаимодействия. Для изучения особенностей стадии нековалентного взаимодействия антитела A5 с фосфонатом X на основании анализа компьютерной 3D-модели структуры A5 были созданы мутанты L-R51W и H-F100W, которые позволили определить кинетические параметры реакции по тушению триптофановой флуоресценции в режиме предстационарной кинетики. После наработки в дрожжах P. pastoris и трех-стадийной хроматографической очистки препараты антител L-R51W и H-F100W были использованы для анализа кинетики методом остановленной струи. Было установлено, что взаимодействие с фосфонатом X проходит по двухстадийному механизму индуцированного взаимодействия, сходному с антителом A17. Дополнительно из 3D-модели антитела A5 было установлено, что реакционный остаток L-Y33 расположен на поверхности активного центра. Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать антитело A5 в качестве удобного объекта для направленного изменения функциональной активности. *Работа выполнена при поддержке гранта Минобрнауки России RFMEFI61614X0009.*

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА *DENDFP (DENDRONEPHTHYA* SP.) В ЗЕЛЁНОЙ И ФОТОКОНВЕРТИРОВАННОЙ КРАСНОЙ ФОРМАХ

Н.В. Плетнева, И.В.Артемьев, Е.А. Горячева, А.А. Пахомов, В.И. Мартынов, В.З. Плетнев
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Флуоресцентные белки (ФБ) нашли широкое применение в качестве эффективных молекулярных инструментов для визуализации и мониторинга внутренних процессов в клетках и целых организмах. Флуоресцентный белок wt DendFP (*Dendronephthya* sp.) при облучении УФ светом (~380 нм) проявляет необратимое превращение из зеленой формы (Lэм=506 нм) в красную (Lэм=575 нм). DendFP характеризуется хромофоробразующей триадой His62-Tyr63-Gly64, демонстрируя хороший фотоконверсионный контраст, высокие фотостабильность и скорость созревания хромофора. Биомаркер показал высокую эффективность при изучении миграции внутриклеточных белков. Возникающий при фотопереключении сдвиг флуоресценции в красную область спектра является особо ценным свойством для его практического применения в связи с повышенной проницаемостью соответствующего излучения через биологические ткани. Пространственная структура DendFP в зеленой и фотоконвертированной красной формах установлена нами методом рентгеноструктурного анализа при разрешении 1.81Å и 2.14Å, соответственно. Структура мономера DendFP представляет собой β-бочонок, сформированный из 11 антипараллельных β-сегментов и одной центральной α-спирали, содержащей хромофор. Хромофор зеленого DendFP принимает планарную бициклическую структуру, состоящую из пятичленного имидазолинонового и шестичленного фенольного циклов. Мы установили, что фотоконверсия DendFP в красную форму сопровождается разрывом основной цепи по связи Cα–N первого остатка хромофора His62 с образованием концевой карбоксамидной группы у предшествующего остатка

Leu61. Образующаяся в процессе окисления Cα=Cb связь боковой цепи His62 хромофора расширяет сопряженную π-электронную систему хромофора за счет имидазольного цикла. Процесс сопровождается сдвигом флуоресценции из зеленой в красную область спектра. На основе рентгеноструктурных данных и последующего сайт направленного мутагенеза установлена взаимосвязь между пространственной организацией и фотофизическими характеристиками DendFP.

СТРУКТУРНЫЙ АСПЕКТ СЕЛЕКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ УРИДИНФОСФОРИЛАЗ К ЦИТОЗИНУ

И.И. Прокофьев, А.А. Лашков, В.В. Балаев, А.Г. Габдулхаков *ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия*

Уридинфосфорилаза (УФ) – фермент, катализирующий реакцию фосфоролитического расщепления пиримидиновых нуклеозидов, а также обратную реакцию их синтеза. Цитозин входит в состав ДНК и является псевдосубстратом УФ. Отметим, что таутомером цитозина с наиболее высокой концентрацией в водном растворе является лактамная аминная форма таутомера цитозина I (4-амино-пиримидин-2(1H)-дион). Следующий за ним по концентрации - таутомер цитозина II (4-амино-пиримидин-2(3H)-дион). Концентрация остальных таутомеров в водном растворе намного порядков ниже, чем I и II. С использованием синхротронного излучения (PETRA III, DESY, Гамбург, Германия) определена пространственная структура комплекса уридинфосфорилазы из патогенной бактерии *Vibrio cholerae* (VchUPh) с цитозином при атомном разрешении 1.06 Å (PDB ID: 5EPU). При сравнении сайтов связывания структур комплексов VchUPh с цитозином и урацилом – субстратом УФ, структурных отличий не выявлено. Проведен оценочный расчет вклада свободной энергии связывания атомов таутомеров цитозина с ферментом. Вклад взаимодействия атома N3 пиримидинового кольца цитозина I с УФ в свободную энергию связывания равен 7,6 кДж/моль, в то время как для атомов N4 и O2 -1,4 кДж/моль и -2,5 кДж/моль. Расчет вклада оценочной энергии связывания атомов N3, N4, O4 цитозина II равен -4,3 кДж/моль, -0,4 кДж/моль, -1,8 кДж/моль соответственно. Помимо этого, при анализе карты электронной плотности структуры комплекса VchUPh с цитозином атомного разрешения с коэффициентами (2mFo-DFc) отображенной при уровне срезки 0.1σ обнаружено наличие пиков электронной плотности при атоме N3 пиримидинового кольца цитозина и атома азота боковой группы Gln165, характеризующие направление водородных связей цитозина с ферментом. Такие водородные связи может образовать только таутомер цитозина II, ввиду наличия у него донора протона при N3. Таким образом, с ферментом связывается таутомер цитозина II. Но в этом случае у атома N1 молекулы цитозина II отсутствует протон, необходимый для проведения ферментативной реакции. Таким образом, из всех возможных таутомеров цитозина связывается с ферментом тот, который не способен образовать N-C гликозидную связь с рибозо-1-фосфатом. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МК- 9246.2016.3.*

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАКТОРА ИНГИБИРОВАНИЯ МИГРАЦИИ МАКРОФАГОВ С АЛЬБУМИНОМ

В.Р. Самыгина[1,2], М.В. Петухов[3,1], А.В. Соколов[4,5], Л.А. Дадинова[1], В.А. Костевич[4], Ю.А. Кислицын[1], В.Б. Васильев[4,5], Д.И. Свергун[3]
[1]Институт кристаллографии ФНИЦ «Кристаллографии и фотоники» РАН, Москва; [2]НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия; [3]EMBL, Hamburg, Germany; [4]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; [5]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Белок-белковые взаимодействия – важные функциональные единицы биологических систем. Свойства индивидуальных макромолекул могут изменяться вследствие взаимодействия с белком-партнером. Фактор ингибиторования миграции макрофагов (МИФ) – основной про-воспалительный цитокин обладающий таутамеразной, тиолоксидоредуктазной и гормональной активностью, участвует в регуляции гомеостаза глюкозы. МИФ является фармакологической мишенью для лечения сепсиса и злокачественных опухолей. Несмотря на многолетнюю историю изучения МИФ, поиски путей регуляции таутамеразной активности МИФ продолжаются, поскольку это ключ к эффективному контролю многих воспалительных процессов в организме [1]. Конструирование и использование пептидов, являющихся миметиками сайтов взаимодействия белка-партнера с целевым белком в качестве ингибиторов актуально для современной фармакологии. В свете этого интересно изучение белок-белковых взаимодействий МИФ. Было установлено, что МИФ образует комплексы с такими белками как церулоплазмин, антитромбин 3, уромодулин, 2-альфа-макроглобулин и альбумин (АЧ) [2]. Однако, не было понятно модулируют ли эти белки активность МИФ. Ранее нами было установлено, что церулоплазмин является ингибитором МИФ [3]. В данной работе изучалось взаимодействие МИФ с АЧ методами малоуглового рассеяния и поверхностно-плазмонного резонанса. Эксперименты по малоугловому рассеянию комплекса проводились на станции синхротронного излучения P12 (Петра-III, Гамбург, Германия) при различных концентрациях комплекса и разной стехиометрии белков в комплексе. Комплексообразование происходит при предварительной инкубации смеси МИФ и АЧ при 37 градусах. Эксперименты показали, что комплекс не является стабильным и со временем диссоциирует. Был зафиксирован комплекс МИФ:АЧ в стехиометрии 3:1. Вывод о транзитном взаимодействии белков подтвержден поверхностно-плазмонным резонансом. Была получена трехмерная модель комплекса низкого разрешения. Вероятно, АЧ может являться умеренным модулятором активности МИФ. Обсуждаются детали взаимодействия. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-ЕМБЛ № 15-54-74006.*

Литература

1. Fingerle-Rowson G. et al. Mol Cell Biol (2009) 29, 1922
2. Meyer-Siegler KL et al. J Urol. (2006) 175, 1523
3. Kostevich V.A. et al. BioMetals (2015) 28, 817

РЕКОМБИНАНТНАЯ ПРОДУКЦИЯ И РЕКОНСТРУКЦИЯ В ЛИПИД-БЕЛКОВЫЕ НАНОДИСКИ ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ α-СУБЪЕДИНИЦЫ КАЛИЕВОГО КАНАЛА KV7.1 ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

М.Г. Карлова[1,2], Е.Н. Люкманова[1,2], Д.С. Кульбацкий[1,2], М.П. Кирпичников[1,2], О.С. Соколова[1], З.О. Шенкарёв[2]
[1]Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Мутации в генах ионных каналов часто приводят к развитию заболеваний сердечнососудистой, мышечной и нервной систем человека. Данные о структуре ионных каналов необходимы для понимания механизмов их работы, а также для диагностики заболеваний и разработки новых лекарственных препаратов. Рекомбинантная продукция, очистка и кристаллизация

мембранных белков представляют собой сложные задачи. Поэтому, в настоящее время определены пространственные структуры лишь нескольких ионных каналов. Объект представленного исследования – калиевый канал Kv7.1 человека. Этот белок играет важную роль в возбудимости клеток сердечной мышцы. Мутации в гене, кодирующем α-субъединицу Kv7.1 (KCNQ1), являются одной из основных причин наследственной аритмии, – синдроме длинного интервала QT (LQT). Ген KCNQ1, содержащий С-концевой 1D4-tag, был оптимизирован для экспрессии в клетках P. Pastoris и клонирован в вектор pPICZαA. Клон с наибольшей продукцией целевого белка был выбран для дальнейшей работы. Было опробовано два подхода для выделения рекомбинантного канала. Первый подход включал в себя солюбилизацию мембранной фракции детергентом CHAPS и последующую очистку на аффинной смоле Rho1D4. В рамках второго подхода для того, чтобы лучше моделировать природное липидное окружение канала, солюбилизированные белки из мембранной фракции были реконструированы в липид-белковые нанодиски на основе белка MSP2N2. Затем нанодиски, содержащие целевой канал, отделяли с помощью очистки на аффинной смоле. Электронные микрофотографии препаратов Kv7.1 были получены на микроскопе JEOL 2100 с использованием негативного контраста. Анализ микрофотографий показал, что оба использованных подхода позволили получить чистые и гомогенные препараты Kv7.1. Классификация изображений белка в детергенте показала наличие тетрамерной структуры, свойственной природному каналу. Классификация изображений Kv7.1 в нанодисках выявила наличие дополнительного пояса электронной плотности, соответствующего нанодиску. Полученные данные показывают, что нанодиски могут быть использованы для выделения, очистки и дальнейших структурных исследований Kv7.1. *Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (грант № 14.616.21.0044 от 09.10.2015, проект RFMEFI61615X0044) и РНФ (грант №16-14-10338).*

КОНКУРС МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ BTB-ДОМЕНА БЕЛКА CP190 С ИНСУЛЯТОРНЫМИ БЕЛКАМИ CTCF И PITA *DROSOPHILA MELANOGASTER*

А.Н. Бончук[1], М.С. Сабиров[1], А.Ю. Николаева[3], К.М. Бойко[2], О.Г. Максименко[1], П.Г. Георгиев[1] *[1]Институт биологии гена РАН; [2]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН; [3]НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

Инсуляторы – геномные элементы, способные блокировать энхансер-промоторное взаимодействие и распространение гетерохроматина. Белок CP190 – общий компонент большинства известных инсуляторов Drosophila. При помощи димеризующегося BTB-домена CP190 напрямую взаимодействует с ДНК-связывающими инсуляторными белками CTCF и Pita, однако роль CP190 в функционировании инсуляторов остается неясной. При помощи экспериментов с делеционными мутантами *in vitro* нам удалось локализовать участки около 15 ак в первичных последовательностях белков CTCF и Pita, которые необходимы для связывания с CP190, в экспериментах по ко-иммунопреципитации потеря взаимодействия наблюдалась также и при делеции фланкирующих последовательностей. При этом в экспериментах по химической сшивке нами было показано, что димер BTB-домена CP190 связывает лишь одну молекулу CTCF, что позволяет предположить узнавание нескольких пептидных фрагментов. Мы получили кристаллическую структуру BTB-домена CP190 с разрешением 1,3 Å. В целом структура сходна с уже известными структурами BTB-доменов. BTB CP190 имеет пептид-связывающий желобок подобно ранее описанному BTB-домену белка Bcl6. К сожалению, попытки кристаллизации комплекса на сегодняшний день оказались безуспешными. Однако анализ поверхности желобка позволил выявить аминокислоты, потенциально важные для связывания пептидных фрагментов белков Pita и CTCF. Были получены точечные мутации данных аминокислот и проанализировано их влияние на связывание CP190 с белками Pita и CTCF, наибольший эффект имели замены гидрофобных аминокислот. Профиль чувствительности к различным заменам у CTCF и Pita заметно отличается, что позволяет избирательно нарушать связывание CP190 с одним из белков. Таким образом, пептид-связывающий желобок на поверхности BTB-домена действительно участвует в связывании CP190 с инсуляторными белками. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда №14–24–00166.*

ТОКСИН ПАУКА ИНГИБИРУЕТ АБЕРРАНТНЫЕ ТОКИ ЧЕРЕЗ ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ДОМЕН МУТИРОВАННЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ГИПОКАЛИЕМИЧЕСКИЙ ПЕРИОДИЧЕСКИЙ ПАРАЛИЧ

А.А. Василевский[1], З.О. Шенкарёв[1,2], М.Г. Тор[3], А.А. Беркут[1,2], М.Ю. Мышкин[1,2], А.С. Парамонов[1], Д.С. Кульбацкий[1,4], Д. Кузьмин[3], М. Сампедро Кастаньеда[3], Л. Кинг[3], Э. Уилсон[3], Е.Н. Люкманова[1,4], М.П. Кирпичников[1,4], С. Щёрдж[3], Ф. Босманс[5], М.Г. Ханна[3], Д. Кулльманн[3], Р. Манниккo[3]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный; [3]Институт неврологии, Университетский колледжа, Лондона, Великобритания; [4]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [5]Университет Джонса Хопкинса, Балтимор, США

Потенциал-чувствительные ионные каналы обычно содержат мембранные домены двух типов, которые выполняют различные функции. Центральный поровый домен проводит ток и обеспечивает ионную селективность, тогда как периферийно расположенные потенциал-чувствительные домены (ПЧД) необходимы для зависимого от напряжения открытия и закрытия каналов. Однако некоторые мутации могут приводить к возникновению аберрантного ионного тока через ПЧД. В этом случае ионные каналы теряют способность адекватно реагировать на изменения мембранного потенциала, и их физиологическая функция нарушается, что может в конечном итоге привести к патологии. Например, гипокалиемический периодический паралич второго типа обусловлен именно такими мутациями в потенциал-чувствительном натриевом канале NaV1.4, характерном для скелетной мускулатуры; при этом мутированным оказывается первый, второй или третий ПЧД. Токи через так называемые воротные поры (или омега-токи) вызваны мутациями, которые нейтрализуют воротные заряды в чувствительных к изменению потенциала трансмембранных сегментах S4 ПЧД. Мы показали, что токсин Hm-3 из паука-бокохода *Heriaeus melloteei* ингибирует омега-токи через каналы, в которых мутирован второй аргинин S4 ПЧД-I. Однако Hm-3 не влияет на омега-токи в мутантных каналах, где нейтрализован второй аргинин ПЧД-II или III или первый или третий аргинин ПЧД-I. Эксперименты с использованием спектроскопии ЯМР указывают на образование комплекса токсина с ПЧД-I NaV1.4 за счет взаимодействия со спиралью S3b и внеклеточной петлей S3-S4. Наши данные позволяют заключить, что

ПЧД-I является новым сайтом специфического связывания токсинов, модулирующих активность потенциал-чувствительных натриевых каналов. Мы полагаем, что такие токсины могут представлять собой хорошую основу для разработки блокаторов омега-токов и терапии гипокалиемического периодического паралича. *Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология". Исследования с помощью ЯМР-спектроскопии выполнены за счет гранта РНФ № 16-14-10338.*

CBS-ПИРОФОСФАТАЗА ИЗ *DESULFITOBACTERIUM HAFNIENSE* ФОРМИРУЕТ СПИРАЛЬНЫЕ СТРУКТУРЫ В РАСТВОРЕ: МАЛОУГЛОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Л.А. Дадинова[1], В.А. Анашкин[2], Э.В. Штыкова[1,3]
[1]ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва; НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

Одним из важнейших белков любого организма является неорганическая пирофосфатаза (PPase), которая присутствует во всех известных организмах, в том числе в клетках человека. PPase семейства II обнаружены недавно (в 1998 году) в бактериях и археях. Они структурно разнообразны и интерес к пирофосфатазам семейства II обусловлен их потенциальной возможностью использования для создания лекарственных препаратов, поскольку эти ферменты обнаружены в человеческих патогенных микроорганизмах. Часть последовательностей PPase семейства II содержат регулирующую вставку, содержащую пару цистатионин β-синтазы (CBS) доменов в пределах одного из двух каталитических доменов и дополнительный DRTGG домен, функции которого до сих пор точно не определены. Регуляция CBS-PPase происходит по кооперативному механизму [1]. Однако установление основных регулирующих механизмов взаимодействия между доменами представляет большую проблему, поскольку данные о структуре полноразмерного фермента отсутствуют. Методами молекулярного докинга и малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) нами была определена структура гомодимера белка CBS-PPase из *Desulfitobacterium hafniense* (dh-PPase) и проанализировано его поведение в растворе. Мы обнаружили, что dh-PPase в растворе существует в виде равновесной смеси нескольких олигомерных спиралевидных форм. Кроме того, ранее было выявлено, что введение мутации в каталитическую часть dh-PPase приводит к потере кинетической кооперативности у белка, при этом, как мы показали, в растворе мутированный белок образовывает структуры отличные от тех, что наблюдаются у нативного белка. Полученная в ходе исследования информация о структуре CBS-PPase позволит определить пути передачи информации между доменами белка, а также поможет ответить на ряд вопросов, связанных с особенностями регуляции ферментов через CBS домены.

Литература

1. V.A. Anashkin, A. Salminen, H. Tuominen, V.N. Orlov, R. Lahti, and A.A. Baykov. Cystathionine β-Synthase (CBS) Domain-containing Pyrophosphatase as a Target for Diadenosine Polyphosphates in Bacteria// Journal of Biological Chemistry, 2015, 290, 27594-27603.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ ЦИТОХРОМА P450 7B1 ЧЕЛОВЕКА С АМИНОКИСЛОТНОЙ ЗАМЕНОЙ F470I

Я.В. Диченко, С.В. Смольская, С.А. Усанов *Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

Цитохром P450 7B1 человека (CYP7B1, EC 1.14.13.100) – микросомальный фермент, участвующий в биосинтезе предшественников желчных кислот (Chiang, 1998), метаболизме нейростероидов (Steckelbroeck et al., 2002), регуляции синтеза иммуноглобулинов (Bauman et al., 2009) и метаболизме лигандов эстрогеновых рецепторов (Omoto et al., 2005). Особая функциональная нагрузка данного белка в организме человека приводит к тому, что мутации, связанные с нарушением функционирования CYP7B1, являются причиной возникновения нейродегенеративного заболевания – спастической параплегии типа 5 (Stiles et al., 2009). При этом молекулярные механизмы возникновения указанной патологии до сих пор не известны, в первую очередь из-за отсутствия экспериментальных данных об особенностях функционирования мутантных форм белка. В данной работе методом сайт-направленного мутагенеза создан экспрессионный вектор, кодирующий белок CYP7B1 с аминокислотной заменой F470I (CYP7B1_F470I), получен высокоочищенный препарат данного фермента и проведена его структурно-функциональная характеристика. Анализ пространственной структуры мутантного фермента *in silico* указывает на наличие значительных изменений геометрии активного центра по сравнению с исходным белком. Наибольшее отклонение при этом наблюдается для ключевых остатков CYP7B1, участвующих в связывании лигандов. Помимо этого показано, что пространственная структура CYP7B1_F470I в целом обладает большей подвижностью по сравнению с исходным белком. Установлено, что уровень экспрессии CYP7B1_F470I в клетках *E. coli* гораздо ниже по сравнению с ферментом дикого типа. Кроме того, скрининг лигандов показал, что мутантный белок обладает модифицированной активностью по отношению к ряду субстратов CYP7B1. Полученные результаты позволяют понять механизм функционирования CYP7B1 с аминокислотной заменой F470I с целью выбора оптимальной стратегии лечения спастической параплегии типа 5. *Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант № Х16-085).*

ВЛИЯНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ НА ТЕРМАЛЬНУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ДВУХ МИКОПЛАЗМЕННЫХ HU-БЕЛКОВ.

Ю.К. Агапова[1], Д.А. Алтухов[1], В.И. Тимофеев[1,3], Д.А. Корженевский[1], А.В. Власкина[1], Э.В. Бочаров[1,2], Т.В. Ракитина[1,2]
[1]НИЦ Курчатовский институт, Москва; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [3]ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

Гистоноподобный ДНК-связывающий белок HU является наиболее распространённым представителем нуклеоид-ассоциированных белков бактерий (NAPs), которые участвует в суперспирализации и компактизации геномной ДНК и регулируют основные ДНК-зависимые процессы: репликацию, рекомбинацию, репарацию и транскрипцию. HU белок представляет собой, положительно-заряженный димер с ММ около 20 кДа, который связывают ДНК сайт-неспецифическим образом. HU белки отсутствуют в эукариотических клетках и потому могут быть использованы в качестве фармакологических мишеней для создания новых антибактериальных препаратов. В данной работе методом спектроскопии ядерного-магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения мы исследовали структурные и конформационные особенности 2-х микоплазменных HU белков: HUSpm из микоплазмы *S. melliferum* и HUMgal из *M. Gallisepticum*, и их комплексов с ДНК. С помощью комби-

нации моделирования по гомологии и молекулярно-динамической симуляции полученной модели с данными спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения, полученными для 13C/15N-меченых рекомбинантных белков, мы создали полноатомные модели HUMgal и HUSpm и описали их конформационную подвижность. Мы обнаружили, что оба димера имеют характерную для HU белков пространственную укладку, но структура HUMgal очень подвижна, особенно в отсутствии ДНК, тогда как структура HUSpm обладает существенно большей жесткостью. Полученные данные соответствуют результатам, полученным при исследовании тепловой денатурации данных белков методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Более того, различная конформационная подвижность также влияет на способность HUMgal и HUSpm связывать ДНК различной структуры. Полученные молекулярно-динамические модели HU белков могут быть использованы для изучения ДНК-белковых взаимодействий, а также для конструирования и оптимизации структур низкомолекулярных ингибиторов HU белков. *Данная работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №15-14-00063.*

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ РЕЦЕПТОРА IRR С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

А.А. Бойко, А.А. Можаев, О.В. Серова, Т.Н. Ерохина, И.Е. Деев, А.Г. Петренко
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR) входит в мини-семейство рецептора инсулина. Свойство pH-чувствительности IRR определяется его внеклеточной областью и в это вовлечено несколько доменов. Чтобы лучше понять механизм активации IRR, мы создали панель моноклональных антител (МА) против эктодомена человеческого IRR. Нам удалось получить четыре клона мышиных МА, названных 1D2, 3C5, 4C2 и 4D5. Для определения расположения эпитопов МА мы провели серию иммунопреципитаций с различными химерными рецепторами IRR, в которых один из доменов был заменен на соответствующий домен инсулинового рецептора (IR): L1C-IRR, L2-IRR, FnIII-1-IRR и FnIII 2/3-IRR. Клетки, экспрессирующие химерные белки, лизировали в буфере, содержащем Triton X-100, затем клеточные лизаты инкубировали с полученными МА, с последующей сорбцией на сефарозе, конъюгированной с G-белком. В качестве отрицательного контроля использовали мышиные МА к c-myc тагу. Детекцию белка после иммунопреципитации проводили с помощью Вестерн-блота с антителами против С-конца рецептора IRR. Таким образом, если в образце присутствовал сигнал от IRR, мы делали вывод о том, что соответствующий химерный рецептор содержит эпитоп для МА. Мы определили, что эпитоп MA1D2 находится в L1C домене IRR, а эпитопы 3C5 и 4C2 располагаются во втором и третьем фибронектиновых доменах типа III. Четвертое антитело 4D5 распознает эпитоп из первого фибронектинового домена типа III. Данные результаты были дополнительно подтверждены иммуноцитохимией. Также мы показали, что инкубация МА 4D5 с IRR при нейтральном pH приводит к активации рецептора, а инкубация с МА 4C2 в щелочной среде к ингибированию. Таким образом, МА 4D5 представляет собой первый известный агонист IRR белковой природы. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №14-50-00131.*

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ СПЕРМОПЛАЗМЫ ПРИ БЕССИМПТОМНОЙ БАКТЕРИОСПЕРМИИ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ПОВРЕЖДЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ

А.П. Годовалов, Т.И. Карпунина, Н.В. Вавилов
Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

В настоящее время выраженность окислительной модификации белков (ОМБ) признают одним из наиболее ранних и стабильных признаков поражения тканей организма свободными радикалами, образующимися как спонтанно, так и в результате действия эндогенных и экзогенных факторов. Цель исследования – оценить уровень ОМБ, степень нарушения морфологии и активности сперматозоидов при бессимптомной бактериоспермии (ББ). Материалы и методы. Проведено исследование проб эякулята 76 мужчин с ББ и 55 – с невыявленной бактериоспермией. Оценку ОМБ проводили по методу Reznick et al. (1994) в нашей модификации (Годовалов и соавт., 2016). Реакцию проводили с 0,1М раствором 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ). В контрольной пробе использовали растворитель ДНФГ. Образовавшиеся 2,4-денитрофенилгидразоны (ДНФ) регистрировали при следующих длинах волн: 256 нм – основные альдегид-ДНФ, 367 нм – нейтральные кетон-ДНФ, 430 нм – основные кетон-ДНФ и 530 нм – нейтральные альдегид-ДНФ (Копытова и соавт., 2014). Концентрацию окисленных белков выражали в нмоль/мг общего белка, который определяли в биуретовой реакции. Уровень бактериальной обсемененности устанавливали с помощью традиционного бактериологического исследования. При определении морфологии и показателей подвижности сперматозоидов руководствовались рекомендациями ВОЗ (2010). Результаты и обсуждение. Показано, что в спермоплазме пациентов с ББ присутствуют разнообразные микроорганизмы, в т. ч. в составе ассоциаций (38%), которые могут быть источником свободных радикалов либо стимулируют их продукцию иммунокомпетентными клетками. При ББ повышается уровень ОМБ эякулята с преобладанием альдегид-ДНФ, которые, как известно, вырабатываются на ранних стадиях окислительного стресса и служат маркерами фрагментации белков (Губский, 2005). При этом в группе пациентов с ББ установлено 2-кратное снижение числа живых сперматозоидов и их двигательной активности. Заключение. Таким образом, присутствие микроорганизмов в спермоплазме при ББ ассоциировано с повышением уровня ОМБ, что может быть связано с продукцией ими свободных радикалов. В этих условиях регистрируется изменение морфологических и двигательных характеристик сперматозоидов. *Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №16-44-590429, №17_44_590404 и Администрации Пермского края.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ (ФИБРИНОГЕНА, ФИБРИН-СТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ФАКТОРА И СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА) МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

А.Д. Васильева, Л.В. Юрина, М.Г. Горобец, А.В. Бычкова, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия*

Белки являются основными мишенями для активных форм кислорода (АФК) из-за своей высокой чувствительности к свободным радикалам и распространенности в биологических процессах. Несмотря на значительное количество проблем, связанных с окислительными модификациями белков, по-прежнему наблюдается лишь небольшое количество исследований,

направленных на идентификацию сайтов окисления в молекулах. Ряд аминокислотных остатков, восприимчивых к окислителю в различных структурных элементах некоторых функционально важных белков плазмы, были идентифицированы методом масс-спектрометрии. Фибринстабилизирующий фактор был окислен и исследован на разных стадиях активации. Был обнаружен ряд модифицированных аминокислотных остатков, включая обнаруженные в каталитической субъединице pFXIII, Tyr442 и Tyr481, которые находятся в участке связывания ионов кальция и играют важную роль при активации фермента. Анализ сайтов окисления фибриногена показал, что наиболее окисленными участками молекулы являются αC-область и суперспиральный участок, что вероятно, влияет на нарушение латеральной агрегации. Также в окисление значительно вовлекается область D. Окисление AαTrp302, предположительно оказывает влияние на сайт связывания α2-антиплазмина и соответственно на устойчивость молекулы фибриногена к гидролизу. E область, содержащая функционально важные участки, окисляется только после существенного повышения количества окислителя. Наблюдается окисление ряда важных аминокислотных остатков ЧСА. Исходя из модификации His3, можно предположить снижение связывающей способности белка с Cu (I), His67- с Zn (II); Tyr138 и His146, Lys190, Lys525 – связывание жирных кислот в центрах связывания FA1, FA5, FA9, соответственно. Мы также предполагаем, что окисление Trp214, входящего в сайт связывания I, приводит к нарушению структуры этого центра. Полученная информация может сыграть важную роль в создании точных профилей белков для быстрого анализа их модификации методом масс-спектрометрии. *Исследование поддержано РФФИ, проекты № 15-04-08188а и № 16-34-60244 мол_а_дк. Часть исследований, связанных с пептидами и идентификацией PTM с помощью измерений масс-спектрометрии высокого разрешения, была поддержана Российским научным фондом, проект № 16-14-00181.*

ИНДУЦИРОВАННЫЙ ДИССОЦИАЦИЕЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ ПЕРЕХОД АПОБЕЛКА A-I ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ ЗАРЯДА ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Е.А. Гараева, Д.Ю. Литвинов, Е.В. Савушкин, А.Д. Дергунов
Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины, Москва, Россия

Липопротеины высокой плотности (ЛВП) плазмы крови человека при разделении по заряду при слабощелочных значениях pH в агарозном геле заряжены отрицательно и локализованы в preβ- и α-зонах. Нами обнаружено образование из частиц α-ЛВП с поверхностным потенциалом -14 mV частиц ЛВП с увеличенными preα-подвижностью и потенциалом -20 mV при разведении плазмы. Увеличение заряда частиц может происходить за счет изменения конформации при диссоциации основного апобелка ЛВП - апоA-I. Согласно модели Lumry-Eyring, диссоциации апоA-I от частиц предшествует обратимый переход апобелка из «открытой» структуры с липид-ассоциированными N- и C-доменами в «закрытую» структуру с липид-ассоциированным C-доменом и экспонированным в воду N-доменом. Действительно, после разведения плазмы в присутствии экзогенного апоA-I мы наблюдаем снижение содержания preα-частиц до уровня их содержания в неразбавленной плазме, вероятно, за счет блокирования диссоциации апобелка. Присутствие апоA-I в полосе с preα-подвижностью может свидетельствовать о наличии «пред-диссоциированной» структуры апобелка. Заряд частиц ЛВП может определяться степенью протонированности остатков GLU апоA-I: при pH 7,4 остатки GLU диссоциировавшего в воду N-домена депротонированы (pKa=6,4 по данным PBEQ-Solver для кристаллической структуры N-домена апоA-I (PDB: 3R2P)) с генерацией дополнительного отрицательного заряда и preα-подвижности частиц ЛВП, в отличие от полностью протонированного состояния остатков GLU (pKa=8,5 для кристаллической структуры апоA-I (PDB: 1AV1)) в липид-ассоциированном N-домене в α-ЛВП. Предположена вовлеченность частиц с preβ- и preα-подвижностями в распределение апоA-I между липопротеинами, определяющее эффективность эффлюкса холестерина из клеточной мембраны на свободный от липида апобелок. В условиях локального дефицита липид-свободного апоA-I вблизи макрофага возможен переход апоA-I из полностью липид-ассоциированного в частично-диссоциированное состояние с переходом α-ЛВП в preα-ЛВП и последующая диссоциация апобелка в водную фазу. Снижение стабильности структуры и увеличение пула частично-свернутой структуры апобелка могут быть обозначены как пути увеличения эффективности эффлюкса холестерина из макрофагов в зоне атеросклеротического поражения.

СИГМА-1 РЕЦЕПТОР – НОВАЯ МИШЕНЬ ПРИ НЕЙРОПАТОЛОГИЯХ. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ

С.А. Корбан[1,2], В.А. Жемков[1,2], А.А. Кульминская[2], И.Б. Безпрозванный[1,3], М.В. Ким[3] *[1]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; [2]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия; [3]Юго-западный медицинский центр университета Техаса, Даллас, США*

Сигма-1 рецептор (С1Р) – это мембранный белок с обширным спектром биологических функций. Известно, что С1Р является белком-шапероном и внутриклеточным модулятором, а также вовлечен в процессы развития многих нейрологических и психиатрических состояний. В ряде исследований был выявлен терапевтический эффект агонистов С1Р при таких нейропатологиях, как болезнь Альцгеймера и болезнь Хантингтона. Модулирующая шаперонная роль на клеточном уровне и многообразие лиганд-опосредованных фармакологических эффектов делает С1Р многообещающей терапевтической мишенью при изучении и лечении нейродегенеративных заболеваний. Однако механизмы регуляции функций С1Р и его структурно-функциональные отношения остаются неизвестными. В данной работе исследования проводились на рекомбинантном С1Р, слитым с мальтоза-связывающим белком (MBP) и экспрессированном в бактериальной системе *E.coli*. Белок был выделен и очищен до гомогенного состояния методами аффинной хроматографии и гель-фильтрации. С помощью методов гель-фильтрации и нативного голубого электрофореза была охарактеризована четвертичная структура С1Р и было показано, что С1Р в мембранах организован в виде гомоолигомеров (предположительно, тетрамеров), тогда как очищенный белок существует в виде полидисперсной смеси из олигомерных и мономерных форм. Результаты исследований влияния лигандов (3-PPP, NE-100 и PRE-084) на четвертичную структуру С1Р показали, что стимуляция лигандом стабилизирует олигомерные формы С1Р, а также вызывает процессы олигомеризации мономерных субъединиц С1Р. Методами молекулярного клонирования были получены отдельные домены С1Р (трансмембранный и С-терминальный), и проведен анализ их нативной структурной организации. Ведутся работы по кристаллизации цитоплазматического С-терминального домена С1Р. Кроме того, были получены мутантные формы С1Р с мутациями в домене олигомеризации (G88L, G91L), исследована роль данных мутаций в связывании лигандов и их эффект на процессы лиганд-опосредованной олигомеризации. Результаты данной работы

будут иметь важное практическое применение, поскольку C1P является перспективной молекулярной мишенью для разработки лекарственной терапии при нейродегенеративных заболеваниях человека. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-25-00024-П.*

ВЛИЯНИЕ ФОРМЫ И МИКРООКРУЖЕНИЯ НА ТРАНСЛЯЦИОННУЮ ПОДВИЖНОСТЬ БЕЛКОВ

А.М. Кусова[1,2], А.Э. Ситницкий[1], Б.З. Идиятуллин[1], Д.Р. Бакирова[1], Ю.Ф. Зуев[1,2] *[1]Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань; [2]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Исследования подвижности белков в растворах имеет большое значение для понимания их функциональности в биологических системах. Данные о молекулярной подвижности белков связаны явлениями их транспорта, термодинамической стабильности и агрегации, а значит и с вопросом о регуляции функциональной активности. Одной из главных характеристик подвижности белков является коэффициент трансляционной диффузии (КСД). Интерпретация концентрационной зависимости коэффициента самодиффузии имеет большое значение для определения вкладов различных межмолекулярных взаимодействий. До недавнего времени основное внимание уделялось изучению разбавленных растворов белков, однако современные исследования показывают, что концентрация биологических макромолекул внутри клеток значительно выше – до 40%. Вследствие этого увеличился интерес к изучению концентрированных растворов макромолекул. Для нашего исследования были выбраны сфероидальные глобулярные белки: трипсин (ММ=24 кДа), α-химотрипсин (ММ=24.8 кДа) и белок палочкообразной формы – фибриноген (ММ=330 кДа). Диффузионные эксперименты проводились на ЯМР спектрометре Bruker AVANCE III (600,13 МГц), с датчиком TXI 5 мм, оснащенным градиентной катушкой. Для измерения коэффициентов самодиффузии (КСД) использована импульсная последовательность “стимулированное эхо” с биполярными градиентами (BPP-LED). В работе были получены обобщенные концентрационные зависимости КСД исследуемых белков. Экспериментальные данные интерпретированы в рамках двух теоретических подходов: модели жестких сфер [M. Tokuyama, I. Oppenheim, Phys Rev, 1994, 50, 16–19] и феноменологическиого подхода, основанного на фрикционном формализме неравновесной термодинамики [H. Vink, J.Chem. Soc. Faraday Trans.,1985, 81, 1725–1730]. Нами показано, что использованный феноменологический подход достаточно универсален и обеспечивает удовлетворительное описание экспериментальных данных для белков различной формы и размеров в широком диапазоне концентраций, в то время как модель жестких сфер применима только к глобулярным белкам. Полученные результаты позволяют прогнозировать динамику белков в условиях, приближенным к живой клетке. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ – гранты №№ 15-44-02230 р_Поволжье_а и № 15-29-01239 офи_м.*

ДИЗАЙН МОДЕЛИ РАТИОМЕТРИЧЕСКОГО НАНОБИОСЕНСОРА ЛОКАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

Д.В. Мокрова, С.В. Сизова, К.Е. Мочалов, В.А. Олейников
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

При решении ряда биологических и биотехнологических задач возникает необходимость получения данных о распределении температуры, в частности, для контроля распределения температуры в разных частях биологических реакторов при культивировании микроорганизмов, при исследовании динамики изменения распределения температуры в культурах живых клеток и др. В настоящей работе предлагается конструкция наноразмерного биосенсора для измерения температуры в локальных областях нанометрового размерного диапазона. Принцип работы наносенсора основан на использовании термочувствительных свойств "умного" полимера, поли-N-винилкапролактама, с включенными в полимерную матрицу флуоресцентными полупроводниковыми нанокристаллами (квантовые точки, КТ). В отличие от разработанного нами ранее нанотермометра, основанного на использовании КТ одного цвета [1], в данной работе реализован ратиометрический подход. Температура определяется по изменению отношения интенсивности двух пиков флуоресценции КТ двух цветов, локализованных в разных слоях наносенсора. Термосенсор представляет собой слоистую гибридную структуру типа полимер–квантовые точки с ядром из полистирольной микросферы. Внутрь сенсора вводятся два вида CdSe/ZnS квантовых точек (КТ), с разными длинами волн флуоресценции, зелёного и красного цвета. Их располагают в разных, удалённых друг от друга слоях. Концепция нанотермосенсора построена на использовании контролируемого FRET эффекта, возникающего между этими КТ. Показано, что принципиальным является введение красных КТ в ближний к ядру сенсора слой. Термочувствительные свойства сенсору придаёт полимер поли-N-винилкапролактам, сжимающийся при повышении температуры и сокращающий, таким образом, расстояние между слоями, что индуцирует FRET эффект. Для предотвращения возможного проникновения квантовых точек внутрь полистирольного ядра, а также исключения возможности миграции КТ друг к другу, на ядро и между слоями КТ нанесён изолирующий слой тетраэтоксисилана (ТЭОС). Для создания противоположного заряда между слоями КТ введен слой полиэлектролита с положительным зарядом. Степень сжатия полимера определяет соотношение пиков эмиссии двух типов КТ относительно друг друга. Это приводит к изменению отношения интенсивностей пиков, что является параметром, для определения значения температуры. Функциональная пригодность ратиометрических нанотермосенсоров была исследована методами оптической микроспектроскопии. Рабочий диапазон температур соответствует физиологическим значениям (25–45°C). *Эксперименты выполнены с использованием УНУ «Система зондово-оптической 3D корреляционной микроскопии». Работа поддержана РФФИ, проект № 15-29-01193.*

Литература

1. Generalova A.N. et al. (2013) Biosensors and Bioelectronics, 39(1), 187-193.

ОПТИМАЛЬНЫЕ СХЕМЫ ИЗОТОПНОГО МЕЧЕНИЯ ДЛЯ БЫСТРОГО ЯМР-АНАЛИЗА МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ С НИЗКОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ. ПРИМЕНЕНИЕ К ПОТЕНЦИАЛОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ ДОМЕНАМ K^+ И Na^+ КАНАЛОВ

М.Ю. Мышкин[1,2], М.А. Дубинный[1], Д.С. Кульбацкий[1], Е.Н. Люкманова[1], З.О. Шенкарёв[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Московский физико-технический институт (Государственный университет), Долгопрудный, Московская область, Россия

Потенциалозависимые K^+ и Na^+ ионные каналы вовлечены в широкий спектр физиологических явлений, включая возбудимость сердечных, мышечных и нервных клеток, а также секрецию гормонов и нейромедиаторов. Эти каналы имеют мо-

дульную структуру и состоят из пяти мембранных доменов: четырёх потенциалочувствительных доменов (ПЧД) и одного порового домена. ПЧД различных каналов имеют на своей поверхности уникальные сайты связывания с лигандами, и поэтому являются перспективными фармакологическими мишенями. Модульная организация позволяет ставить задачи по структурным ЯМР-исследованиям изолированных ПЧД отдельно от порового домена. В качестве объектов исследования были выбраны ПЧД канала Kv2.1 человека и ПЧД-I канала Nav1.4 человека. Однако, эти исследования были затруднены низкой стабильностью образцов ПЧД в мембраномоделирующем окружении, обусловленной протеолитической деградацией и/или агрегацией молекул доменов. Чтобы решить эту проблему, была применена стратегия «быстрого» отнесения ЯМР-сигналов основной цепи белка. Стратегия основана на селективном введении 13C/15N-изотопных меток, используя бесклеточную систему синтеза. Селективное мечение в комбинации с упрощёнными ЯМР-спектрами даёт информацию о типе аминокислотных остатков в каждом дипептиде. Чтобы получить максимальное количество информации с использованием минимального количества селективно меченых образцов, мы разработали программу «CombLabel». Программа рассчитывает оптимальную схему введения изотопных меток на основании аминокислотной последовательности белка и списка доступных изотопно-меченых аминокислот. Схема введения меток, рассчитанная для каждого ПЧД (~150 остатков), была оптимизирована по цене и состояла из пяти образцов. Анализ 2D ЯМР-спектров 1H,15N-TROSY и HNCO, полученных для каждого образца, в комбинации с ограниченным набором данных, полученных из стандартного набора 3D ЯМР-спектров тройного резонанса, позволил получить отнесение ~70% и 50% сигналов основной цепи изучаемых доменов (Kv2.1 и Nav1.4, соответственно). На основании полученных данных были охарактеризованы вторичная структура и динамика ПЧД. Достигнутая степень отнесения основной цепи достаточна для изучения взаимодействия ПЧД с различными лигандами. *Работа поддержана РНФ (№ 16-14-10338) и РФФИ (№ 16-34-01309).*

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНОГО КОРА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ ДРОЖЖЕЙ *H. POLYMORPHA*

О.А. Петрова[1], Е.В. Родина[2], О.А. Донцова[1,2]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Теломераза – это фермент, участвующий в поддержании стабильности генома, синтезируя повторяющиеся теломерные ДНК последовательности на концах хромосом эукариот. Теломеразная активность детектируется в стволовых, половых и зародышевых клетках, а также в одноклеточных эукариотах, таких как дрожжи, однако в норме отсутствует в большинстве соматических клеток. Активация теломеразы обеспечивает неограниченное деление клеток в 80% типов раковых образований. Структурная характеристика теломеразы и ее компонентов необходима для направленного дизайна потенциальных антираковых препаратов. Основными компонентами теломеразного комплекса являются каталитическая субъединица – теломеразная обратная транскриптаза (TERT) и теломеразная РНК (TR). В последовательность TERT входят N-концевой, РНК-связывающий, каталитический и С-концевой домены. Теломеразная РНК включает в себя матричный участок, комплементарный последовательности теломерного повтора, псевдоузел, элементы TWJ и TBE и Est1-связывающую шпильку. Изучению теломеразы препятствует весьма низкая стабильность её компонентов. В ходе данной работы экспрессией в E. coli был получен стабильный белок, соответствующий hpTERT без N-концевого участка, однако содержащий все остальные домены. Были подобраны условия получения комплекса hpTERT с ДНК-РНК гетеродуплексом, имитирующим субстрат теломеразы. Полученный комплекс, моделирующий минимальный структурный кор теломеразы, был использован для начального скрининга условий кристаллизации.

КАЛЬЦИЕВЫЙ ИМИДЖИНГ нАХР – ПРОСТОЙ МЕТОД СКРИНИНГА СПЕЦИФИЧНОСТИ МУТАНТНЫХ ФОРМ И НОВЫХ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ

Е.Н. Спирова[1], И.В. Шелухина[1], Д.С. Кудрявцев[1], И.А. Иванов[1], Л.О. Оджомоко[1], М.Н. Жмак[1], Е.А. Вульфиус[2], И.Е. Кашеверов[1], Ю.Н. Уткин[1], В.И. Цетлин[1] *[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия*

Высокогомологичные α7 и α9 нАХР вовлечены в различные физиологические процессы и заболевания, поэтому исследование механизмов их функционирования представляет особый интерес. Электрофизиологический метод изучения нАХР в комбинации с сайт-направленным мутагенезом является мощным инструментом для определения ключевых аминокислотных остатков в сайте связывания лиганда, но в случае α7 и α9 нАХР он осложняется низким уровнем экспрессии рецепторов и их быстрой десенситизацией. Мы исследовали лиганд-связывающие свойства мутантов α7/α9 нАХР с помощью простого и быстрого метода кальциевого имиджинга. В его основе лежит ко-экспрессия мутантов α7/α9 нАХР в клетках нейробластомы вместе с шаперонами Ric-3 или NACHO и флуоресцентным белковым кальциевым сенсором Case12 с последующим анализом их фармакологических свойств при помощи флуоресцентного микроскопа или флуориметра (FLIPR) с набором фильтров для детекции GFP. Сродство ацетилхолина и эпибатидина были определены для α7 нАХР человека и крысы и их мутантов, которые содержали гомологичные остатки α9 нАХР в положениях 117-119, 184, 185, 187, 189, предположительно вовлеченных в связывание лиганда. Наибольшее снижение аффинности наблюдалось для мутаций в положениях 187 и 119. Мутация L119D α7 нАХР, демонстрирующая больший эффект для эпибатидина, чем для ацетилхолина, может быть ключевой в фармакологических различиях между α7 и α9 нАХР. Методом кальциевого имиджинга также были исследованы мышечный нАХР и его мутанты с заменами G153S или Y190F в α1-субъединице. Полученные результаты хорошо соответствовали ранее опубликованным данным, что доказывает применимость метода для быстрого функционального анализа различных нАХР. Метод кальциевого имиджинга также применялся для поиска и анализа новых холинергических лигандов, как природных, так и синтетических. В сочетании с пептидным синтезом, радиолигандным анализом и электрофизиологией, были охарактеризованы новые специфические агонисты α7 нАХР (6-бромогипафорин из морского голожаберного моллюска *Hermissenda crassicornis* и новые производные хинолина), а также антагонисты α7 или мышечного нАХР (алкалоиды из яда для наконечников стрел племени Matis, баптиды из яда гадюки *Bitis arietans* и высокоаффинные аналоги α-конотоксина PnIA). *Работа поддержана грантом Президента РФ МК-6216.2016.4.*

ВЛИЯНИЕ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ НА УГЛЕВОД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ЛЕКТИНА ИЗ МИДИИ *MYTILUS TROSSULUS*

А.П. Фильштейн, И.В. Чикаловец, В.И. Молчанова, О.В. Черников
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Формирование пространственной структуры является критичным для функционирования многих белков. Олигомеризация, мультивалентность и мультидоменность очень важны для углевод-связывающих белков - лектинов. Ранее из мидии *Mytilus trossulus* был выделен и частично охарактеризован новый лектин (MTL), установлена его первичная структура. Предсказание пространственной структуры с помощью программ PHYRE2 показало, что MTL имеет тип укладки, называемый «β-трилистник». Такая структура, благодаря наличию внутренней симметрии, может приводить к образованию олигомеров. Методами SDS-электрофореза и динамического рассеяния света установлено, что при хранении лектина и увеличении его концентрации в растворе он образует высокомолекулярные агрегаты. Известно, что некоторые лектины образуют димеры и олигомеры за счет гидрофобного взаимодействия коллагеноподобных доменов молекул с высоким содержанием пролина, глицина и тирозина. Чтобы определить, какой участок MTL ответственен за процесс олигомеризации, мы приняли во внимание тот факт, что бактериальная коллагеназа расщепляет, главным образом, участки коллагеноподобных доменов лектинов, не затрагивая С-концевые участки, содержащие углевод-связывающий сайт. В результате обработки MTL коллагеназой был получен фрагмент лектина с молекулярной массой 11 кДа (С-фрагмент), первоначальная масса MTL по данным MALDI – 16,7 кДа. В условиях нативного электрофореза, MTL плохо проникает в концентрирующий гель и не входит в разделяющий гель. В то же время его С-фрагмент легко входит в нативный гель, давая высокодиффузную полосу. Для определения влияния расщепления коллагеназой на углевод-связывающую активность лектина, мы провели реакцию гемагглютинации (ГА) с нативным лектином и его С-фрагментом. Оказалось, что С-фрагмент полностью теряет способность к агглютинации. Вероятно, это связано с неспособностью расщепленного лектина к олигомеризации. Для подтверждения вышесказанного методом иммуноферментного анализа исследовали взаимодействие нативного и расщепленного лектина с ламинином, содержащим углеводные цепи, к которым лектин проявляет высокую специфичность. Показано, что связывание С-фрагмент с ламинином уменьшается на 37%. Можно сделать вывод, что олигомеризация MTL существенна для некоторых, если не для всех его биологических свойств.

УЧАСТИЕ БЕЗ ДОКЛАДА

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP70 В РАСТВОРЕ МЕТОДАМИ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ, КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА И МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

С.В. Амарантов[1], Н.И. Троянова[2], М.А. Шевченко[2], А.М. Сапожников[2]
[1]Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва, [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Известно, что структура белков в растворе может заметно отличаться от структуры белка в кристалле. С целью проверки конформационных изменений белка Hsp70 в растворе были проведены исследования с использованием метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Предполагалось, что два домена из которых состоит Hsp70 – АТФ- и пептид-связывающего, имеют различные пространственные ориентации друг относительно друга в растворе и кристалле, поскольку известно, что если АТФ-связывающий домен консервативен, то структура пептид-связывающего домена достаточно вариабельна и конформация всего белка зависит от того, с какими молекулами он реагирует в данный момент времени. Другим методом использованным в нашей работе, был метод кругового дихроизма (КД). Методом КД был проведён анализ вторичной структуры с определением разупорядоченных областей в полипептидной цепи для исследуемого белка в растворе. Поскольку эти области остаются не закристаллизованы, то они не могут быть определены методом рентгеноструктурного анализа (РСА). Совокупность методов МУРР и КД позволила уточнить структуру белка в растворе и сравнить полученную модель со структурой белка Hsp70 в кристаллическом состоянии полученным методом РСА и взятой из Proitein Data Bank. Дополнительной частью работы было изучение межчастичного взаимодействия макромолекул белка Hsp70 в фосфатно-солевом буфере с помощью сравнения результатов, полученных методами аналитического ультрацентрифугирования (АУ) и динамического лазерного светорассеяния (ДРС). Это помогло оценить степень гомогенности полученных образцов. В частности, методом АУ было обнаружено наличие в растворе мономеров, димеров, триммеров, и более крепных олигомеров. Сравнение же гидродинамического радиуса RH, полученного методом ДРС, или радиуса Стокса RS, определенного методом АУ, с радиусом инерции Rg, показанным методом МУРР, позволило оценить степень компактности макромолекулы белка Hsp70 в растворе. Поскольку используемые в данной работе методы позволяют работать с белками в растворе, результаты, полученные с помощью совместного использования этих подходов, расширяют существующие представления о процессах самоорганизации макромолекул Hsp70 *in vitro*.

АКТИВНОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ ТРАНСАМИНАЗ В ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Е.Ю. Безсуднова, Т.Н. Стеханова, А.Ю. Николаева, Т.В. Ракитина, К.М. Бойко, В.О. Попов *Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

Функционирование ферментов в водно-органических смесях определяется устойчивостью их активной конформации в дегидрирующих условиях, точнее способностью белковой глобулы удерживать на поверхности гидратную оболочку в этих условиях. Эффективность удерживания молекул воды, как показали исследования, зависит от распределения по поверхности гидрофобных и заряженных остатков, при этом доля последних влияет на размеры и стабильность водных кластеров на поверхности. Взаимодействие заряженных остатков на поверхности глобулы также определяет термостабильность ферментов, поэтому считается, что термостабильные ферменты устойчивы и активны в водно-органических средах. В этом аспекте проанализированы свойства термостабильных трансаминаз IV класса из термофильной бактерии *Thermobaculum terrenum* (TterTA) и археи *Geoglobus acetivorans* (GeoTA). Структурно-функциональная характеристика проведена для рекомбинантных форм ферментов. По субстратной специфичности оба фермента - трансаминазы разветвленных аминокислот, специфич-

ные к L-Leu, L-Val, L-Ile, их кетоаналогам и 2-оксоглутарату (кетоаналогу L-Glu). Температурный оптимум и pH-оптимум реакции деаминирования L-Leu с аминоакцептором 2-оксоглутаратом составили 75°C и 8,0 для TterTA и 80°C и 8,0 для GeoTA. Оба фермента сохраняли 100% активности после инкубации в течение 24 часов в 50% DMSO и 50% ацетонитриле при 50°C; активность TterTA снижалась на 30% и 15% после инкубации в течение 24 часов в 50% метаноле и 50% этаноле, соответственно. GeoTA сохранял 50-85% активности в реакции с L-Leu при 65°C при добавлении 15% DMSO, ацетонитрила или метанола в рабочий буфер. Анализ термостабильности показал, что TterTA теряет только 16% активности после 24 часов инкубации при 70°C, GeoTA теряет 50% активности при 70°C после 5 часов инкубации. Анализ структур активных димеров выявил высокое содержание заряженных остатков на поверхности обеих трансаминаз: 51,6% у TterTA и 50,8% у GeoTA. При этом количество солевых мостиков на поверхности TterTA в два раза больше, чем у GeoTA. Предполагается, что, независимо от скомпенсированности, заряды эффективно удерживают молекулы воды на поверхности ферментов и препятствуют, тем самым, контакту растворителя с белком [Markel et al,2017, Catalysts, 7:142]. *Работа поддержана грантом РНФ 14-24-00172.*

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ СЕКРЕЦИИ ЭНДОГЕННОГО ПЕПТИДА ДЕФЕНЗИНА И ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ КАЛЬЦИЙ-ФОСФОРНОГО ОБМЕНА ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

А.Г. Гаджиев, Э. Новрузов, А.М. Эфендиев *Азербайджанский медицинский университет, Кафедра биохимии, Баку, Азербайджан*

Ревматоидный артрит (РА) наиболее частое воспалительное заболевание суставов, распространенность которого около 1%. Системное негативное влияние на костную ткань при РА приводит к развитию вторичного остеопороза (ОП). Целью данной исследовательской работы явилось определение параметров воспалительной активности заболевания С-реактивного белка, сиаловых кислот, антимикробного пептида- дефензина, маркеров кальций-фосфорного обмена, а также маркеров костного метаболизма оксипролина, остеопонтина, остеокальцина. Была исследована кровь 62 больных. Все больные были подразделены на три группы. 1-я группа больные РА, неосложненым ОП, 2-ая группа - больные РА, осложненным ОП, 3-я группа больных с РА с глюкокортикоид (ГК)-индуцированным ОП . В результате проведенной работы было установлено, что во всех исследуемых группах больных наблюдалось снижение уровня кальция, и магния на фоне повышения содержания фосфора. Установлено, что течение ОП при РА характеризуется снижением остеокальцина на 38,0% и наоборот, повышением содержания свободного оксипролина и остеопонтина на 26,8% и 44,4%. У больных РА с ГК-индуцированным ОП наблюдается снижение уровня остеокальцина на 49,9% на фоне повышения содержания свободного оксипролина на 44,5%. Выявлено,что при ОП, развивающемся у больных РА достоверно повышается уровень остеопонтина. Во всех группах наблюдалось увеличение уровня дефензина на 43%, 54% и 27% соответственно. Таким образом, у больных РА уже на ранних этапах заболевания целесообразно определение остеопонтина, что может служить информативным диагностическим маркером, позволяющим оценить состояние костного метаболизма.

СТРУКТУРНАЯ ЛАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ ПОТЕКСВИРУСОВ

В.В. Макаров, О.В. Карпова, Н.О. Калинина
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Проведено исследование оптических свойств методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) для вирионов и БО трех потексвирусов: вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт), вируса аукуба мозаики картофеля (ВАМК) и Х-вируса картофеля (ХВК). Оказалось, что по характеру их спектров КД в дальнем УФ диапазоне ВМАльт и ВАМК принадлежат к разным группам: вирионы ВМАльт обладают спектром, аналогичным ранее полученному спектру КД вируса мозаики папайи (ВМПап), тогда как ВАМК имеет спектр, сохраняющий некоторые аномальные черты, характерные для спектра КД вирионов ХВК. Проведенное гомологичное моделирование структуры БО в составе вирионов ВМАльт, ВАМК и ХВК на основе известных структур высокого разрешения для вирионов и вирусоподобных частиц потексвирусов ВМПап и вируса мозаики бамбука подтвердило, что альфа-спиральная структура коровой части БО для всех трех вирусов практически идентична. Таким образом, несмотря на одинаковую морфологию и сходную структуру вирионов, разные члены рода Potexvirus отличаются спектрами КД в дальнем УФ диапазоне. Вместе с тем сравнение аминокислотных последовательностей БО различных потексвирусов и предсказание неструктурированных участков в их составе указывает на вероятную корреляцию специфических особенностей в спектрах КД вирионов с наличием N-концевых неупорядоченных участков в составе БО. Структурная лабильность вирионов потексвирусов, определяющая, как предполагается, их биологические активности обсуждается. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-24-00007.*

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА И ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФОСФАТ-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ ОБЛАСТИ У НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ

Н.Н. Мордкович[1], Т.Н. Сафонова[1], А.Н.Антипов[1], В.А. Манувера[2], К.М. Поляков[3], Н.А. Окорокова[1], В.П. Вейко[1]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [2]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА; [3]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

С целью исследования роли отдельных аминокислотных остатков и структурных особенностей фосфат-связывающего сайта (PiB) в нуклеозидфосфорилазах получена серия мутантных и гибридных форм уридинфосфорилаз (UP, КФ 2.4.2.3) из различных микроорганизмов (SoUP – *S. oneidensis* MR-1, EUP – *E. coli*, SaUP – *S. thyphimurium*). Определена общность архитектуры PiB у нуклеозидфосфорилаз протеобактерий. Показано, что точечные замены аминокислотных остатков (а.о.) R27K, R45K, R88K и T91A полностью инактивируют SoUP, в то время как мутант G23A сохраняет 50% от ее исходной активности. Обнаруженная нами ранее (мутанты C212S для SoUP и C206S у EUP) важность вторичной структуры подвижного петлевого участка 223–236 а.о. для формирования ферментом «закрытой» и «открытой» форм PiB подтверждена конструированием дополнительной двойной замены C206S, L211Q EUP, полностью восстанавливающей потерю активности у исходного мутанта C206S. Сконструирована гибридная (ES-1) форма UP (замещение первых 43 N-концевых а.о. EUP на соответствущий участок из SaUP). Показано, что полученная гибридная форма UP проявляет активность на уровне фермента из *S. thyphimurium*. Получены кристаллы мутантной (D27G EUP) и гибридной (ES-1) форм уридинфосфорилазы и исследована их пространственная структура. Изучение физико-химических, ферментативных свойств полученных форм уридинфосфори-

лаз позволило выявить структурно-функциональные особенности строения PiB в нуклеозидфосфорилазах и построить модель взаимодействия сайтов связывания двух субстратов – уридина и неорганического фосфата – в процессе фосфоролиза нуклеозидов этим классом ферментов. *Исследование выполнено при поддержке РФФИ (Грант, № 15-04-08440) и Российского научного фонда (Грант № 14-24-00172).*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРА, ИНГИБИРУЮЩЕГО МИГРАЦИЮ МАКРОФАГОВ, И CD74 УСИЛИВАЕТСЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ

А.В. Соколов, В.А. Костевич, Н.П. Горбунов, Н.А. Грудинина, В.Б. Васильев
Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Ранее нами было установлено, что медь-содержащий белок острой фазы воспаления церулоплазмин (ЦП), благодаря наличию лабильно связанных ионов меди, образует белок-белковый комплекс с фактором, ингибирующим миграцию макрофагов (МИФ) – ключевым цитокином воспаления. Введение насыщенного медью ЦП усиливало провоспалительную активность МИФ при моделировании септического шока у мышей *in vivo*, приводя к 100% смертности мышей, а аффинные антитела против МИФ препятствовали этому. Поскольку для активации провоспалительной активности МИФ необходимо его взаимодействие с инвариантной цепью главного комплекса гистосовместимости (CD74), были основания высказать гипотезу, что ЦП с лабильно связанной медью может влиять на взаимодействие МИФ и CD74. Для проверки гипотезы был клонирован внеклеточный домен рецептора CD74 (sCD74), получена плазмида, кодирующая N-концевую полигистидиновую последовательность, сайт для гидролиза тромбином перед аминокислотной последовательностью sCD74. Нами отработан протокол, позволивший выделить высокоочищенный sCD74 из телец включения *E. coli* с помощью металл-хелатной хроматографии, гидролиза тромбином и аффинной хроматографии на МИФ-агарозе. Соответствие аминокислотной последовательности электрофоретически гомогенного sCD74 было доказано с помощью масс-спектрометрии фрагментов трипсинолиза (найдено 90% предсказанной последовательности). Взаимодействие ЦП, МИФ и sCD74 изучали с помощью аффинной хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле без детергентов и метода поверхностного плазмонного резонанса. С помощью оптических сенсоров с иммобилизованным МИФ (BiaCore X-100) мы показали, что на взаимодействие МИФ и sCD74 практически не влияли ионы меди: константы диссоциации 19,1±1,2 и 17,7±0,9 нМ. ЦП лишенный ионов лабильной меди не влиял на взаимодействие МИФ и sCD74, напротив, присутствие ионов меди в ЦП увеличило сродство МИФ и sCD74 в 1,5 раза: константа диссоциации 12,2±0,7 нМ. Аналогичные результаты были получены с помощью метода аффинной хроматографии: ЦП с лабильно связанными ионами меди способствовал взаимодействию sCD74 с иммобилизованным на агарозе МИФ. Таким образом, мы показали, что ЦП может усиливать взаимодействие МИФ с внеклеточным доменом CD74. *Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-04-01182.*

ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ ФЕРМЕНТОВ

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ПРОЦЕСС ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ

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

Эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER) – эффективный процесс защиты клеток млекопитающих от наиболее распространенных типов повреждений ДНК, возникающих при окислительном стрессе. В BER принимают участие различные ферменты и белковые факторы, регулирующие их активность. Взаимодействия между ферментами и регуляторными белками способствуют координации процесса BER при восстановлении поврежденной ДНК. Белок-белковые взаимодействия участников BER высших эукариот были нами исследованы количественно с использованием оригинального подхода, основанного на получении флуоресцентно меченых белков и флуоресцентном титровании в присутствии ДНК-интермедиатов процесса BER. Охарактеризована прочность белок-белковых взаимодействий в ряде комплексов, образованных ДНК-полимеразой β (Polβ), апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой 1 (APE1), поли(ADP-рибозо)полимеразой 1 (PARP1), белком XRCC1 и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразой 1 (TDP1). Впервые были обнаружены и количественно охарактеризованы комплексы APE1 с PARP1 и TDP1, Polβ с TDP1, а также взаимодействие APE1 с Polβ в отсутствие ДНК. Белок XRCC1 и Polβ образуют самый прочный комплекс, который рассматривается нами как устойчивая часть мультибелкового ансамбля, функционирующего в процессе BER и обеспечивающего наиболее эффективную репарацию. Прочность белок-белковых взаимодействий в разной степени модулируется ДНК-интермедиатами BER, обеспечивая механизм координации и регуляции процесса BER. Была исследована функциональная роль N-концевого домена APE1 в регуляции процесса BER, что позволило установить его ключевую роль во взаимодействии с другими белками BER. Совокупность полученных данных указывает на существование комплекса BER, формируемого белок-белковыми контактами ферментов BER и ключевых регуляторных факторов, таких как PARP1 и XRCC1. Эффективность этих взаимодействий в процессе BER модулируется специфическими белковыми доменами, поврежденными структурами ДНК и поли(АДФ-рибозил)ированием. Полученные результаты значительно проясняют механизм функционирования «репарасомы» BER высших эукариот. *Работа выполнена в рамках проекта РНФ 14-24-00038 и РФФИ-ERA.Net 16-54-76010.*

Литература

1. Moor et al, Nucleic Acids Res., 2015; Alemasova et al, Biochem. Biophys. Acta, 2016

МУЛЬТИМОДУЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЛИКОЗИДГИДРОЛАЗ

И.А. Дворцов[1], Н.А. Лунина[1], В.В. Зверлов[1,2], Г.А. Великодворская[1], И.В. Демидюк[1], С.В. Костров[1]
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия; [2]Институт микробиологии, Мюнхенский технический университет, Фрайзинг, Германия

Модульная структура является одним из базовых принципов структурно-функциональной организации белковых молекул. При этом в состав мультимодульных белков могут быть включены индивидуальные модули, не имеющие, на первый взгляд, непосредственного отношения к функции данного фермента. Белками с таким типом структурной организации являются гликозидгидролазы, в состав которых может входить более 10 различных функциональных модулей. Нами обнаружена и охарактеризована 9-модульная гликозидгидролаза Lic16A из *Ruminiclostridium thermocellum*. Этот фермент состоит из трех SLH модулей, обеспечивающих присоединение к поверхности бактериальной клетки, углевод-связывающего модуля 54 семейства (CBM54), расположенного сразу за SLH модулями, каталитического модуля и еще четырех углевод-связывающих модулей, принадлежащих к семейству 4. Необходимо подчеркнуть, что ни один из этих 5 входящих в состав фермента углевод-связывающих модулей не способен взаимодействовать с субстратами, на которых активен каталитический модуль. CBM54 – первый представитель обнаруженного нами нового 54-ого семейства углевод-связывающих модулей. Модуль способен взаимодействовать с рядом нерастворимых углеводных субстратов – хитином, хитозаном, ксиланом, Авицелом. Интригующей особенностью данного модуля является наличие в его структуре специфического сайта ограниченного протеолиза, расщепление в котором происходит как в составе природного полноразмерного фермента, так и при биосинтезе индивидуального модуля в *E. coli*. Механизм формирования разрыва полипептидной цепочки неизвестен. Нами сконструированы мутантные варианты CBM54, несущие аминокислотные замены в области сайта разрыва. Введенные мутации блокируют расщепление полипептидной цепи, при этом мутантные модули сохраняют способность связываться с нерастворимыми полисахаридными субстратами. Совокупность полученных данных позволяет предположить, что Lic16A может функционировать по «челночному» механизму, когда после формирования разрыва полипептидной цепи укороченный белок отделяется от поверхности клетки и закрепляется на нерастворимом субстрате, участвуя, таким образом, в формировании «внешней пищеварительной системы» бактерии.

ФЕРРОХЕЛАТАЗА ЧЕЛОВЕКА: УЧАСТИЕ В БЕЛОК–БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ И ДЕЙСТВИЕ ПРИРОДНОГО БИОРЕГУЛЯТОРА ИЗАТИНА

А.С. Иванов[1], П.В. Ершов[1], Ю.В. Мезенцев[1], Л.А. Калужский[1], Е.О. Яблоков[1], А.В. Флоринская[1], А.Е.Медведев[1], А.А. Гилеп[2], С.А. Усанов[2]
[1]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия; [2]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Феррохелатаза (FECH) является одним из важных белков организма человека, имеющих медицинское значение. Она катализирует процесс включения иона железа (II) в молекулу протопорфирина IX с образованием молекулы гема. Нарушение функции FECH приводит к развитию эритропоэтической порфирии, обусловленной накоплением протопорфирина в тканях организма.

Данная работа посвящена исследованию белок-белковых взаимодействий (ББВ) FECH и возможных способов их регуляции, что может значительно расширить понимание сложных молекулярных процессов с ее участием. На сегодняшний день для FECH известно лишь 4 белка-партнера: фратоксин, НАДН-дегидрогеназа, митоферин-1 и Abcb10.

С помощью технологии прямого молекулярного фишинга [1] нами были обнаружены четыре новых потенциальных белка-партнера FECH: цитохром b5 (CYB5A), белок SMAD4, адренодоксин редуктаза (ADR) и сама FECH, которая может образовывать гомодимеры 86 кДа. SPR валидация подтвердила взаимодействие всех 4 белков с иммобилизованной на оптическом чипе FECH с Kd порядка 0,5-10 мкМ. Взаимодействие двух молекул FECH при ее димеризации происходит с Kd=0,5 мкМ. Обнаружено, что CYB5A и SMAD4 взаимодействуют как с мономерной, так и с димерной формой FECH. В тоже время, ADR связывается только с мономерной FECH.

ББВ в организме человека могут контролироваться многими биорегуляторами [2]. Наиболее интересной в данном плане оказалась пара ADR/FECH. Нами была обнаружена конкуренция между FECH и адренодоксином при взаимодействии с ADR. Как известно, эндогенный биорегулятор изатин (индол-дион-2,3) может действовать через изатин-связывающие белки [3] или непосредственно влиять на ББВ [4-5]. Однако, в отличие от ранее наблюдаемых эффектов изатина по торможению ББВ, в случае пары ADR/FECH впервые было обнаружено 15-кратное увеличение аффинности ББВ. *Работа была выполнена при поддержке РНФ (грант 16-14-10327).*

Литература

1. Иванов и др. Биоорган. химия, 2016, 42, 18-27.
2. Veselovsky et.al. J. Mol. Recognit. 2002, 15, 405-422.
3. Buneeva et al. Proteomics, 2010, 10, 23-37.
4. Medvedev et al. Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 476-495.
5. Buneeva et al. Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chemistry, 2015, 9, 185-188.
6. Ершов и др. Биомед. химия, 2017, 63, 170-175.

БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И ЛИЗОЦИМА: НОВЫЕ АСПЕКТЫ

П.А. Левашов[1], Д.А. Матолыгина[1], Е.Д. Овчинникова[1], Н.Л. Еремеев[1], Д.Л. Атрошенко[1], С.С. Савин[1], С.А. Смирнов[1], В.И. Тишков[1,2], А.В.Левашов[1]

[1]Кафедра химической энзимологии, Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Бактериолитические ферменты известны очень давно. Лизоцим из куриных яиц считается одним из самых изученных ферментов. В последнее время бактериолитические ферменты всё чаще рассматриваются как альтернатива антибиотикам для борьбы с резистентными видами бактерий. Тем не менее, до сих пор остаётся нерешённой методическая задача корректного измерения активности непосредственно на живых бактериальных клетках в качестве субстрата. Исследование активности на искусственных субстратах не даёт полноценной картины особенности работы фермента в реальных условиях. Интерлейкин-2 является одним из важнейших регуляторов иммунной системы, используется при лечении рака и сепсиса. Недавно было открыто, что интерлейкин-2 обладает бактериолитической активностью. Спектр видов бактерий, чувствительных к интерлейкину-2 и к лизоциму, в целом не совпадает. Однако есть такие бактерии, которые чувствительны к действию как лизоцима, так и интерлейкина-2.

В данной работе предложены общие подходы для измерения активности и корректного расчёта параметров в случае различных бактериолитических ферментов и различных бактерий в качестве субстрата. Изучено действие интерлейкина-2 и лизоцима на различных субстратах – живых бактериальных клетках. Обсуждаются характерные особенности субстратной специфичности интерлейкина-2. Рассмотрены различные низкомолекулярные физиологически активные вещества, которые могут повышать или понижать активность лизоцима или интерлейкина-2. В частности, выявлено, что глицин активирует лизоцим, но не влияет на интелейкин-2; глутамат активирует и лизоцим и иетерлейкин-2; милдронат активирует только интерлейкин-2. Новые данные, полученные в работе могут помочь более глубокому пониманию действия лизоцима и интерлейкина-2 при медицинском применении. Это важно как для более эффективного сочетания при применении существующих медикаментов, так и для разработки новых фармацевтических препаратов. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 15-14-00012 «Исследование бактериолитической активности интерлейкина-2»).*

ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)-ПОЛИМЕРАЗА-1 – НЕДООЦЕНЕННАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ ТЕРАПИИ

С.И. Шрам, А.С. Ефремова, И.А. Недорубова, Н.Ф. Мясоедов

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Система поли(АДФ-рибозил)ирования (ПАРирования) белков играет важную роль в поддержании целостности генома и в других процессах, обеспечивающих нормальное функционирование эукариотической клетки в течение всей ее жизни. Одновременно с этим система ПАРирования может активно вовлекаться в патологические процессы, связанные с воспалением и окислительным стрессом. Хорошо изучена ее негативная роль при ишемии/реперфузии органов и тканей. Ключевым игроком в этих патологических процессах является белок поли(АДФ-рибоза)-полимераза-1 (ПАРП-1). С использованием клеточных моделей нами исследовалось участие ПАРП-1 в кардиотоксическом действии противоопухолевого агента доксорубицина (Dox) и в диабетической кардиомиопатии. В обеих рассматриваемых моделях выявлен феномен устойчивого повышения уровня ПАРированных белков в клетке при действии повреждающих факторов – цитотоксических доз Dox или гипергликемии. Показано, что активизация процесса ПАРирования белков при рассматриваемых патологических ситуациях увеличивает вероятность гипертрофии, клеточного старения и гибели кардиомиоцитов. При этом фармакологическое ингибирование ПАРП-1 значительно снижает или даже полностью предотвращает наблюдаемые патологические реакции кардиомиоцитов. Таким образом, полученные нами и другими исследователями данные являются веским основанием для рассмотрения ПАРП-1 в качестве потенциальной мишени для кардиопротекторной терапии, направленной на предотвращение развития сердечной недостаточности при рассматриваемых патологиях. В этой связи весьма актуальным, на наш взгляд, является переход от полученных многообещающих экспериментальных фактов к решению непосредственно фармакологических задач на животных моделях и дальнейшая трансляция разработанных схем лечения на клинический уровень. Немаловажным фактором, способствующим прогрессу в данном направлении, является то, что несколько ингибиторов ПАРП-1 в настоящее

время уже проходит клинические испытания в качестве противоопухолевых препаратов, действие которых направлено на снижение репарационного потенциала раковых клеток. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01870).*

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДНК ПОЛИМЕРАЗЫ *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*

Р.Р. Гарафутдинов, М.А. Максимова, А.Р. Сахабутдинова
Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

В последнее время широкое распространение получили методы изотермической амплификации ДНК, для проведения которой используются полимеразы с цепь-смещающей активностью: phi29, Bst exo-, Vent exo- и др. Наиболее часто применяется большой фрагмент ДНК полимеразы из *Geobacillus stearothermophilus* (Bst exo-). Для нее нередко наблюдается образование неспецифичных продуктов даже в отсутствие матрицы и праймеров, но механизм данного явления до сих пор не ясен. Нами изучено влияние ряда параметров на образование неспецифических продуктов при амплификации ДНК с помощью Bst exo- по типу "катящегося кольца" с двумя праймерами (вариант "рамификация"). В ходе рамификации образуются конкатемерные продукты, проявляющиеся на электрофореграмме в виде набора полос (лестницы) с длинами, кратными размеру исходной матрицы. Была смоделирована молекулярная система, состоящая из линейной или соответствующей ей кольцевой матрицы и двух праймеров. Варьированию подвергали тип матрицы (линейная или кольцевая, одно- или двуцепочечная), ее нуклеотидную последовательность, длину и количество копий, а также состав реакционной смеси, протоколы амплификации и способ детекции результата (в реальном времени и по конечной точке). При использовании кольцевых ДНК всегда получали характерную лестницу полос на электрофореграммах. В то же время аналогичная картина наблюдалась для некоторых вариантов молекулярной системы с использованием линейной одноцепочечной ДНК, т.е. протекала неспецифичная амплификация. Обнаружено, что она не происходит при малом количестве матрицы (менее 10^5 копий), в присутствии SYBR Green I, при использовании матрицы длиной более 60–70 нуклеотидов или двуцепочечной ДНК. Секвенирование целевых продуктов рамификации дало ожидаемый результат. Клонирование и секвенирование неспецифичных конкатемерных продуктов проводили тремя разными способами, поскольку их состав и структура были неизвестны. Оказалось, что последовательность неспецифичных продуктов представляет собой прямые повторы последовательности исходной матрицы, но с редукцией одного из концов в зависимости от использованного затравочного праймера. На основе совокупности полученных данных предложен механизм неспецифической амплификации ДНК с помощью полимеразы Bst exo-, исключающий ранее высказанные предположения.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОИНФОРМАТИКИ И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОИСКА ПУТЕЙ МОДУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ

Д.А. Суплатов, С.М. Балдин, Н.К. Панин, В.К. Швядас
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Поиск путей модуляции функциональных свойств ферментов необходим как при создании биокатализаторов, так и при дизайне новых лекарственных средств. Задачу можно решить двумя путями – путем изменения структуры белка, а также в результате взаимодействия фермента с модулирующими молекулами. Использование методов биоинформатики и молекулярного моделирования позволяет ускорить поиск путей модуляции. До недавнего времени в дизайне лекарств основной интерес представлял поиск конкурентных ингибиторов, способных связываться в активных центрах ферментов и предотвращать взаимодействие с субстратами и кофакторами. В последние годы становится ясным, что в структуре ферментов наряду с хорошо изученными активными центрами имеется множество других участков связывания, функциональная роль которых неизвестна. Это согласуется с обсуждаемой в последнее время идеей о том, что способность к аллостерической регуляции может быть присуща практически всем белкам. В этой связи вызывает интерес идентификация неизвестных участков связывания в белках, а также выяснение их роли в модуляции функции. Для решения этих задач мы предлагаем использовать методологию, объединяющую возможности биоинформатики и молекулярного моделирования, которая была опробована при поиске путей модуляции активности, селективности и стабильности ферментов разных семейств. Таким образом, были идентифицированы вариабельные позиции в структуре ферментов, определяющие разнообразие функциональных свойств, и получены мутантные формы с заменами в этих позициях, что позволило увеличить стабильность и синтетическую активность пенициллинацилазы, расширить субстратную специфичность D-аминопептидазы и придать амидазную активность липазе. Эта методология позволила найти неизвестный участок связывания в структуре глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и комплементарные ингибиторы с новым механизмом действия, способные селективно подавлять активность фермента микобактерий, но не его человеческого гомолога. Разрабатываемая методология может быть использована при изучении механизмов действия ферментов, выявлении функционально важных аминокислотных остатков и участков связывания лигандов, а также выборе точек для мутации с целью рационального дизайна ферментов. *Исследования поддержаны Российским научным фондом (грант 15-14-00069).*

МОДУЛЯЦИЯ СПЕКТРОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ В ЛЮЦИФЕРИН-ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ СИСТЕМЕ СВЕТЛЯКОВ

Н.Н. Угарова, Ю. Модестова
Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Максимум спектров биолюминесценции жуков наблюдается в интервале от 490 до 590 нм. Структуры исходного люциферина и продукта его окисления, оксилюциферина, а также химический механизм биолюминесцентной реакции идентичны у всех известных видов светляков, а наблюдаемые различия в спектрах биолюминесценции обусловлены различиями в структуре белкового окружения эмиттера. В отличие от других биолюминесцентных систем, в люциферин-люциферазной системе светляков продукт реакции—электронно-возбужденный оксилюциферин—способен существовать в шести химических формах за счет кето-енольной таутомерии и протолитических равновесий фенольной группы. Все эти формы отличаются по спектрам испускания, и преобладание той или иной формы зависит от специфических взаимодействий эмиттера с ами-

нокислотными остатками активного центра фермента (образование водородных связей и донорно-акцепторных комплексов), а также от неспецифического влияния микроокружения эмиттера (локальные изменения pH, полярность среды). Различное белковое окружение может способствовать стабилизации одной или другой формы эмиттера. Анализ литературных данных и наших экспериментальных результатов позволил сделать вывод, что желто-зеленое свечение определяется енольной формой эмиттера, а красное – кетонной. Сосуществование этих двух основных форм эмиттера приводит к появлению двух максимумов в спектрах биолюминесценции и является свидетельством сосуществования в растворе по крайней мере двух конформеров фермента. Доминирующая форма эмиттера определяется не только его взаимодействиями с ближайшим аминокислотным окружением, но и дальнодействующими и даже междоменными взаимодействиями в белковой глобуле. Использование направленного и случайного мутагенеза позволило получить ферменты с измененной формой и pH-зависимостью спектров биолюминесценции, расширив возможности практического применения люциферазы светляков.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИГАНД-СПЕЦИФИЧНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ПРОТЕИНКИНАЗ

Д.А. Карасев, П.И. Савосина, А.В. Веселовский, Д.А. Филимонов, Б.Н. Соболев
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Функциональные характеристики белковых молекул часто зависят от небольшого количества аминокислотных остатков. Такие аминокислотные позиции могут играть решающую роль при связывании с низкомолекулярными лигандами как естественными, так и искусственными. Их выявление важно при конструировании лекарств, поиске новых лекарственных мишеней, белковой инженерии ферментов и др. В данной работе для определения лиганд-специфичных аминокислотных остатков протеинкиназ применялся оригинальный метод SPrOS. Метод позволяет определять консервативные позиции в функциональных подгруппах белкового семейства по сходству их локального окружения в аминокислотных последовательностях без предварительного выравнивания. Результаты предсказания проецировались на трехмерные структуры изучаемых протеинкиназ в комплексе с соответствующими ингибиторами. Это позволило проанализировать роль предсказанных позиций в формировании ингибиторной специфичности. Метод был протестирован на протеинкиназах с разным спектром ингибирования. При этом классы ингибиторной специфичности белков могут пересекаться между собой. Для выявления аминокислотных остатков, определяющих специфичность к разным ингибиторам, мы предсказывали позиции в одном и том же белке, специфичные к разным ингибиторам. Для разных ингибиторов, действующих на одну и ту мишень, были определены разные группы аминокислотных остатков. Предсказанные остатки были локализованы в области АТФ-связывающем кармана, которая непосредственно контактирует с молекулой ингибитора, соседних участках, которые влияют на конформацию кармана, а также в более отдаленных частях белковой молекулы. При исключении ближайших гомологов тестируемого белка из исследуемой выборки часть отдаленных позиций переставала получать значимые оценки. Эта процедура позволяет точнее локализовать аминокислотные остатки, ассоциированные с лигандной специфичностью, а не с филогенетическими отношениями. Было показано, что сходные фрагменты разных ингибиторов, контактируют с одними и теми аминокислотными остатками протеинкиназы. Мы продемонстрировали эффективность предложенного подхода для определения паттернов лигандной специфичности в аминокислотных последовательностях белков.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00491-а.

«КОНФОРМАЦИОННЫЙ «ПОРТРЕТ» АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА В КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

О.А. Кост[1], В.Е. Тихомирова[1], О.В. Крюкова[1], Е.З. Голухова[2], С.М. Данилов[3]
[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева, Москва, Россия; [3]Department of Anesthesiology, University of Illinois at Chicago, IL, USA

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ, КФ 3.4.15.1) – цинк-металлопептидаза, которая является ключевым регулятором кровяного давления и участвует в развитии сосудистых патологий и ремоделирования. Этот фермент состоит из двух доменов (N и C) в составе единой полипептидной цепи. Эпитопное картирование фермента с помощью моноклональных антител к 16 различным конформационным эпитопам на поверхности обоих доменов АПФ человека обнаружило, что большинство эпитопов включают в себя потенциальный сайт гликозилирования. Гликозилирование АПФ зависит от клеток и органов, продуцирующих фермент, и, следовательно, локальная конформация поверхности молекул АПФ, продуцируемая определенными клетками, уникальна. Эффективность связывания набора из 16 моноклональных антител, направленных к различным эпитопам на поверхности двух доменов ангиотензин-превращающего фермента – «конформационный портрет» – является чувствительным маркером конформации АПФ и также может определяться природой источника фермента. В норме АПФ в кровь в основном поступает из эндотелиальных клеток легких при переходе из мембрано-связанного состояния в растворимое путем протеолитического отщепления. Однако конформационный портрет АПФ позволяет выявить присутствие в крови фермента, продуцируемого другими типами клеток, например, клетками Гоше и клетками саркоидных гранулем. Показано наличие конформационно измененного ангиотензин-превращающего фермента в крови больных уремией, причем этот фермент характеризовался более высокой активностью по отношению к ангиотензину I и сниженной эффективностью ингибирования специфичными ингибиторами. Обсуждаются перспективы выявления в крови АПФ из сердца для определения групп риска развития мерцательной аритмии. *Работа поддержана Грантом Правительства Российской Федерации (№ 14.Z50.31.0026).*

ФРАГМЕНТЫ IgA1 ПРОТЕАЗЫ *N. MENINGITIDIS* КАК ОСНОВА ПОЛИВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ

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

Бактериальный менингит относится к группе социально опасных заболеваний и характеризуется тяжелыми осложнениями и высокой смертностью. Используемые в настоящее время менингококковые вакцины направлены против возбудителей

инфекции определенных серогрупп, поэтому для защиты населения от всего многообразия штаммов менингококка требуется многокомпонентная вакцинация. Разработка менингококковой вакцины в отношении широкого спектра возбудителей менингита с общим фактором вирулентности и поиск соответствующих защитных иммуногенов является актуальной научно-исследовательской задачей. В качестве антигенной основы поливалентной вакцины мы выбрали сериновую IgA1 протеазу, являющуюся одним из основных факторов вирулентности ряда патогенов: *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, полагая при этом, что нейтрализация фермента будет препятствовать адгезии бактерий на слизистых оболочках человека, предотвращая проникновение патогенов во внутреннюю среду организма. Перспективность такого подхода была показана нами на примерах IgA1 протеазы (IgA1pr) из живой культуры *N. meningitidis* серогруппы А и рекомбинантной IgA1pr менингококка серогруппы В (штамм 44/76) в ферментативно активной и неактивной (мутантной) формах. Исследование влияния различных участков первичной структуры IgA1pr (A28 – P1004) на иммуногенность и протективные свойства белка в отношении менингококков позволило выбрать фрагменты молекулы фермента, содержащие детерминантные антигены, и получить ряд рекомбинантных соединений с потенциальным протективным действием. Показано, что большинство созданных нами рекомбинантных белков обладают высокой иммуногенной активностью, а четыре из них обеспечивают эффективную защиту мышей от заражения живыми вирулентными культурами менингококков основных эпидемических серогрупп – А, В и С, сопоставимую с исходным ферментом. Полученные результаты позволили нам рассматривать рекомбинантные белки, фрагменты IgA1pr, в качестве антигенной основы поливалентной вакцины для профилактики бактериальных менингитов и, возможно, других заболеваний, вызываемых патогенами, секретирующими IgA1 протеазу.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ IgG БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

Д.П. Смирнова[1], Д.А. Паршукова[1], Е.А. Ермаков[1,2], Л.Е. Синянский[3], Н.М. Кротенко[1,3], А.В. Семке[1], В.Н. Бунева[2], Г.А. Невинский[2]
[1]НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск; [2]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [3]Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Около 30 лет известна способность иммуноглобулинов катализировать ряд химических реакций. Группой С. Пола в 1989 г. было показано, что фракция антител специфично гидролизовала вазоактивный интестинальный пептид. В дальнейшем были открыты Ig с фосфатазной активностью, РНК-, ДНК-, АТР-, полисахарид- и белок-гидролизующие, а также с липид-, протеин- и полисахарид-киназными активностями антител при различных аутоиммунных и некоторых инфекционных болезнях. На сегодняшний день известно о наличии у больных шизофренией самых разных типов антител: антимозговые, антимышечные, противолимфоцитарные, противолекарственные и др. Каталитические свойства иммуноглобулинов класса G больных психическими расстройствами ранее не исследовались. Иммунологически гомогенные препараты иммуноглобулинов класса G больных шизофренией были последовательно выделены из сыворотки на колонке с Protein G Sepharose. Был исследован ряд каталитических активностей антител. Для доказательства принадлежности исследуемых каталитических активностей непосредственно антителам, была выполнена проверка ряда общепринятых жестких критериев. Гель-фильтрация IgG в условиях pH шока не привела к снижению изучаемой активности, а пики профиля активности фракций соответствовали пикам оптической плотности интактных IgG. Итогом работы было выявление в препаратах IgG больных шизофренией ДНК-гидролизующей, протеолитической (к ОБМ, коллагену и частично – альбумину) и оксидоредуктазной (каталазной, пероксидазной и супероксиддисмутазной) каталитической активности. Выявленные активности больных в несколько раз превосходили соответствующую активность у здоровых лиц. Вместе с тем, у больных шизофренией полностью отсутствовала амилолитическая и АТФ-гидролизующая активность IgG даже при концентрации антител 0,4 мг/мл. На основании изучения кинетических параметров ряда исследованных активностей у IgG выявлено более высокое сродство к субстрату, чем у классических ферментов. Механизмы реализации каталитических свойств и патогенетическое значение впервые выявленных активностей нуждаются в дальнейшем исследовании. *Работа поддержана грантом РНФ № 17-75-20050.*

ФИТАСПАЗЫ: АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОТЕАЗЫ РАСТЕНИЙ С СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ КАСПАЗ

Н.В. Чичкова, Р.А. Галиуллина, Р.Е. Белошистов, С.В. Трусова, А.Б. Вартапетян
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Фитаспазы представляют собой субтилизин-подобные протеазы растений, обладающие субстратной специфичностью апоптотических протеаз животных – каспаз. Как и каспазы, фитаспазы узнают в белках-мишенях последовательность из нескольких аминокислотных остатков и вносят одиночные разрывы строго после остатка аспарагиновой кислоты [1]. Так же, как и каспазы, фитаспазы участвуют в осуществлении программированной клеточной смерти [2]. По своей структуре, однако, фитаспазы растений принципиально отличаются от каспаз животных, и это структурное отличие определяет совершенно другой тип функционирования фитаспаз. Фитаспазы синтезируются в виде неактивных белков-предшественников, которые автокаталитически и конститутивно активируются. Поэтому активные фитаспазы постоянно присутствуют в тканях растений, при этом активный фермент секретируется в межклеточное пространство. Однако при индукции программированной клеточной смерти фитаспазы транспортируются обратно в клетку и получают доступ к цитоплазматическим белкам [3]. Будут представлены данные о белках, фрагментируемых фитаспазами, и показано, что гидролиз фитаспазами может приводить как к инактивации, так и к активации белков-мишеней [4]. Будет рассмотрен биологический смысл фрагментации фитаспазами белков растений и чужеродных белков.

Литература

1. Galiullina RA, Kasperkiewicz P, Chichkova NV, Szalek A, Serebryakova MV, Poreba M, Drag M, and Vartapetian AB (2015) Substrate specificity and possible heterologous targets of phytaspase, a plant cell death protease. J. Biol. Chem. 290, 24806-24815.
2. Chichkova NV, Shaw J, Galiullina RA, Drury GE, Tuzhikov AI, Kim SH, Kalkum M, Hong TB, Gorshkova EN, Torrance L, Vartapetian AB, Taliansky M (2010) Phytaspase, a relocalisable cell death promoting plant protease with caspase specificity. EMBO J. 29, 1149-1161.
3. Vartapetian AB, Tuzhikov AI, Chichkova NV, Taliansky M, Wolpert TJ (2011) A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. Cell Death Differ.18, 1289-1297.
4. Beloshistov RE, Dreizler K, Galiullina RA, Tuzhikov AI, Serebryakova MV, Reichardt S, Shaw J, Taliansky ME, Pfannstiel J, Chichkova NV, Stintzi A, Schaller A and Vartapetian AB (2017) Phytaspase-mediated precursor processing and maturation of the wound hormone systemin. New Phytol. doi: 10.1111/nph.14568.

ЦИСТЕИНОВЫЕ ПЕПТИДАЗЫ СЕМЕЙСТВА C1: ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ У НАСЕКОМЫХ

Е.Н. Элпидина[1], И.Ю. Филиппова[2], А.Г. Мартынов[3], Б. Опперт[4], Е.А. Воротникова[1], В.Ф. Терещенкова[2], Я.Е. Дунаевский[1], М.А. Белозерский[1]

[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и [2]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Московская область; [4]Центр исследований зерна и ветеринарии Службы с/х исследований Министерства сельского хозяйства США, Манхэттэн, Канзас, США

Вездесущие цистеиновые пептидазы семейства C1 (папаина) являются важнейшими компонентами деградома. У животных эти ферменты носят название цистеиновых катепсинов (CC) и являются главными компонентами лизосом, а также участвуют во внеклеточном протеолизе. У некоторых групп животных, включая отдельные семейства насекомых, CC выполняют специфическую пищеварительную функцию. Мы провели аннотацию и анализ CC в геномах 21 вида насекомых из 8 отрядов и 17 семейств и показали, что количество генов CC варьирует от 5 до 50, а у человека известно лишь 11 генов CC. Сравнительный анализ структур CC показал, что у насекомых есть как консервативные, так и видоспецифичные CC, за счет которых и растет общее число CC. Среди консервативных выявлены гомологи катепсинов B, F, L и O млекопитающих, а также новые виды CC, относящиеся к L-типу и названные катепсинами I, Ll и La. Оказалось, что пищеварительные CC, выявленные биохимическими методами, относятся к видоспецифичным группам. Общее число генов CC у насекомых, у которых выявлены пищеварительные CC, высокое, однако не у всех насекомых со значительным количеством CC есть пищеварительные CC. Для того, чтобы составить представление о функциях CC у насекомых, мы провели анализ экспрессии генов CC на разных стадиях развития жука *Tribolium castaneum*: яйцо, личинка, куколка и имаго. Насекомое питается только на стадии личинки и имаго, и главными пищеварительными пептидазами этого насекомого являются CC. Оказалось, что 12 из 25 генов CC экспрессируются практически только на стадиях личинки и имаго, и два выделенных из кишечника личинок и идентифицированных масс-спектрометрически пищеварительных CC входят в состав этой группы и являются наиболее высокоэкспрессируемыми среди всех CC насекомого. Вторую группу генов составили 6 CC, конститутивно экспрессирующиеся на всех стадиях. Два гена из этой группы демонстрировали повышенный уровень экспрессии у куколок, и они предположительно участвуют в процессах метаморфоза. В эту группу входят также консервативные катепсины, предположительно относящиеся к лизосомальным CC. Последняя группа представлена в основном низкоэкспрессируемыми генами, среди которых могут быть CC со специфическими регуляторными функциями. *Работа поддержана грантами РФФИ №15-04-08689-а и №17-34-80158 мол_эв_а.*

ПРОЛАМИНРАСЩЕПЛЯЮЩИЕ ПЕПТИДАЗЫ. ДИЗАЙН И СИНТЕЗ ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ ДЛЯ ИХ ПОИСКА И ИЗУЧЕНИЯ

И.Ю. Филиппова[1], Е.Н. Элпидина[2], Н.И. Соколенко[3], В.Ф. Терещенкова[1], Е.А. Воротникова[2], Т.Р. Симонян[1], Я.Е. Дунаевский[2], М.А. Белозерский[2]

[1]Химический факультет и [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, Россия

Серьезной проблемой, не решенной до настоящего времени, является гидролиз проламинов (ПА) – белков злаковых, составляющих основу рациона значительной части населения. ПА характеризуются высоким содержанием Pro и Gln (35 % и 50 % соответственно). Большинство известных ферментов, включая пищеварительные пептидазы человека, не способны деградировать ПА полностью. Вследствие этого гидролиз ПА «останавливается» на стадии образования крупных олигопептидов, которые обладают иммуногенными свойствами и являются причиной возникновения различных патологий, включая целиакию. Эффективным решением этой проблемы может быть использование проламинрасщепляющих пептидаз (ПАРП). ПАРП могут быть использованы также при обработке пищевого сырья для получения безглютеновых продуктов питания. Исходя из структуры ПА, такими ферментами могут являться глутамил- и пролилрасщепляющие пептидазы (ГРП и ПРП соответственно). Однако поиск ГРП и ПРП весьма затруднен. Ключевой проблемой является отсутствие надежных и чувствительных соединений, пригодных для скрининга и обнаружения ПАРП. Нами проведен дизайн и осуществлен синтез высокоселективных хромогенных п-нитроанилидных (pNA) и флуорогенных 4-амино-7-метилкумаридных (AMC) ди- и трипептидных субстратов целого ряда ГРП и ПРП, а также FRET -субстратов общей формулы Abz-Ala-Pro-X-pNA, где X = Ala, Leu, Phe и ингибиторов ПРП – производных Pro, Phe и Ile с С-концевыми остатками циклических аминов – пирролидина, пиперидина, морфолина и N-метилпиперазина. Показано, что наличие набора селективных ди- и трипептидных субстратов и ингибиторов позволяет обнаружить среди большого массива различных пептидаз ферменты с искомой специфичностью. Это так называемые «пептидные инструменты» первой линии поиска. Для более детального изучения способности выявленных ГРП и ПРП расщеплять ПА требуются более протяженные пептиды. Это было показано нами на примере эффективного использования окта- и декапептидов и их флуорогенных аналогов – FRET-пептидов, являющихся фрагментами иммуногенных эпитопов α5- и γ2-глиадинов, Abz-QPQQPFPQ-EDDnp, Abz-LPYPQPQLPQ-EDDnp (Abz - о-аминобензоил; EDDnp - остаток N-(2,4-динитрофенил)этилендиамина). *Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ: 15-03-06675-а, 15-04-08689-а, 16-34-01012 мол-а, 17-34-80158 мол-эв-а*.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ДЕТОКСИФИКАЦИЯ МИКОТОКСИНОВ: ИЗВЕСТНЫЕ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ РЕШЕНИЯ

Е.Н. Ефременко, И.В. Лягин, Т.А. Махлис, О.В. Маслова, О.В. Сенько, Н.А. Степанов

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

Пищевая безопасность представляется приоритетом не только в России, но и во всём мире. По оценкам ВОЗ 2015 года, 600 млн человек ежегодно заболевают после употребления загрязнённых пищевых продуктов, и 420 тыс. человек умирают в результате этого. Одним из основных путей биогенного поражения сельхозпродукции является контаминация микроорганизмами и, в том числе, микроскопическими грибами. В ходе эволюции многие из них выработали механизмы внутри- и межвидовой борьбы, включая секрецию в окружающую среду «химического оружия» – микотоксинов. С точки зрения пищевой безопасности именно этот фактор приводит к колоссальным убыткам как в сельском хозяйстве, так и пищевой промышленности. Причём микотоксины являются фактором риска не только для человека, но и для животных. В настоящее время ведутся активные исследования по разработке методов предотвращения такой контаминации, а также детоксикации

загрязнённой продукции и/или уменьшения негативных эффектов от контаминантов (в животноводстве). Физические, химические и биологические способы деконтаминации обладают своими плюсами и минусами. Физические и химические методы сейчас разрешены к крайне ограниченному применению, а биохимические (ферментативная детоксификация микотоксинов) представляются наиболее перспективными, так как совмещают в себе положительные стороны химической и биологической деконтаминации: селективность/специфичность (детоксификация одного или нескольких микотоксинов, обычно не затрагивая сырьё), эффективность (вплоть до полной детоксификации), мягкие условия (нейтральное или близкое к ним pH, умеренная температура и давление, и т.д.), отсутствие привносимой токсичности, относительно лёгкий контроль процесса, и др. В рамках данной работы проведён анализ известных в настоящее время ферментов, детоксифицирующих различные микотоксины, и механизмов их действия. Воздействие практически любого микотоксина (или их группы) может быть нейтрализовано под действием одного или нескольких ферментов. В последнем случае действие может затрагивать разные функциональные группы, присутствующие в микотоксинах. Хотя создание универсального фермента не представляется возможным, целесообразным можно считать комбинирование разных ферментов в одном препарате.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант №16-14-00061).

ФЕРМЕНТ CYP74M2 – ПЕРВАЯ РАСТИТЕЛЬНАЯ ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗА

Е.О. Смирнова, С.С. Горина, Б.И. Хайрутдинов, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин
Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия

Липоксигеназный каскад растений является источником биологически активных веществ – оксилипинов. Данная группа соединений участвует в процессах роста и развития растений, выполняет защитные и сигнальные функции. Образование оксилипинов контролируется двумя классами ферментов – липоксигеназами и неклассическими цитохромами P450 семейства CYP74. В данное семейство входят алленоксидсинтазы (AOC), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС). Обнаружение CYP74 у животных, протеобактерий, бурых и зеленых водорослей позволило ввести понятие клана CYP74, объединив семейство CYP74 и ферменты других семейств, имеющие сходные с CYP74 структурные и механистические особенности и локализованные вместе на филогенетическом древе P450. В состав клана включены также ферменты четвертого типа – эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС): BfEAS ланцетника и EsEAS бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus*. В геноме плаунка *Selaginella moellendorffii* Hieron были аннотированы десять генов CYP74, которые относятся к четырем новым подсемействам CYP74 (J, K, L и M). Ферменты CYP74M1 и CYP74M3 были охарактеризованы ранее в нашей лаборатории, как 13-специфичные дивинилэфирсинтазы. Объектом данной работы является фермент CYP74M2. Этот фермент преобразует 13(S)-гидроперекиси линолевой (13-ГПОД) и альфа-линоленовой кислот (13-ГПОТ) в соответствующие эпоксиспирты. Продукты анализировали методами ГХ-МС, ВЭЖХ, ЯМР и УФ-спектроскопии. Таким образом, фермент CYP74M2 является первой растительной ЭАС. Этот фермент обладает высокой гомологией с членами семейства CYP74 и является первой ЭАС, однозначно относящейся к семейству CYP74.

Работа по клонированию гена CYP74M2 была поддержана грантом РФФИ 15-04-08310-а. Работы по получению и очистке фермента CYP74M2 были поддержаны грантом РФФИ 15-04-04108-а. Эксперименты по предварительной характеристике продуктов реакций были поддержаны грантом РФФИ 16-34-60231-мол_а_дк. Исследования детальной структуры продуктов реакций проводились при финансовой поддержке РНФ (проект № 16-14-10286).

ИНДУЦИРОВАННОЕ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕГО РЕГУЛЯЦИИ С ПОМОЩЬЮ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

И.И. Власова[1], Е.В. Михальчик[1], В.А. Костевич[1,2], М.В. Васильцова[1], В.А. Мацкевич[1], А.А.Гусев[1], А.В. Соколов[1,2,3]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва; [2]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; [3]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Ключевой функцией миелопероксидазы (МПО) нейтрофилов является синтез хлорноватистой кислоты (HOCl) - сильного окислителя, необходимого для борьбы с инфекцией в очагах воспаления. В то же время, попадая в кровь, активный фермент может повреждать биологически важные молекулы и клетки. Важной задачей является поиск соединений, которые могут ингибировать негативные эффекты МПО в плазме и в здоровых тканях, не влияя на ее активность (или усиливая) в очаге воспаления. Мы изучали возможность регуляции МПО-индуцированного окисления белков плазмы с помощью фенольных соединений (ФС) - фенола, эпикатехина, этопозида и тирозина, которые являются субстратами пероксидазного цикла МПО. Окисление основных белков плазмы – альбумина, IgG и церулоплазмина было изучено с помощью измерений белковой (триптофановой) флуоресценции и содержания SH-групп, а также с использованием SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга. Результаты показали, что влияние ФС на МПО-катализируемое окисление белков зависит от размера молекулы вещества, редокс-потенциала его феноксильных радикалов, а также от способности радикалов рекомбинировать с образованием дифенолов. Кроме того, концентрация H_2O_2 – субстрата МПО, переводящего фермент в активную форму, – также определяет влияние ФС на активность фермента. Фенол, который является представителем наиболее токсичных ФС, усиливал окисление белков благодаря высокой реакционной способности его феноксильных радикалов. Антиоксидант эпикатехин ингибировал повреждение белков, вызванное МПО, однако его действие наблюдалось не только в плазме, но и в условиях, моделирующих очаг воспаления. Лекарственный препарат этопозид характеризуется большим размером молекулы, поэтому активный центр МПО для него оказался плохо доступен. Наиболее интересные результаты получились с тирозином – аминокислотой, которая присутствует в плазме в свободной форме и входит в состав белков. Тирозин может влиять на МПО-зависимое окисление белков за счет модуляции синтеза HOCl: при высоких концентрациях H_2O_2 (>100 μM, как в очагах воспаления) тирозин ускорял окисление белков, тогда как при низких (как в плазме) – ингибировал. В отличие от действия антиоксидантов эффекты тирозина высокоспецифичны и касаются только регулирования активности МПО.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-0400873.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ

В.И. Тишков[1,2,3], Д.Л. Атрошенко[1,3], С.А. Зарубина[1,3], В.В. Федорчук[1], С.С. Савин[1,3]
[1]Кафедра химической энзимологии, Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; [3]ООО «Инновации и высокие технологии» МГУ, Москва, Россия

Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3, DAAO) участвует в регуляции нервной деятельности и других процессов. Например, снижение в спинномозговой жидкости концентрации D-Ser за счет повышенной активности DAAO является одной из причин возникновения шизофрении. В случае ряда нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) (Альцгеймера, Паркинсона и др.) также наблюдается повышение уровня D-Ala. Поэтому разработка экспресс-методов определения D-аминокислот для диагностики НДЗ является актуальной проблемой медицинской диагностики, однако широкая субстратная специфичность природных DAAO не позволяет создать селективные сенсоры. Ряд оксидаз D-аминокислот используется на практике в тонком органическом синтезе. Особо следует выделить фермент из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO), который используется в крупнотоннажном биферментном биокаталитическом процессе получения из цефалоспорина С 7-аминопенициллановой кислоты. Впервые TvDAAO была описана еще в 1994 году, однако кристаллы этого фермента так и не были получены, что не позволяло использовать метод рационального дизайна.

В нашей лаборатории был клонирован ген TvDAAO и создана высокоэффективная система его экспрессии в клетках *E. coli*. Нами были проведены систематические исследования взаимосвязи структура-функция. Было показано, что при разных концентрациях его олигомерное состояние меняется от неактивного мономера до олигомеров более высокого порядка. На основании построенной модели 3D-структуры был получен ряд мутантов, один из которых удалось закристаллизовать. Используя полученную структуру, был проведен докинг субстратов в активный центр. Были выбраны наиболее перспективные положения для введения замен и проведено компьютерное моделирование возможных мутантов. После отбора наиболее перспективных вариантов были получены мутантные TvDAAO, у которых была повышена стабильность, каталитическая активность с цефалоспорином *C* или с узким спектром субстратной специфичности (например, активный с D-Ser и неактивный с D-Ala и наоборот). Точечные замены были объединены в многоточечные (до 4 замен) мутанты, которые аддитивно объединили положительные эффекты предшественников. Обсуждается роль отдельных замен на свойства фермента. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 16-14-00043.*

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОХРОМОВ Р450, УЧАСТВУЮЩИХ В БИОСИНТЕЗЕ И МЕТАБОЛИЗМЕ АУТОКРИННЫХ И ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ

А.А. Гилеп[1], Т.В. Шкель[1], С.А. Усанов[1], С.В. Смольская[1], Т.А. Сушко[2], А.М. Тумилович[1], А.В. Свирид[1], А.В. Василевская[1], М. Шевцов[3], В.И. Борщевский[3], П.В. Ершов[4], А.С. Иванов[4], Н.В. Струшкевич[1]
[1]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; [2]Отдел биоинженерии, Университет Токио, Япония; [3]Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Москва; [4]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Цитохромы Р450 – мембранно-связанные ферменты, участвующие в биосинтезе биоактивных молекул и метаболизме лекарств и других ксенобиотиков в организме человека. Кроме этого, данная группа гемопротеинов выполняет важную функцию в регуляции внутриклеточных процессов ряда патогенных микроорганизмов. В связи с этим цитохромы Р450 относятся к одной из приоритетных групп мишеней действия лекарств в лечении кардио-метаболических, онкологических и инфекционных заболеваний. Наши научные исследования направлены на понимание механизмов узнавания субстратов, их связывания с активным центром и последующим катализом цитохромами Р450, участвующими в метаболизме производных стероидов и эйкозаноидов. Мы идентифицировали альтернативный путь биосинтеза стероидных гормонов на основе производных 7-дегидрохолестерина (предшественников секостероидов) [1–2]. Мы обнаружили, что патогенные микобактерии участвуют в метаболизме иммуноактивных липидов и таким образом предположительно могут влиять на локальный иммунный ответ [3]. С использованием интерактомных подходов нами было показано существование сложных белковых комплексов, участвующих в биосинтезе метастабильных аутокринных и паракринных факторов.

Литература

1. Gilep A.A., T.A. Sushko, S.A. Usanov, At the crossroads of steroid hormone biosynthesis: the role, substrate specificity and evolutionary development of CYP17, Biochim Biophys Acta., 1814 (2011) 200-209.
2. Guryev O, Carvalho RA, Usanov S, Gilep A, Estabrook RW A pathway for the metabolism of vitamin D3: unique hydroxylated metabolites formed during catalysis with cytochrome P450scc (CYP11A1). Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(25):14754-14759.
3. Vasilevskaya A.V., A.V. Yantsevich, G.V. Sergeev, A.P. Lemish, S.A. Usanov, A.A. Gilep, Identification of Mycobacterium tuberculosis enzyme involved in vitamin D and 7-dehydrocholesterol metabolism, J Steroid Biochem Mol Biol. 2017, 169:202-209.

ПЕРВЫЕ ФЕРМЕНТЫ КЛАНА CYP74 У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МОРСКИХ ЖИВОТНЫХ *NEMATOSTELLA VECTENSIS* И *TRICHOPLAX ADHAERENS*

Е.К. Бессолицына, С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин
Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, Россия

Ферменты уникального семейства CYP74 цитохромов Р450, принадлежащие липоксигеназной сигнальной системе, широко распространены у наземных растений. Ферменты CYP74, включающие алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС), превращают гидроперекиси жирных кислот в разнообразные оксилипины. Обнаружение CYP74 у животных, протеобактерий, бурых и зеленых водорослей позволило ввести понятие клана CYP74, объединив семейство CYP74 и ферменты других семейств, имеющие сходные с CYP74 структурные и механистические особенности и локализованные вместе на филогенетическом древе Р450. Так, были выявлены ферменты клана CYP74 у *Methylobacterium nodulans* (ГПЛ), *Acropora palmata* (АОС), *Ectocarpus siliculosus* (ЭАС) и *Branchiostoma floridae* (ЭАС). Секвенирование геномов *Nematostella vectensis* и *Trichoplax adhaerens* выявило у них предполагаемые гены клана CYP74. Гены NvCYP74 и TaCYP74 были клонированы; соответствующие белки охарактеризованы. Полученный фермент *N. vectensis* представляет собой ЭАС. Продукт каталитического действия фермента NvEAS по стереохимии подобен таковому ЭАС другого представителя животного мира – ланцетника. Однако NvEAS проявляет предпочтение к 9-гидроперекиси линолевой кислоты в качестве субстрата, тогда как BfEAS – к 13-гидроперекиси. Полученный фермент *T. adhaerens* является ферментом, проявляющим три типа каталитической активности – АОС, ГПЛ и ЭАС. Таким образом,

АОС активность обнаружена у представителей двух типов царства животных – тип Стрекающие (*A. palmata*) и тип Пластинчатые (*T. adhaerens*), тогда как ГПЛ активность обнаружена у фермента – представителя животных впервые.

Эксперименты по получению и первичной характеристике ферментов NvEAS и TaCYP74 поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (грант 16-34-60231-мол_а_дк); эксперименты по детальному изучению структуры продуктов и механизмов каталитического действия ферментов NvEAS и TaCYP74 были поддержаны Российским научным фондом (грант 16-14-10286).

СТРУКТУРНЫЕ АНАЛОГИ ЛАНОСТЕРОЛА ИЗ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ КЛАССА *ASTEROIDEA* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЛАНОСТЕРОЛ-14-α-ДЕМЕТИЛАЗ ЧЕЛОВЕКА И *CANDIDA ALBICANS*

Л.А. Калужский[1], Т.В. Шкель[2], Н.В.Иванчина[3], А.А.Кича[3], И.П.Грабовец[2], А.А. Гилеп[2], Н.В. Струшкевич[2], М.А. Черновецкий[4], А.Е. Медведев[1], С.А. Усанов[2], А.С. Иванов[1]

[1]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия; [2]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; [3]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия; [4]Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минский р-н, Беларусь.

Ланостерол-14α-деметилазы (гемопротеины семейства цитохромов Р450(51), CYP51) участвуют в биосинтезе различных мембранных стероидов, включая холестерин животных и эргостерол грибов. CYP51 человека представляет собой перспективную мишень для создания новых препаратов для лечения атеросклероза, ингибирующих одну из конечных стадий синтеза эндогенного холестерина. Представители семейства CYP51 также являются мишенями для фармакологических агентов, блокирующих синтез эндогенных стероидов, необходимых для формирования мембранных структур патогенных микроорганизмов. Хотя ингибиторы CYP51 класса азолов применяются для лечения микозов, они обладают широким спектром действия на различные ферменты семейства цитохромов Р450, что приводит к множественным побочным эффектам. В то же время, многие патогены рода *Candida*, вызывающие микозы, обладают азол-резистентностью. Поэтому CYP51 данных грибов является перспективной мишенью для создания новых селективных противогрибковых препаратов, которые были бы эффективны против азол-резистентных грибковых инфекций.

В данной работе, мы провели поиск потенциальных ингибиторов CYP51 человека и азол-резистентного штамма *Candida albicans*. Для этого был использован метод поверхностного-плазмонного резонанса и выборка структурных аналогов ланостерола, выделенных из морских организмов класса *Asteroidea*. В результате обнаружено 8 соединений, взаимодействующих с целевыми белками. Методом спектрального титрования было показано, что 7 из них взаимодействуют с активными центрами CYP51. Среди этих соединений одно (левискулозид G из *Henricia derjugini*) селективно взаимодействовало с активным центром CYP51 человека, а четыре (нонаол и торнастерозид A из *Archaster typicus*, октаол из *Patiria pectinifera* и дистоластерозид D_1 из *Distolasterias nipon*) – с CYP51 *Candida albicans*. Биохимическим анализом было показано, что два соединения (левискулозид G и дистоластерозид D_1) действительно ингибируют активность CYP51 человека. *Работа была выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы и государственной программы Беларуси «Наукоемкие технологии и техника» на 2016-2020 годы.*

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСПРЕССИИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ НА СТРУКТУРУ И СВОЙСТВА ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ

С.И. Бахолдина, В.А. Хоменко, Е.В. Сидорин, А.М. Стенкова, Е.П. Быстрицкая, М.П. Исаева, А.В. Реунов, Т.Ф. Соловьева

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

Экспрессия рекомбинантного белка в *E. coli* часто приводит к образованию белковых агрегатов в виде телец включения (ТВ). Относительно недавно было установлено, что структура ТВ, помимо природы образующего их белка, определяется комбинацией параметров процесса экспрессии, манипулируя которыми, для ряда растворимых белков удалось получить функционально и биологически активные ТВ. Процесс выделения рекомбинантного белка из таких ТВ становится быстрым и экономически выгодным для биотехнологического производства. Кроме того, они могут быть использованы как биокатализаторы, вакцинные и диагностические препараты, каркасы в тканевой инженерии, а также для доставки в клетку терапевтических полипептидов. Проводимое нами исследование ставит целью разработку подходов для получения в *E. coli* интегральных мембранных белков в виде биологически активных ТВ. В качестве модельных белков данного структурного класса мы использовали белки из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*: порин OmpF и фосфолипазу A1 (PldA). Эти белки могут рассматриваться в качестве кандидатов для получения рекомбинантных вакцин, диагностических препаратов и липолитических ферментов. В работе были использованы современные генно-инженерные, биохимические и биофизические методы, включая гель-фильтрацию, динамическое светорассеяние, оптическую спектроскопию, электронную микроскопию. Для получения рекомбинантных белков в виде ТВ были сконструированы плазмиды, которые были экспрессированы в штамме *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Были отработаны методы выделения и очистки ТВ и изучено влияние времени и концентрации индуктора при температуре 37°C на уровень экспрессии этих белков, а также на физико-химические и структурные характеристики ТВ. Для ТВ были определены размер, форма, стабильность (растворимость в мочевине и детергентах, устойчивость к протеолизу), конформация рекомбинантного белка, наличие доступных гидрофобных кластеров, присутствие амилоидных структур. В результате было показано различие между порином и фосфолипазой в агрегационном поведении и свойствах их ТВ. Были получены ТВ, растворимые в слабо денатурирующих условиях, что позволило увеличить выход функционально активных рекомбинантных белков. Определены направления дальнейших исследований с целью получения биологически активных ТВ. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 16-08-00679).*

ПРОТЕАЛИЗИНПОДОБНЫЕ ПРОТЕАЗЫ КАК ИНСТРУМЕНТ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВЫЖИВАНИЯ

И.В. Демидюк, К.Н. Чухонцева, С.В. Костров

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Протеализинподобные протеазы (ППП) – группа пептидаз семейства М4, представители которой широко распространены у бактерий. Биологические функции ППП изучены мало. В то же время опубликованные нами и другими авторами данные указывают на то, что ферменты группы вовлечены во взаимодействие бактерий с высшими организмами и в патогенез. Так, ППП, по-видимому, участвуют в бактериальной инвазии клеток млекопитающих, способны подавлять антибактериаль-

ную защиту насекомых, а также являются факторами, существенными для разрушения бактериями растительных тканей. В ходе исследования прототипа группы – протеализина нами получены новые данные о функционировании ППП. Анализ бактериальных геномов показал, что гены ППП входят в состав оперона, который, кроме протеазы, кодирует небольшой консервативный белок с неизвестной функцией. Исследования этого белка продемонстрировали, что он является эффективным ингибитором ППП и, по-видимому, имеет внутриклеточную локализацию. Поскольку ППП, как ранее было показано на модели протеализина, накапливаются в клетках в виде неактивного предшественника, а активируются только после выхода из клетки, можно предположить, что действие ингибитора направлено на подавление активности ППП, попадающих в бактериальную клетку извне. Тандем протеаза-ингибитор напоминает пары токсин-иммунный белок, характерные для систем, играющих важную роль в межбактериальной конкуренции, таких как, например, система секреции типа VI или система контактного ингибирования роста, что приводит к гипотезе об участии ППП не только во взаимодействии бактерий с высшими организмами, но и в конкурентной борьбе бактерий. Таким образом, ППП, вероятно, являются инструментами, которые бактерии используют для выживания в разных экологических нишах. *Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-01048*.

ТКАНЕВЫЕ КОЛЛАГЕНАЗЫ (ММП-1,-14) И ЖЕЛАТИНАЗЫ (ММП-2,-9) И ИХ ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ В ТЕЛЕ МАТКИ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ

Н.И. Соловьева[1,2], О.С. Тимошенко[1], Т.А. Гуреева[1], Л.Э. Завалишина[2], Е.В. Кугаевская[1]
[1]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; [2]Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Тканевые коллагеназы и желатиназы относятся к матриксным металлопротеиназам (ММП), которые играют ключевую роль в развитии онкологических процессов. Тканевые коллагеназы (ММП-1 и ММП-14) запускают гидролиз фибриллярных коллагенов и отвечают за развитие инвазивного процесса, а желатиназы (ММП-2 и ММП-9) гидролизуют коллаген базальных мембран и способствуют развитию метастазирования. Цель исследования - выяснить влияет ли плоскоклеточная карцинома шейки матки (ПКШМ) на инвазивный и метастатический потенциал всего тела матки, где нет морфологических изменений в тканях, которые отличаются по строению от тканей шейки матки. Задачи работы: выяснение особенностей экспрессии в теле матки тканевых коллагеназ - ММП-1,ММП-14 и желатиназ ММП-2 и ММП-9, их тканевых ингибиторов - ТИМП-1 и ТИМП-2 и активаторов – активатора плазминогена (уАП) для про-ММП-1 и про-ММП-9, и фурина для про-ММП-14, а также индуктора экспрессии ММП - CD147 (EMMPRIN). Работа проведена с использованием ПЦР, зимографии, иммуногистохимического (ИГХ), иммуноферментативного и энзиматического методов. Установлено: 1) Высокая экспрессия ММП-1, ММП-14, ММП-2 и ММП-9 наблюдалась как в опухолевой, так и в нормальной ткани от стенки влагалища до дна полости матки. Экспрессия ММП-2 изменялась незначительно, экспрессия ММП-1, ММП-9 существенно снижалась, а ММП-14 в ряде случаев увеличивалась в этом направлении. 2) Экспрессия тканевых ингибиторов ММП – ТИМП-1 и ТИМП-2 находилась на низком уровне или отсутствовала (по данным ИГХ). 3) Экспрессия фурина в опухоли была чаще всего увеличена, а в случае уАП находилась на высоком уровне как в опухолевой, так и в нормальной ткани. 4) Высокая экспрессия CD147 наблюдалась в опухолевой ткани. Следовательно, экспрессия как тканевых коллагеназ и желатиназ, так и их эндогенных регуляторов при ПКШМ направлена на увеличение деструктивного потенциала опухоли, их экспрессия происходит не только в опухоли, но и на протяжении всего морфологически нормального тела матки, что может вызывать деструктивный процесс в нормальных тканях. Данные важны для понимания механизма развития деструктивного процесса, имеют прогностическое значение, и предполагают участие в процессе экспрессии ММП сигналинга по типу эпителиально-мезенхимального взаимодействия.

АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ: СВЯЗЬ С НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИЕЙ ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА И ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИЕЙ

И.В. Кондакова[1], Г.В. Какурина[1], Н.В. Юнусова[1,2], Е.Е. Шашова[1], Е.С.Колегова[1,2]
[1]Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск; [2]Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

В процессе неопластической трансформации эпителиальные клетки становятся подвижными, что служит одним из основных механизмов опухолевой прогрессии. Клеточная подвижность регулируется актин-связывающими белками, осуществляющими ассоциацию/диссоциацию актиновых филаментов между собой и с клеточной мембраной. В представленной работе изучали содержание актин-связывающих белков: CAP1, arp3, гельзолина, кофилина-1, тимозина-β4 в тканях злокачественных опухолей в зависимости от метастазирования и инвазивного роста. Кроме того, на модели рака гортани, развивающегося из дисплазии, которая в тяжелой степени рассматривается как облигатный предрак, изучали вовлеченность некоторых актин-связывающих белков в процесс канцерогенеза. Содержание гельзолина и arp3 оценивали методом проточной цитофлуориметрии, тимозина и кофилина – методом Вестерн блоттинг, содержание CAP1 – иммуноферментным методом. У больных с диспластическими изменениями эпителия гортани содержание CAP1 в сыворотке крови снижалось по сравнению с группой больных раком гортани с 1 стадией заболевания. Развитие лимфогенных метастазов приводило к повышению содержания CAP1 в 6 раз ($p \leq 0{,}01$) по отношению к группе больных без метастазов. Содержание актин-связывающих белков (Arp3, гельзолина и кофилина-1) было выше в перитонеальных метастазах рака яичников по сравнению с первичной опухолью. В ткани рака молочной железы также зарегистрировано повышение содержания кофилина и тимозина-бета4 в метастазах по сравнению с тканью первичной опухоли молочной железы. Также при раке молочной железы обнаружено повышение уровня кофилина и снижение уровня гельзолина в ткани опухоли при появлении лимфогенных метастазов. Показана взаимосвязь содержания белков, участвующих в ремоделировании актинового цитоскелета с глубиной инвазии рака эндометрия в миометрий. Таким образом, результаты свидетельствуют о вовлечении CAP1 в канцерогенез злокачественных опухолей и позволяют сделать фундаментальные выводы о важном вкладе актин-связывающих белков в инвазию и метастазирование опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-04-00198).

РОЛЬ СОЛЕВЫХ МОСТОВ В ЭФФЕКТИВНОСТИ, СПЕЦИФИЧНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОЛИГОПЕПТИДАЗ В

А.Г. Михайлова[1], Т.В. Ракитина[1,2], Д.М. Карлинский[1], В.И. Тимофеев[2,3], Д.А. Корженевский[2], Ю.К. Агапова[2], А.В. Власкина[2], М.В. Овчинникова[1,4], В.А. Горленко[4]

[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]НИЦ "Курчатовский институт; [3]ФНИЦ "Кристаллография и фотоника РАН"; [4]Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия

Олигопептидаза B (OpdB) – это трипсиноподобная сериновая пептидаза, принадлежащая к семейству пролил-олигопептидаз. OpdB присутствуют в одноклеточных эукариотах: трипаносомах и лейшманиях, являясь важными факторами вирулентности при трипаносомных инфекциях и лейшманиозах. Гены, кодирующие OpdB, обнаружены также в грамотрицательных бактериях. Объектом данного исследования является первая психрофильная OpdB (PSP), выделенная нами из грамм-отрицательного психротолерантного микроорганизма *Serratia proteamaculans*, клонированная и функционально охарактеризованная. Выполнено моделирование трехмерной структуры PSP на основании 3D-структур протозойных OpdB. Определены структурные факторы, регулирующие активность PSP, и, предположительно, OpdB других γ-протеобактерий. Обнаружена возможность непосредственной регуляции ферментативных свойств фермента. В данном исследовании подтверждена и уточнена роль междоменных и внутридоменных солевых мостов, определяющих ферментативную активность PSP. Получены мутантные варианты PSP с заменой заряженных остатков данных солевых мостов на незаряженные; проведено сравнение их активности и специфичности по отношению к ряду пептидных субстратов. Показано, что основную роль в поддержании активной формы фермента (создании активного центра) играют солевые мосты E96-R658 и E75-R658. Роль междоменных контактов, образованных отрицательно заряженными остатками E125 N-концевого β-пропеллерного домена и D649 C-концевого домена, более комплексная – эти остатки, как показали эксперименты с мутацией их на незаряженные, определяют не просто активность, а специфичность фермента. E125 и D649 в координации с K655 совместно участвуют в работе вторичного субстрат-связывающего центра, определяя как его специфичность, так и повышая на порядок его эффективность.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ: проекты № 14-50-00131 (в части моделирования и энзимологических исследований) и № 17-14-01256 (в части точечного мутаганеза, получения и характеристики рекомбинантных белков).

СКОРОСТЬ И ПРОЦЕССИВНОСТЬ ГИДРОЛИЗА ОЛИГОПЕПТИДОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТЕАСОМНЫХ КОМПЛЕКСОВ

А.В. Бачева[1], В.А. Крячков[1], В.Н. Ташлицкий[1], О.В. Коробкина[1], А.Г. Габибов[2]

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

АТФ-зависимая убиквитин-протеасомная система является основным путем деградации около 80% внутриклеточных белков. Существует несколько нейродегенеративных заболеваний, разделяющих общую важную особенность: они развиваются из-за накопления слаборастворимых агрегатов белков или фрагментов белков после частичного протеолиза. Одним из таких заболеваний является болезнь Хантингтона, в которой ключевой белок хантингтин (Htt) содержит в аминокислотной последовательности довольно протяженную область, состоящую только из аминокислотных остатков глутамина. Почему протеасома не может полностью гидролизовать мутантный хантингтин, до сих пор полностью не выяснено. Существуют литературные данные, описывающие изучение формирования агрегатов белка хантингтин с использованием флуоресцентной микроскопии, в которых было установлено, что такие компоненты убиквитин-протеасомной системы, как убиквитин, протеасомный комплекс 26S и регулятор 11S, колокализуются с нерастворимыми агрегатами хантингтина. Неясно, почему нет эффективной деградации хантингтина протеасомой; и возможно 11S протеасомный регулятор, влияющий на длину полученных пептидов, участвует в этом низкоэффективном процессе. Изучение деградации мутантного Htt в клетках нейронов сложно осуществить, потому что нейроны морфологически и функционально поляризованы, что означает, что расщепление мутантного Htt может различаться в разных клеточных компартментах. Поэтому на первых этапах необходимо изучить гидролиз нативного и мутантного хантингтина с помощью протеасомы in vitro. В нашей работе 20S, 26S протеасомные комплексы, а также 11S протеасомный регулятор были выделены из тканей лабораторных мышей, их субъединичный состав был охарактеризован. Затем было изучено влияние 11S регулятора на изменение активности 20S и 26S протеасом на флуоресцентных субстратах. Проведено исследование гидролиза пептидов, содержащих полиглутаминовые фрагменты, протеасомными комплексами 20S, 26S, 20S+11S, 26S+11S, получены кинетические характеристики этого процесса и определены сайты гидролиза. Показано, что регулятор 11S может ускорить гидролиз полиQ-содержащих пептидов протеасом.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 16-04-01446.

УЧАСТИЕ НЕКАТАЛИТИЧЕСКОЙ N-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ АТР-ЗАВИСИМЫХ LonA-ПРОТЕАЗ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ФЕРМЕНТОВ

Т.В. Ротанова, А.М. Куджаев, Е.С. Дубовцева, А.Г. Андрианова

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

Бифункциональные АТР-зависимые LonA-протеазы – ключевые участники системы контроля качества (СКК) клеточного протеома, функционирующей во всех доменах жизни и обеспечивающей наряду с корректным фолдингом клеточных белков быструю деградацию регуляторных, а также аномальных и поврежденных белков. LonA-протеазы относятся к суперсемейству AAA+-белков (АТР-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями) и осуществляют процессивный гидролиз белковых мишеней, сопряженный с гидролизом АТР. Субъединицы гомоолигомерных LonA-протеаз образованы пятью доменами: N─HI(CC)─NB─H─P, где два N-концевых домена (N и HI) образуют некаталитическую область фермента, включающую участок с coiled-coil(CC)-конформацией, два центральных домена (NB и H) формируют АТР-азный модуль, а С-концевой домен (P) является серин-лизиновой пептидгидролазой. Двухдоменная организация некаталитической N-концевой области и наличие протяженного CC-участка отличают LonA-протеазы от других протеаз СКК. Для выявления роли этой области в функционировании LonA-протеаз на примере фермента из *Escherichia coli* (Ec-Lon) был получен ряд модифицированных форм Ec-Lon с делециями в N-концевой области и проведено изучение их энзиматических свойств в

сравнении со свойствами интактной Ec-Lon-протеазы. Показано, что делеции в N-концевой области оказывают значительное влияние на функционирование АТР-азного и протеолитического центров Ec-Lon-протеазы. Установлено, что фрагмент последовательности фермента, объединяющий СС-участок и С-концевую часть HI-домена, важен для распознавания природы нуклеотидов, необходим для связывания и гидролиза белковых мишеней, а также участвует в передаче сигналов аллостерической регуляции между АТР-азным и протеолитическим центрами. Показана важность фрагмента, предшествующего СС-участку, для реализации процессивного механизма протеолиза и для поддержания конформационной стабильности Ec-Lon-протеазы. *Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 14-50-00131).*

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

ИНГИБИТОР Na,K-АТФазы МЕМБРАН НЕЙРОЦИТОВ: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

А.А. Байгильдина
Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Уфа, Россия

Актуальность проблемы изоляции, идентификации и характеристики эндогенных ингибиторов Na,K-АТФазы имеет теоретическое и практическое значение, поскольку ее решение открывает перспективы для успешного лечения заболеваний, связанных с нарушенной регуляцией активности этого фермента. Цель работы - общая характеристика ингибитора, выделенного нами из мозга крыс линии Wistar в возрасте 13-14 недель с массой тела 150-200 гр. сочетанием методов гель-хроматографии на сефадексе G-25 (Fine), ионообменной и восходящей хроматографии на бумаге, электрофореза на бумаге, ВЭЖХ на силикагеле и в колонке с обращенной фазой. Способность выделяемых фракций ингибировать фермент оценивали по методу Н.Р. Елаева. Молекулярную массу ингибитора определяли методом гель-хроматографии на колонке по методу Г. Детерман. Референсными веществами служили окситоцин, глутатион, карбонат натрия и глицин. Кинетические параметры ферментативной реакции оценивали общепринятыми методами. Для качественного исследования ингибитора применяли методы ИК- и ЯМР (^{13}C и ^{2}D)-спектроскопии. Результаты обработали методами непараметрической статистики. Установлено, что молекулярная масса ингибитора составляет около 190 Да, он растворим в воде и метаноле, в растворе приобретает положительный заряд, не теряет ингибиторную активность при 10-минутном кипячении. Кинетически это обратимый полный (константы взаимодействия α=13, β=1) высокоаффинный ($K_i=4{,}0\times10^{-7}$ М) конкурентный ($K_m=6\times10^{-4}$ М, $K_{m_i}=1{,}2\times10^{-3}$ М, Vmax=7,6 мкМ $Ф_н$/мг белка×час) ингибитор Na,K-АТФазы нейроцитов. По данным ИК-спектроскопии, в его состав входят одна NH_2- и одна СО- группы, по результатам спектроскопии ЯМР – содержит кольцо морфолина. Действие ингибитора на активность Na,K-АТФазы двухфазно: низкие концентрации (до $7{,}5\times10^{-8}$ М) активируют фермент, а более высокие - ингибируют. По этому свойству ингибитор из мозга подобен сердечным гликозидам (уабаину, строфантину), но принципиально отличается от них по химической структуре.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 2-S-ЦИАНОПИРРОЛИДИНОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОЛИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ С ДИПЕПТИДИЛПЕПТИДАЗОЙ IV

Н.Н. Золотов[1], Г.И. Макаров[2], В.Ф. Позднев[3]
[1]НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва; [2]Южно-Уральский государственный университет, Челябинск; [3]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Многие нейропептиды, участвующие в регуляторной функции, содержат большое количество остатков пролина. Уникальная конформация пролиновой связи защищает пептиды от ферментативной деградации. Таким образом, особый интерес представляют ферменты, расщепляющие пролильные связи в нейропептидах. Аномальные активности сериновых пептидаз сыворотки и плазмы — пролилэндопептидазы (EC 3.4.21.26., PEP) и дипептидилпептидазы IV (EC 3.4.14.5., CD26, DPP-4) наблюдались у пациентов с расстройствами настроения. PEP участвует в созревании и деградации некоторых нейропептидов и пептидных гормонов. Фермент связан с регуляцией кровяного давления, различными расстройствами центральной нервной системы, включая болезнь Альцгеймера, шизофрению и депрессию. DPP-4 является многофункциональным белком, участвующим во многих физиологических процессах. Фермент инактивирует гипогликемический инкретин. Ингибирование фермента восстанавливает гомеостаз глюкозы у пациентов с диабетом 2 типа, что делает его перспективной мишенью для разработки новых антидиабетических препаратов. PEP и DPP-4 расщепляют пептиды по карбоксильной группе остатков пролина и с гораздо более низкой скоростью у остатков аланина, что резко контрастирует со специфичностью других сериновых протеиназ. Изучена метаболическая трансформация N-ацильного производного ингибитора PEP аминоацил-2-цианопирролидина в ингибитор DPP-4. При изучении метаболизма этого соединения мы обнаружили снижение активности DPP-4 в начальный момент времени. Этот эффект был примерно в 100 раз слабее. Этот неожиданный эффект наблюдался для ингибиторов общей формулы X-Y-2-S-цианопирролидин, где X представляет собой защитную группу, и Y представляет собой любую аминокислоту, отличную от глицина. Для понимания феномена были проведены молекулярный докинг и молекулярно-динамическое моделирование комплексов ингибиторов с протеазами, выявившие возможность позиционирования ингибитора PEP в активном центре DPP-4 водородными связями и гидрофобными взаимодействиями, обеспечивающую взаимодействие нитрильной группы с остатком серина в активном центре DPP-4. Проведенное исследование должно способствовать пониманию процесса связывания ингибитора и имеет большое значение для конструирования новых фармакологически активных лигандов PEP и DPP-4.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАТЕПСИНА L ИЗ КИШЕЧНИКА ЖУКА-КОЖЕЕДА *DERMESTES MACULATUS* И ЕГО РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА

Е.Н. Калиберда, С.В. Пантелеев, Т.В. Бобик, Л.Д. Румш
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Катепсин L жука-кожееда *Dermestes maculatus* является ключевым ферментом системы пищеварения этого вредителя. Исследование этого фермента представляется перспективным в целях создания, в дальнейшем, селективных ингибиторов к нему, поскольку *D. maculatus* – опасный вредитель кожевенного сырья, мехов, мясных продуктов, музейных экспонатов и

коконов тутового шелкопряда. Выделен и охарактеризован нативный катепсин L из кишечника жука-кожееда *D. maculatus*. Полученная цистеинзависимая протеаза проявляла максимум активности при температуре 37–40°C, pH 4.5 и имела молекулярную массу 25 кДа. Она незначительно расщепляла азоколлаген и эффективно – природные пептиды: желатин и мелиттин. Определены кинетические параметры гидролиза катепсином L хромогенного пептида Z-Ala-Phe-Arg-pNa. Установлено, что содержание катепсина L в общем протеолитическом пуле составляет менее 0,1%. Из суспензии кишечника жука-кожееда методом RACE были изолированы и клонированы в вектор специфические фрагменты кДНК. Были созданы три плазмиды: pET22_NHis#15/CatL, pET22-C/CatL и pET22_full/CatL. Две первые плазмиды содержали гены зрелого катепсина L, модифицированного по N- или C-концу, соответственно, пептидами, включающими гексагистидиновые фрагменты. В отличие от pET22-C/CatL плазмида pET22_full/CatL содержала ген профермента. Рекомбинантные белки были выделены из телец включения и очищены методом металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-agarose. Наличие белков full-rCatL и C-rCatL в процессе получения и очистки подтвердили Вестерн-блоттом (по 3FLAG или c-myc эпитопам), N-rCatL (25 кДа) – по электрофорезу в 10% ПААГ. Специфическую активность по гидролизу Z-Ala-Phe-Arg-pNa проявляли только full-rCatL и C-rCatL. После рефолдинга белков full-rCatL и C-rCatL при pH 5, их специфическая активность возрастала в 2–3 раза. Белок N-rCatL не обнаружил специфической активности, что свидетельствует о значимости N-концевой части катепсина L для катализа. Достоверно установлено, что при рефолдинге рекомбинантный full-rCatL превращается в C-rCatL.

РАЗЛИЧИЕ ПЕРВИЧНЫХ СТРУКТУР БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ПРОТОЗОЙНЫХ ОЛИГОПЕПТИДАЗ B, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕЕ МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТА

Д.М. Кардинский[1], М.В. Овчинникова[1,2], А.А. Талызина[3], А.Г. Михайлова[1], В.А. Горленко[2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Московский педагогический государственный университет; [3]Московский физико-технический институт, Москва, Россия

Олигопептидаза B (OpdB) – это трипсиноподобная сериновая пептидаза, принадлежащая к семейству пролил-олигопептидаз, отличительной особенностью которого является наличие N-концевого β-пропеллерного и C-концевого каталитического доменов молекулы. 3D-структуры определены для OpdB трипаносом и лейшманий; для большинства бактериальных OpdB известны лишь нуклеотидные последовательности, а пространственная структура и энзимологические характеристики отсутствуют. 3D-структура OpdB *Leishmania major* и *Trypanosoma brucei* продемонстрировала важность интерфейса между каталитическим и пропеллерным доменами OpdB как для связывания субстрата и каталитической активности фермента, так и для стабильности белковой глобулы. Объектом данного исследования является первая психрофильная OpdB (PSP), выделенная нами из грам-отрицательного психротолерантного микроорганизма *Serratia proteamaculans*. При достаточно высоком уровне гомологии аминокислотных последовательностей PSP и OpdB *L. major* и *T. brucei*, оказалось, что из 5-ти функционально важных солевых мостов, обнаруженных в протозойных OpdB, только один из них сохраняется в случае PSP и многих других бактериальных OpdB. При этом отсутствует ключевой солевой мост R664- E179, ответственный за переход неактивной открытой формы фермента в активную закрытую. Мы выполнили моделирование трехмерной структуры PSP на основании 3D-структур протозойных OpdB и определили структурные факторы, регулирующие активность PSP: внутри- и междоменные контакты заряженных остатков R658, K655, D649 His-петли активного центра фермента, с остатками N-концевого β-пропеллерного домена (E75, E96 и E125). Мы провели сравнение аминокислотных последовательностей бактериальных и протозойных OpdB, содержащихся в базе данных UniProt, с целью выделить общие групповые характеристики, определяющие тип механизма активации. Изучено также влияние замены вышеперечисленных заряженных остатков PSP на незаряженные – на термостабильность соответствующих мутантных белков. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ проект № 14-50-00131 (в части моделирования и определения термостабильности фермента).*

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ COILED-COIL-ФРАГМЕНТА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ATP-ЗАВИСИМОЙ Lon-ПРОТЕАЗЫ *E. COLI*

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

LonA-протеаза *E. coli* (Ec-Lon) – бифункциональный гомогексамерный ATP-зависимый фермент суперсемейства AAA+-белков (ATP-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями), который является ключевым участником системы контроля качества (СКК) клеточного протеома и деградирует дефектные, поврежденные, а также некоторые специфические регуляторные белки по процессивному механизму (без высвобождения высокомолекулярных продуктов) в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом ATP. Субъединица Ec-Lon состоит из пяти доменов: N─HI(CC)─NB─H─P, где нуклеотидсвязывающий (NB) и α-спирализованный (H) домены формируют ATP-азный модуль, протеолитический P-домен представлен серин-лизиновой пептидгидролазой, а N-концевой (N) и следующий за ним α-спирализованный (HI) домены образуют некаталитическую область, включающую участок со специфической coiled-coil(CC)-конформацией. Ранее было обнаружено подобие HI(CC)-домена Ec-Lon-протеазы и α-спирализованного домена первого AAA+-модуля ClpB-шаперона из *Thermus thermophilus* (Tt-ClpB), включающего вставочный M-домен с CC-конформацией. При этом степень подобия CC-участка и M-домена составляет около 36%. Известно, что M-домен шаперона критичен для дезагрегационной активности и для взаимодействия Tt-ClpB с системой шаперона Hsp70. Однако роль CC-участка Ec-Lon-протеазы до настоящего времени остается неизученной. Целью данной работы было выявление вклада CC-фрагмента в функционирование Ec-Lon путем получения модифицированной формы фермента с делецией CC-участка и исследования ее ферментативных свойств в сравнении со свойствами интактной Ec-Lon-протеазы. Установлено, что CC-фрагмент важен для формирования и функционирования ATP-азного и пептидазного центров Ec-Lon, играет принципиальную роль в распознавании и связывании нуклеотидов, необходим для связывания и гидролиза белкового субстрата, а также для стабилизации структуры фермента. *Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 14-50-00131).*

КАЛЬПАИНОВАЯ И ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМЫ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

Л.А. Лысенко, Н.П. Канцерова, Н.Н. Немова
Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

Внутриклеточный протеолиз в скелетных мышцах рыб осуществляется по универсальным механизмам (протеасомному, лизосомно-аутофагическому, кальпаиновому) и, вместе с тем, имеет ряд специфических особенностей. Первая из них связана с доминированием кальпаинового пути и минорным вкладом протеасомной системы в общую белковую деградацию (их вклад оценивается в 35-45% и 4% от общего протеолиза, соответственно). В других органах рыб и мышцах млекопитающих наблюдается обратное соотношение протеиназ с преобладанием протеасомной деградации. Роль катептического гидролиза в лизосомах сходна для разных тканей рыб и млекопитающих, где с их участием утилизируется примерно 40% белков. Другая свойственная рыбам особенность заключается в выполнении структурными (миофибриллярными) белками роли запасных (пластических и энергетических) веществ; в периоды роста и нагула происходит их активный синтез и накопление, а при истощающих воздействиях (нерест, миграция, формирование гонад, голодание) – их гидролиз и утилизация в качестве энергетических субстратов. Указанные особенности особенно ярко проявляются у лососевых рыб (сем. Salmonidae), среди которых изучены атлантический лосось *Salmo salar*, кумжа *S. trutta*, горбуша *O. gorbuscha*. Протеолитический аппарат лососевых характеризуется высокой сложностью в силу общих для семейства этапов эволюционной истории, включающих два раунда полногеномных дупликаций, в результате которых у лососевых существует (и в большинстве случаев экспрессируется) удвоенное количество генов известных протеиназ по сравнению с прочими костистыми рыбами (кл. Teleostei) и четырехкратное количество – по сравнению с прочими позвоночными (Vertebrata). Жизненный цикл лососевых связан со сменой нагульных и нерестовых периодов, в течение которых ведущая роль протеолиза смещается от механизма рутинного обмена и контроля качества белков к механизму энергообеспечения за счет мобилизации белковых резервов. Обобщены сведения об уникальных особенностях белкового обмена и осуществляющих его ферментов у лососевых рыб, имеющие не только фундаментальный характер, но и практическое значение для разработки мер по ускорению накопления белковой массы у искусственно разводимых рыб.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 14-24-00102.

МОДЕРНИЗИРОВАННЫЙ КМ/ММ МЕТОД: КАК УВЕЛИЧИТЬ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ С ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Ю.А. Мокрушина[1], А.В. Головин[2], А.В. Степанова[1], И.В. Смирнов[1,3], Д.М. Блэкберн[4], А.Г. Габибов[1]
[1]Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия; [4]Университет Шеффилда, Шеффилд, Великобритания

Перспектива улучшения функциональных свойств биокатализаторов, равно как и целевого изменения их субстратной специфичности, привлекает множество исследователей. Комбинаторные методы и рациональный дизайн являются основными средствами для поиска мутантов с заданными свойствами. Современные компьютерные технологии позволяют моделировать химические реакции в сложных биологических системах и могут быть использованы для альтернативных экспериментов in silico. Использование антител в качестве биологических антидотов при отравлении фосфорорганическими токсинами (ФОТ) является перспективным направлением современной биофармацевтики. Квантово-механический/молекулярно-механический (КМ/ММ) подход успешно был использован для получения мутанта L-S35R антитела A17, ковалентно взаимодействующего с пестицидом параоксон с эффективностью в 170 раз большей, чем у антитела A17 дикого типа. Увеличение реакционной способности обусловлено стабилизацией субстрата в активном центре. Ограничение использованного метода связанно с переоценкой вклада водородных связей в стабилизацию предреакционного состояния. В результате, из рассмотрения были исключены варианты мутантов, в которых увеличение реакционной способности могло осуществляться посредством других механизмов. В настоящем исследовании мы усовершенствовали КМ расчеты, используя метод DFTB-3d. Среди найденных мутантов, способных наиболее эффективно образовывать переходное состояние реакции с параоксоном, были обнаружены L-L47K и L-L47R. Причем L-L47K демонстрирует увеличение эффективности в 240 раз по сравнению с антителом A17 дикого типа и превосходит полученный ранее L-S35R. Было установлено, что пространственная ориентация положительно заряженных мутантных остатков по-разному влияет на механизм реакции. В случае L-L47K и L-L47R эффективность взаимодействия с параоксоном достигается за счет повышения нуклеофильности реакционного остатка L-Y37, а в случае L-L35R – за счет корректного позиционирования субстрата в активном центре. Таким образом, разработанная методология позволяет получать мутантные антитела, реализующие разные механизмы взаимодействия с ФОТ. Совершенствование вычислительных алгоритмов открывает перспективы для направленной эволюции новых биокатализаторов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 16-14-00191.

ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА БЕЛКА В ПЕЧЕНИ МЫШИ, ОСНОВАННЫЙ НА РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

М.В. Нестерчук, Т.С. Зацепин, В.Э. Котелянский
Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

Регуляция трансляции играет важнейшую роль в большинстве процессов в клетке. Описано множество механизмов регуляции биосинтеза белка, однако механизм ответа на общее изменение трансляции до сих пор не ясен. Эукариотический фактор элонгации 2 (eef2) является необходимым компонентом аппарата трансляции. Этот односубъединичный белок осуществляет ГТФ-зависимую транслокацию рибосомы и участвует в регуляции трансляции. Это делает eef2 идеальной мишенью для направленного изменения биосинтеза белка. Чтобы изучить клеточный ответ на снижение трансляции, мы разработали систему для нокдауна eef2 в печени мыши. Инъекция мышам липидных наночастиц, содержащих siРНК против мРНК eef2, вызывает ингибирование трансляции в печени. Использование РНК-интерференции позволяет тонко управлять уровнем нокдауна варьированием концентрации siРНК, что очень важно, так как сильный нокдаун eef2 летален. Снижение количества eef2 и элонгации трансляции приводит к изменению соотношения полисом и моносом. Транскриптомный и протеомный

анализы печени с ингибированием трансляции показали, что изменение в уровне биосинтеза белка вызывает перестройку экспрессии генов. В частности, кластер генов рибосомных белков и генов компонентов аппарата трансляции активируются в печени с нокдауном eef2.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, СОДЕРЖАЩИХ NAD(P)H: УБИХИНОН ОКСИДОРЕДУКТАЗУ I ТИПА С ИЗМЕНЕННОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Е.С. Козаева, Е.А. Полякова, О.Н. Игонина, Н.В. Стойнова
Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика

NADH: убихинон оксидоредуктаза I типа (NDH-1) является одним из ключевых компонентов дыхательной цепи, осуществляет перенос электронов с NADH к пулу хинонов в цитоплазматической мембране. У *E. coli* NDH-1 является одной из двух NADH-дегидрогеназ. В отличие от NADH:убихинон оксидоредуктазы II типа (NDH-2), NDH-1 генерирует протонный электрохимический градиент. При сверхсинтезе ряда клеточных метаболитов у штаммов-продуцентов, сопровождающемся потреблением большого количества ATP, синтез NADPH является избыточным, что, в ряде случаев, ингибирует рост клеток. Мы предположили, что изменение специфичности NDH-1 с NADH-зависимого фермента на NADPH-зависимый позволит задействовать избыточный NADPH в процессе дыхания и увеличит, тем самым, синтез ATP. Известно, что мутация E183A в NuoF, цитоплазматической субъединице NDH-1, приводит к появлению двойной, NADH/NADPH, субстратной специфичности комплекса. Мы осуществили сайт-направленный мутагенез в хромосомной копии гена *nuoF* непосредственно в опероне *nuoABCDEFGHIJKLMN*, кодирующем все субъединицы фермента; важно, что при этом сохранялась природная регуляция оперона, что обеспечивало необходимый баланс при синтезе и сборке этого комплекса, самого крупного в составе мембраны *E. coli*. После оптимизации условий приготовления мембранных везикул были проанализированы активности NDH-1 и NDH-2 у штамма дикого типа MG1655 и мутанта MG1655 $nuoF^{E183A}$, что подтвердило появление двойной субстратной специфичности комплекса NDH-1, содержащего $NuoF^{E183A}$ субъединицу. При этом NDH-1 с измененной специфичностью обладал в 2 раза более низкой специфической активностью, чем NDH-1 дикого типа. Общий уровень NAD(P)H дегидрогеназной активности остался практически неизменным за счет компенсаторного эффекта, обусловленного вкладом NDH-2. Наряду с этим, при помощи вновь разработанного подхода к направленной интеграции протяженных фрагментов ДНК в хромосому *E. coli*, основанного на согласованной экспрессии рекомбинационных генов бактериофагов, были получены штаммы *E. coli* с увеличенным по сравнению с «диким» типом уровнем активности NDH-1 благодаря увеличению копийности *nuoA-N* оперона. Использование штаммов, способных окислять как NADH, так и NADPH в процессе дыхания, имеет важное значение, как для фундаментальных, так и для прикладных исследований.

ХИМЕРНАЯ НЕОРГАНИЧЕСКАЯ ПИРОФОСФАТАЗА, СОСТОЯЩАЯ ИЗ 1-13 *E. COLI*, 14-175 *M. TUBERCULOSIS* КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПИРОФОСФАТАЗ СЕМЕЙСТВА I

Р.С. Романов[1,2], С.А. Курилова[1], Е.В. Родина[2]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и [2]Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Неорганические пирофосфатазы являются критически важными для всех организмов ферментами, гидролизующими неорганический пирофосфат – продукт большого количества биохимических процессов. Несмотря на высокую консервативность остатков активного центра ферментов данного семейства, их структура и функциональные особенности сильно варьируются для различных организмов. Неорганическая пирофосфатаза из *Mycobacterium tuberculosis* (MT-PPаза) является привлекательной целью для дизайна новых антитуберкулёзных средств, вследствие наличия структурных и функциональных особенностей, отличающих её от классического представителя бактериальных неорганических пирофосфатаз семейства I – неорганической пирофосфатазы из *Escherichia coli* (EC-PPаза). Одной из таких особенностей является отсутствие в MT-PPазе 13 аминокислот с N-конца, характерных для большинства бактериальных неорганических пирофосфатаз семейства I. В данной работе методами генетической инженерии была создана генетическая конструкция для экспрессии химерного белка, в котором участок цепи 1-13 соответствует последовательности Ser1-Glu13 из EC-PPазы, а оставшаяся цепь (14-175) соответствует последовательности Gln1-His162 MT-PPазы. Методика экспрессии, выделения и очистки неорганических пирофосфатаз семейства I была оптимизирована для получения чистого и активного целевого белка в количестве, достаточном для исследования его свойств. Полученный белок был идентифицирован и охарактеризован с помощью физико-химических методов. С помощью методов ферментативной кинетики была выполнена его каталитическая характеристика. На основании полученных данных был проведён анализ функционирования, олигомерного строения и регуляции EC-PPазы и MT-PPазы. Были моделированы отношения структура – функции в ряду неорганических пирофосфатаз семейства I. Результаты настоящей работы будут использованы для дальнейших исследований MT-PPазы, получения её кристаллической структуры, а также создания её селективных биологически совместимых ингибиторов.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСТИРОЛЬНЫХ МИКРОСФЕР НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИПАЗ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А.А. Савина[1], С.Ю. Зайцев[1], И.С. Зайцев[1], Н.Ю. Сапего[1], Д.О. Соловьева[1,2], В.А. Олейников[2]
[1]Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В работе нами было использовано три типа липаз: из поджелудочной железы свиньи (Л1), из проростков пшеницы (Л2), из грибков вида *Candida Cylindracea* (Л3), молекулярная масса 50000, 42000 и 67000, соответственно (фирма Sigma). В качестве носителя был использован полистирольный латекс различного диаметра: 200, 520 и 1000 нм и полистирольный латекс с карбоксилированной поверхностью частиц с концентрацией карбоксильных групп 4,2 мкг-экв/г и диаметром – 3,8 мкм. Иммобилизация производилась методом физической адсорбции, путем инкубации в течение 30 минут при 25°C. В качестве субстрата был использован 0,1 М триацетилглицерол (Sigma) растворенный в 0,05 М $CaCl_2$ и 0,05 М NaCl. Каталитическая активность определялась методом потенциометрического титрования при pH 7. Для Л1 было выявлено ингибирование активности во всех случаях: на 3–6% с микросферами диаметром 1000 нм, на 21% с частицами диаметром 520 нм и на 25%

с частицами диаметром 200 нм. Л2 увеличивает свою активность на 70% при адсорбции на полистирол диаметром 1000 нм и на 46% при адсорбции на латекс диаметром 520 нм, однако при использовании в качестве носителя микрочастиц размером 200 нм активность снижается на 47%. Л3 незначительно активируется в присутствии микронных частиц, однако, при использовании частиц диаметром 520 и 200 нм происходит ингибирование на 10% и 15% соответственно. В результате исследований влияния заряженных частиц на липазы было выявлено ингибирующее действие на Л1 – активность снизилась на 21%, по отношению к Л2 и Л3 отрицательно заряженный латекс проявил активирующие свойства, увеличив каталитическую активность на 33% и на 7% соответственно. В большинстве случаев каталитическая активность липаз уменьшается с уменьшением диаметра микросфер (даже если в отдельных случаях активность вначале и превышала 100%). Значительное увеличение активности липазы из проростков пшеницы на крупных частицах латекса является новым принципиальным фактом, согласующимся с теоретическими представлениями об активации липаз на границе раздела фаз, но который требует дополнительных исследований. Отрицательно заряженный латекс неоднозначно ведет себя по отношению к разным препаратам липаз, вероятно, это связано с общим отрицательным зарядом Л1 и положительным Л2 и Л3.

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ Mettl3 НА ЛОКАЛИЗАЦИЮ U3 мякРНК

О.В. Сергеева[1,2], А.А. Чугунова[2], Т.С. Зацепин[1,2], П.В. Сергиев[1,2], О.А. Донцова[1,2]
[1]Сколковский институт науки и технологии, Москва; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Модификацию РНК в клетке производят специализированные ферменты – РНК-метилтрансферазы. Белковый комплекс из двух метилтрансфераз Mettl3-Mettl14 вместе со вспомогательными белками отвечает за образование метилированного аденозина (m6A) в мРНК человека (Wang X. et al, 2017). Метилирование аденозина по 6 положению является одной из самых распространенных модификаций в мРНК и некодирующих РНК (Linder B. et al, 2015). U3 мякРНК относится к группе некодирующих РНК и участвует в процессинге пре-рРНК, и сборке малой субчастицы рибосомы. В ходе исследования клеточной линии с нокдауном гена метилтрансферазы Mettl3 было показано накопление мякРНК U3 в цитозоле. Снижение количества мякРНК U3 в ядре подтверждается данными иммунопреципитации антителами к метилированному по 6 положению аденозину. Было показано, что предшественник мякРНК U3 присутствует в цитозоле, хотя созревание РНК происходит в нуклеоплазме и тельцах Кахаля, после чего происходит транспорт в ядро (Leary D. et al, 2004). Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что модификации метилтрансферазы Mettl3 влияют на созревание и транспорт мякРНК U3.

ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ ФОСФОЛИПАЗЫ А2 ГАДЮКИ НИКОЛЬСКОГО ИНДУЦИРУЮТ АГРЕГАЦИЮ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ

Д.С. Третьякова[1], А.С. Алексеева[1], В.П. Черников 2, Ю.Н. Уткин[1], Ю.Г. Молотковский[1], Е.Л. Водовозова[1], И.А. Болдырев[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Институт изучения морфологии человека, Москва, Россия

Фосфолипаза А2 (3.1.1.4, ФЛА2) отщепляет ацильные цепи фосфолипидов в положении sn-2 остатка глицерина. Гетеродимерные ФЛА2 из ядов змей характеризуются тем, что их субъединицы А и В сходны по размерам и связаны нековалентными взаимодействиями. Их структуры также подобны: внутри групп IA и IIA кальций-зависимых фосфолипаз А2 змей идентичность аминокислотных последовательностей между субъединицами А и В составляет не менее 60%. Однако только субъединица В обладает ферментативной активностью, тогда как только субъединица А хорошо растворима в водной среде. В первичной структуре субъединицы А есть замены, препятствующие связыванию с мембраной. Более того, субъединицы по-разному заряжены. Яд гадюки Никольского (V. nikolskii) отличается тем, что содержит две гетеродимерные ФЛА2. Они различаются кинетикой каталитического гидролиза из-за аминокислотных замен, которые затрагивают сайт связывания с мембраной, но не активный центр. Механизм токсического действия этих гетеродимеров, в том числе роль некаталитической субъединицы А и как таковой гетеродимерной структуры, не выяснен. ФЛА2 из *V. nikolskii* состоят из каталитически активной основной субъединицы В и неактивной кислой субъединицы А. В данной работе мы показали, что действие этих ФЛА2 на липидный бислой вызывает агрегацию и стэкинг бислоев. Эти процессы были продемонстрированы с помощью двух независимых методов – флуоресцентной спектроскопии и электронной микроскопии. Агрегация бислоев становится возможной поскольку каждая субъединица гетеродимеров из *V. nikolskii* содержит сайт связывания с мембраной (известный также как IBS, interfacial binding site). И когда два таких сайта гетеродимера задействованы, он выступает в качестве связывающего агента. Гетеродимеры вызывают агрегацию отрицательно заряженных бислоев, построенных из фосфатидилглицерина, и не оказывают такого эффекта на нейтральные бислои из фосфатидилхолина. При этом агрегация происходит даже в условиях ингибирования ферментативной активности. Мы полагаем, что гетеродимеры (или другие ФЛА2-комплексы с двумя IBS) могут изменять кривизну бислоя и таким образом стимулировать, например, слияние везикул с клеточными мембранами. *Работа поддержана грантами РФФИ 15-33-20523 мол_а_вед и 15-04-07415 А.*

КОНКУРС МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ ТРАНСАМИНАЗЫ ИЗ МИКСОБАКТЕРИИ *HALIANGIUM OCHRACEUM*

Ю.С. Зейфман[2], А.Ю. Николаева[1,2], Т.В. Ракитина[2], К.М. Бойко[1,2], Е.Ю. Безсуднова[1], В.О. Попов[1,2]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; [2]НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Трансаминазы (ТА) – пиридоксаль-5`-фосфат - зависимые ферменты, которые катализируют обратимый перенос аминогруппы от первичных аминов/аминокислот на кетокислоты, кетоны и альдегиды. Трансаминазы IV фолд-типа выделены в отдельный IV класс и включают трансаминазы трех семейств: трансаминазы разветвленных аминокислот (BCAT), D-аланин аминотрансферазы и (R)-аминотрансаминазы. То есть, ТА IV фолд-типа могут катализировать стереоселективное превращение как (S)-, так и (R)-аминосубстратов, в то время как трансаминазы I фолд-типа (I-III классы) являются исключительно (S)-селективными. Анализ аминокислотных последовательностей ТА IV класса [1] выявил наличие двух характеристических мотивов, определяющих субстратную специфичность трансаминаз разных семейств. Нами была обнаружена новая тран-

саминаза IV класса из умеренно галофильной миксобактерии *Haliangium ochraceum*, имеющая нарушения в обоих характеристических мотивах, другими словами, по характеристическим мотивам отличная от трех семейств ТА IV фолд-типа, что определило интерес к изучению ее свойств. Рекомбинантная ТА из *H. ochraceum* с His6-тагом была экспрессирована в клетках *E. coli*. Очищенный фермент был закристаллизован и методом рентгено-структурного анализа получена его структура с разрешением 3.0 γ. ТА *H. ochraceum* активна с кетоаналогами разветвленных аминокислот (L-Leu, L-Val, L-Ile), пируватом, но не активна с типичным для ТА аминоакцептором α-кетоглутаратом. ТА *H. ochraceum* активна с (R)-α-метилбензиламином (R-MBA) в качестве аминодонора. Температурный оптимум деаминирования R-MBA в реакции со вторым субстратом-аминоакцептором 3-метил-2–оксовалератом составил 45°C, оптимум pH реакции составил 9.0. Активность фермента при 40°C, в 50 мМ Tris-буфере pH 9.0, 10 мМ R-MBA и 5 мМ 3-метил-2-оксовалерата составила 0,13 U/мг. По субстратной специфичности фермент не относится ни к одному из охарактеризованных семейств трансаминаз IV класса. *Работа поддержана грантом РНФ 14-24-00172 в части биохимических исследований.*

Литература

1. Hohne M., Schatzle S. et al. // Nat. Chem. Biol., 2010, V. 6, P. 807–813.

ВЛИЯНИЕ ИМИТАЦИИ МАГНИТНОЙ БУРИ РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА КАЛЬЦИЙЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ *DAPHNIA MAGNA*

Н.П. Канцерова[1], В.В. Крылов[2], Л.А. Лысенко[1], Н.Н. Немова[1]

[1]Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск; [2]Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок, Ярославская обл., Россия

Исследовано влияние имитации магнитной бури различной интенсивности на кальцийзависимые протеиназы семейства кальпаинов у дафнии. Дафнии опытных групп были подвергнуты воздействию магнитной бури с интенсивностью 100, 300 и 500 нТл в течение 24 ч. Контрольная группа находилась в условиях естественного магнитного поля. Было установлено, что действие имитации магнитной бури на дафний привело к снижению активности кальпаинов в их тканях в среднем на 40%, что согласуется с полученными ранее данными. Так, прижизненная экспозиция рыб, моллюсков и дафний в часовом отрезке главной фазы сильной магнитной бури также приводила к снижению активности кальпаинов в их органах и тканях. Показано, что активность препаратов кальпаинов, полученных от интактных животных, также снижается в условиях воздействия геомагнитной бури. Проведение экспериментов *in vivo* и *in vitro* позволило установить способность кальцийзависимых протеиназ непосредственно воспринимать воздействие геомагнитных возмущений. При оценке зависимости степени ингибирования активности фермента от интенсивности воспроизведенных сигналов было установлено, что наибольшее снижение активности кальпаинов в тканях дафний было вызвано умеренной геомагнитной бурей. Более интенсивные бури в меньшей степени влияли на активность исследуемых ферментов. *Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0033 и при поддержке гранта Президента РФ МК-4737.2016.4.*

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СТЕРОИД-ИЗОМЕРАЗ ЧЕЛОВЕКА

С.В. Смольская, И.П. Грабовец, А.А. Гилеп

Институт биоорганической химии НАН, Минск, Беларусь

Стерол-изомеразы катализируют ключевые этапы в пути биосинтеза холестерина и стероидных гормонов. Нарушения в функционировании стерол-изомераз приводят к таким заболеваниям, как дефицит 3β-гидроксистероид дегидрогеназы, хонроплазия пунктата второго типа и MEND синдром. Несмотря на успехи в понимании функциональной нагрузки этих ферментов, в настоящее время нет достаточных данных, позволяющих охарактеризовать структуру и выявить связь между структурой и функциями данных мембран-связанных белков. В нашей работе мы получали две группы стерол-изомераз. Фермент 3β-гидроксистероид дегидрогеназа/изомераза человека (3β-hydroxysteroid dehydrogenase, 3β-HSD) преобразует 3-гидрокси-Δ5 предшественники в 3-кето-Δ4 продукты, что является начальным этапом в путях биосинтеза минерало-, глюкокортикоидов и половых гормонов (Rasmussen M.K. et al., 2013). Другой фермент, стерол-8,7-изомераза (3-β-гидроксистероид-Δ8,Δ7-изомераза или эмопомил-связывающий белок, emopamil-binding protein, EBP), катализирует конверсию Δ8-стеролов в соответствующие производные Δ7-изомеры (Silve S. et al., 1996). Мутации в гене, кодирующем стерол 8,7-изомеразу, приводят к увеличению 8-дегидрохолестерола и холест-8(9)-ен-3-β-ола в плазме крови и тканях. В данной работе мы использовали методы молекулярно-генетической инженерии для создания векторов, позволяющих экспрессировать стерол-изомеразы в одной рамке считывания с белком слияния SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier). Нам удалось получить полноразмерный белок 3β-HSD1 путем гетерологической экспрессии с использованием полученного вектора в клетках *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. Кроме того, мы использовали метод сайт-направленного мутагенеза для удаления аминокислот в позиции 283–310, соответствующих одному из мембран-связывающих доменов белка 3β-HSD1, что, как было показано ранее (Thomas J. L., et al., 1999), способствует увеличению растворимости белка. Нами также было продемонстрировано, что удаление аминокислот в позиции 29–50, соответствующих одному из трансмембранных доменов белка EBP, способствует экспрессии стерол-8,7-изомеразы человека в клетках *E. coli*. Данные белковые препараты были использованы для оценки их каталитической активности.

Работа выполняется при финансовой поддержке БРФФИ (грант № Х17М-055).

ЭКЗОГЕННЫЙ ЛИЗИС ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА *A. BAUMANNII*

Т.С. Белый[1], Д.В. Мишкин [1], М.М. Шнейдер[2], Н.Л. Клячко[1], К.А. Мирошников[2]

[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Пептидогликанлизирующие ферменты (лизины) часто рассматриваются в качестве перспективных антимикробных агентов (энзибиотиков). Однако для борьбы с грамотрицательными патогенами применение лизинов затруднено из-за ограниченного доступа фермента к пептидогликану клеточной стенки через внешнюю мембрану. Для преодоления этой проблемы

используются генно-инженерные ферменты (артилизины), имеющие в составе трансмембранный домен, обеспечивающий транспорт белка через бактериальную мембрану. В геноме *Acinetobacter baumannii* AB5075UW был обнаружен ген, кодирующий лизин (AcLys), последовательность которого содержит С-концевой домен, с обогащенный гидрофобных и положительно заряженных аминокислот. Предположительно такой пептид обеспечивает высокое сродство фермента к внешней мембране грамотрицательных бактерий.

На основе вектора pBAD была получена конструкция, содержащая ген AcLys с гистидиновой меткой на N-конце под контролем арабинозного промотора. Растворимый рекомбинантный фермент синтезирован в штамме *E. coli* DH10B и очищен с помощью Ni-аффинной хроматографии до ~95% чистоты. Гель-фильтрацией показано, что фермент существует в растворе в виде смеси мономера и димера.

Показана способность рекомбинантного AcLys катализировать лизис грамотрицательных бактерий «извне». Выявлена высокая зависимость активности фермента от концентрации катионов: Na^+ и K^+ полностью ингибируют активность при 100 мМ, Ca^{2+} и Mg^{2+} при 5 мМ. pH-оптимум действия AcLys составляет 6.0. Кинетика термоинактивации фермента имеет смешанный порядок. Фермент сохраняет более 90% активности на протяжении трех месяцев при хранении в буфере pH 8.0 при 4°C. *Работа поддержана грантом РФФИ № 15-05-07995*

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕМОДИФИЦИРОВАННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ СУЛЬФАТАЗЫ ИЗ *FUSARIUM PROLIFERATUM* LE1

К.С. Бобров[1], С.А. Корбан[1,2], М.А. Майнскова[3], С.Н. Нарыжный[1,3], О.Л. Власова[2], Е.В. Энейская[1], А.А. Кульминская[1,2]
[1]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ Курчатовский институт, Гатчина; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; [3]Институт биомедицинской химии, Москва, Россия

Сульфатазы относятся к ферментам класса гидролаз, катализирующим гидролиз эфиров серной кислоты. Известно, что эти ферменты обладают широким спектром биологических активностей [1] и вовлечены в патогенез многих заболеваний [2–3]. Также сульфатазы играют важную роль в росте и морфологии грибов рода *Fusarium*, что делает их потенциальной мишенью для разработки новых фунгицидов. Тем не менее количество охарактеризованных сульфатаз крайне мало. Наиболее изучены человеческие ферменты, в то время как микробным сульфатазам уделялось мало внимания. В ходе проведённой работы нами была создана система гетерологичной экспрессии предполагаемой холин сульфатазы мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1. Несмотря на отсутствие посттрансляционной модификации каталитического цистеина в формилглицин полученный рекомбинантный фермент эффективно гидролизовал модельный субстрат п-нитрофенил сульфат. С использованием данного субстрата была проведена физико-химическая характеристика белка, а также были определены оптимальные условия для проведения реакции гидролиза, катализируемой сульфатазой. Хроматографическими методами было показано, что рекомбинантная сульфатаза катализирует реакцию гидролиза холин сульфата и его производных, что подтверждает правильность классификации исходного фермента как холин сульфатазы. Однако предложенные на сегодняшний день механизмы реакции ферментативного гидролиза, катализируемой сульфатазами, не объясняют наличие каталитической активности у немодифицированных ферментов. Согласно существующим моделям такие ферменты не способны осуществлять множественные каталитические акты, что означает необходимость дальнейших детальных исследований для понимания механизма реакции ферментативного гидролиза сульфатной связи. Результаты работы послужат основой для дальнейших исследований фермента и его практической реализации в биотехнологии.

Работа выполнена за счёт гранта Российского научного фонда (проект No 16-14-00109).

Литература

1. S. R. Hanson et al (2004) Angew. Chem. Int. Ed Engl., vol. 43, no. 43, 5736–5763.
2. G. Diez-Roux and A. Ballabio (2005) Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., vol. 6, 355–379.
3. G. Parenti et al (1997) Curr. Opin. Genet. Dev., vol. 7, no. 3, 386–391.

ИНГИБИРОВАНИЕ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ P1-1 1,10-ФЕНАНТРОЛИН-5,6-ДИОНОМ: КИНЕТИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ

Ю.В. Бречко, С.Н. Гилевич
Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Значительный интерес к поиску новых ингибиторов глутатион-S-трансферазы P1-1 (GSTP) вызван гиперэкспрессией фермента в опухолевых клетках, что приводит к формированию множественной лекарственной устойчивости. В настоящей работе впервые изучено *in vitro* влияние 1,10-фенантролина и ряда его производных на активность очищенной GSTP из эритроцитов человека в реакции конъюгации глутатиона (GSH) и 1-хлор-2,4-динитробензола (CDNB). Обнаружен новый обратимый ингибитор фермента – 1,10-фенантролин-5,6-дион (phedon). Найденная величина IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования), равная 33 мкМ, позволяет отнести phedon к ингибиторам средней силы и сравнима с аналогичными значениями для кемпферола и кверцетина – известных природных ингибиторов GSTP. В экспериментах по стационарной кинетике для phedon установлен неконкурентный тип ингибирования по отношению к GSH и конкурентный – по отношению к CDNB. Методами молекулярного докинга (AutoDock Vina) и моделирования молекулярной динамики (Amber 14) рассчитана наиболее благоприятная ориентация phedon в H-сайте GSTP, согласующаяся с кинетическими данными. Существенный вклад в стабилизацию комплекса фермент-лиганд (Eакт = -6,4 ккал/моль) вносят водородные связи между карбонильным O при атоме C5 phedon и остатками Tyr108 (OH-группа) и Gly205 (амидная NH-группа) полипептидной цепи, а также стэкинг-взаимодействия с Phe8 и гидрофобные взаимодействия с Trp38 и Val35. По данным масс-спектрометрии (ESI-QTOF) и спектрофотометрии, phedon не образует прочных ковалентных аддуктов с GSTP или GSH, но медленно окисляет тиольную группу трипептида с образованием GSSG и 1,10-фенантролин-5,6-диола (phedol), который, в свою очередь, реокисляется на воздухе, генерируя phedon и H_2O_2. Как показали дополнительные эксперименты, 20 мкМ phedol и 100 мкМ H_2O_2 в стандартных условиях определения активности (pH 6,5; 25°C; 5 мин на воздухе) не ингибируют GSTP, а доля окисленного GSH во всех случаях не превышает 2,6%, что позволяет исключить непрямые механизмы ингибирования фермента. Обсуждается возможность использования phedon и родственных соединений в направленном синтезе новых лидерных структур с высокой ингибиторной активностью.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЗОЛСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ПЕСТИЦИДОВ С ПОЛИМОРФНЫМИ ВАРИАНТАМИ CYP2C9 И CYP2C19 ЧЕЛОВЕКА

И.В. Гайдукевич[1], Т.А. Сушко[2], А.М. Тумилович[1], И.П. Грабовец[1], С.А. Усанов[1], А.А. Гилеп[1]
[1]Отдел молекулярных биотехнологий, Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; [2]Отдел биоинженерии, Университет Токио, Япония

Азолсодержащие противогрибковые препараты являются одним из наиболее часто используемых классов лекарственных препаратов для лечения грибковых инфекций у людей, а также представляют широко используемый класс сельскохозяйственных пестицидов, действию которых, так или иначе, подвергается человек. Ввиду высокой межвидовой гомологичности структурной организации цитохромов P450, азолсодержащие вещества взаимодействуют не только с целевым гем-связывающим участком CYP51 грибов, но также могут модулировать каталитическую активность цитохромов P450 человека, вызывая целый ряд серьезных побочных эффектов и нежелательных межлекарственных взаимодействий. В настоящей работе мы показали, что существуют значительные отличия в аффинности азолсодержащих лекарственных препаратов и пестицидов к наиболее распространенным в европейской популяции полиморфным изоформам CYP2C9 и CYP2C19 человека (ферментам, участвующих в метаболизме эндогенных биорегуляторов и ксенобиотиков), а также выявили различия в способности данного класса веществ по-разному модулировать каталитическую активность полиморфных изоформ CYP2C9 и CYP2C19 человека. Было показано, что отдельные пестициды могут связываться с высокой аффинностью с изученными ферментами и, как следствие, могут влиять на эндокринную и паракринную регуляцию. Мы также показали, что цитохром b5 в концентрационно-зависимой манере дополнительно снижает диклофенак-4-гидроксилирующую и омепразол-5-гидроксилирующую активность малоактивных полиморфных изоформ CYP2C9 и CYP2C19 человека. Полученные результаты могут быть крайне полезны в персонализации лечения, особенно в условиях широко распространенной полифармации.

РОЛЬ АРГИНАЗЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИБС ПРИ АОРТОКОРОНАРНОМ ШУНТИРОВАНИИ. КОРРИГИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННОГО АНТИОКСИДАНТА

В.В. Внуков, А.А. Ананян, Н.П. Милютина, В.А. Дзреян, Д.Ю. Гвалдин, А.А. Плотников
Кафедра биохимии и микробиологии, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Показано, что введение SkQ1 в дозе 50 нм/кг снижает на 38–84% как активность аргиназы 1, так и общую активность аргиназы в тканях мозга, лёгких, почек и печени крыс. Вероятно, SkQ1 проявляет свойства конкурентного ингибитора, поскольку так же как и аргинин - субстрат аргиназы, имеет положительный заряд, а, следовательно, повышенное сродство к активному центру фермента, в котором преобладают радикалы отрицательно заряженных аминокислот. Определение содержания метаболитов NO – продуктов NOS-активности, в тех же сериях опытов показало, что введение SkQ1 приводит к их увеличению на 45–46% по сравнению с контролем только в почках и мозгу крыс. В печени и лёгких изменений данного показателя не обнаружено. Таким образом, SkQ1–митохондриально-направленный антиоксидант является ингибитором аргиназы и, возможно, реципрокным модулятором NOS, но лишь в тканях мозга и почек, в которых максимально представлена аргиназа 2-го типа. Можно предположить, что описанный ранее В.П. Скулачевым и соавторами защитный эффект SkQ1 при ишемии/реперфузии так же может быть связан с влиянием не только на NOS, но и на аргиназу. Основной причиной развития эндотелиальной дисфункции, сопровождающейся аномальной проницаемостью сосудов принято считать дефицит или снижение биодоступности NO, вероятно, вследствие увеличения продукции цитокинов, ингибитора NOS - ассиметричного диметиларгинина (АДМА) и повышения активности аргиназы. Нами установлено, что у больных ИБС после аортокоронарного шунтирования увеличивается в крови содержание стабильных метаболитов оксида азота на 67–104%, АДМА на 24–76% и активность аргиназы на 70–220%. В работах ряда авторов в экспериментах на животных показано, что использование ингибиторов и снижение активности аргиназы ускоряет процесс реабилитации при ишемии – реперфузии и уменьшает очаг некроза при инфаркте миокарда. Полученные результаты могут быть использованы при разработке лекарственных средств на основе SkQ1.

ПРЕДСКАЗАНИЕ НОВЫХ САЙТОВ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ КАСПАЗ МЕТОДОМ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА

А.В. Замараев, Г.С. Копеина, Б.Д. Животовский, И.Н. Лаврик
Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Программируемая клеточная гибель, апоптоз, является неотъемлемым процессом, свойственным всем многоклеточным организмам, играющим центральную роль в дифференцировке клеток, удалении поврежденных клеток и регуляции клеточного гомеостаза. Основными ферментами, участвующими в инициации и дальнейшем протекании апоптоза являются белки семейства цистеиновых протеаз – каспазы. Фосфорилирование – наиболее распространенный тип модификации каспаз, при котором фосфорилирование серина, треонина или тирозина способно вызвать конформационные изменения в структуре белка или напрямую влиять на действие активного центра фермента. Тем не менее, количество известных сайтов фосфорилирования каспаз достаточно мало, в сравнении с другими клеточными ферментами, и требует детального изучения для понимания механизмов запуска программируемой гибели клеток. Для изучения такого типа регуляции клеточной гибели был проведен сравнительный анализ консервативных остатков серина, треонина и тирозина в последовательности каспазы среди позвоночных и беспозвоночных организмов. Помимо этого, положения всех остатков были рассмотрены на третичной структуре каспаз и соотнесены с уже известными сайтами фосфорилирования. Анализ множественного выравнивания показал, что экспериментально доказанные сайты фосфорилирования высоко консервативны. Причем некоторые из них, такие как Thr-263 каспазы-8 и Ser-183 каспазы-9 находятся в одном и том же участке альфа-спирали в непосредственной близости от активного центра. Анализ аналогичных участков альфа-спирали у остальных каспаз показал консервативность расположения остатков треонина или серина S220, T67, T67, T90 у каспаз-2, -3, -6, и -7, соответственно. Таким образом, была высказана гипотеза о возможности участия данных сайтов в модификации каспаз и регуляции протеолитической активности фермента. Действительно, с помощью сравнительного анализа последовательностей каспаз и их пространственных структур нам удалось выявить потенциальные сайты фосфорилирования. Более того, предварительные эксперименты показали участие данных сайтов в регуляции активации каспаз и программируемой гибели клеток.

ЭСТЕРАЗЫ HSL СЕМЕЙСТВА ИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ

Л.Е. Петровская[1], К.А. Новотоцкая-Власова[2], К.М. Бойко[3,4], А.Ю. Николаева[3,4], Д.А. Корженевский[4], М.В. Крюкова[4], Е.М. Ривкина[2]

[1]Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Москва; [2]Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино; [3]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва; [4]Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва, Россия

Сибирская вечная мерзлота представляет собой уникальную среду, в которой обитают разнообразные микроорганизмы, продуцирующие ферменты с различной специфичностью. В результате конструирования и скрининга фосмидных библиотек метагеномных ДНК, выделенных из многолетнемерзлых грунтов, нами были получены гены, кодирующие новые эстеразы, принадлежащие к HSL семейству. Для установления молекулярных основ микробной адаптации к условиям вечной мерзлоты мы изучили структурные и функциональные характеристики этих ферментов. Эстеразы PMGL2 и PMGL3 были экспрессированы в клетках *E. coli*. Их активность при различных условиях (pH, температура) определялись колориметрическим методом. Термостабильность ферментов определяли путем измерения остаточной активности после инкубации при различных температурах. С помощью рентгеновской кристаллографии были получены 3D структуры обоих ферментов. Установлено, что PMGL2 является эстеразой, которая активна в широком диапазоне температур, с оптимальной температурой 45°C. Её аминокислотная последовательность содержит новый мотив GCSAG с предполагаемым каталитическим остатком серина. Температурный оптимум PMGL3 достигается при температуре 30°C. Инкубация при температуре 50°C привела к практически полной инактивации PMGL3, в то время как PMGL2 сохранил 65% активности. Оба белка обладают типичной α/β гидролазной укладкой и образуют димеры в растворе. Изучение трехмерной структуры выявило различные конфигурации интерфейса димеров PMGL2 и PMGL3, которые предположительно отвечают за различную термическую стабильность. Результаты исследования демонстрируют, что микроорганизмы вечной мерзлоты содержат липолитические ферменты с различными профилями активности и обладают большим биотехнологическим потенциалом. *Работа выполнена при поддержке российского научного Фонда гранты №14-14-01115 (в части биохимических исследований) и 14-24-00172 (в части структурных исследований).*

КАК 11S РЕГУЛЯТОР ВЛИЯЕТ НА ПРОТЕАСОМНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ СУБСТРАТОВ С ОЛИГОГЛУТАМИНОВЫМ ФРАГМЕНТОМ

В.А. Крячков[1], В.Н. Ташлицкий[1], А.Г. Габибов[2], А.В. Бачева[1] *[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия*

Протеасома – это белковый комплекс, присутствующий в ядре и цитоплазме всех эукариот, а также в некоторых бактериях. Его основная функция - протеолиз мутантных и поврежденных белков в клетках. Установлено, что протеасомная убиквитин-зависимая система деградации участвует в патогенезе некоторых нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона. В последнем случае образуются мутантные белки с удлиненным полиглутаминовым фрагментом, которые не могут эффективно расщепляться протеасомой. Таким образом, важно изучить способы активации протеасомы в отношении подобных субстратов. Комплекс, ответственный за деградацию белков в клетках, называется 26S-протеасомой и представляет собой 20S-протеасому, связанную с 19S-регуляторным белком. Еще один регулятор – 11S – повышает пептидазную активность 20S-протеасомы. Нами было изучено влияние 11S белка на расщепление 20S и 26S протеасомой различных пептидных субстратов, содержащих олигоглутаминовые фрагменты разной длины. Также была исследована зависимость скорости гидролиза от мольного соотношения 11S белка к протеасоме и определены предпочтительные сайты протеасомного расщепления. Было обнаружено, что 11S-регулятор увеличивает лишь активность 20S протеасомы в отношении коротких субстратов с 5 остатками глутамина, однако для более длинных субстратов с 10 остатками глутамина он увеличивает скорость гидролиза как 20S, так и 26S протеасомой. Таким образом, гибридные комплексы состава 19S-20S-11S могут эффективно расщеплять субстраты достаточной длины, даже если они имеют в своем составе олигоглутаминовый фрагмент.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-01446.

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО КАТЕПСИНА L ИЗ КИШЕЧНИКА ЖУКА-КОЖЕЕДА *DERMESTES MACULATUS*

С.В. Пантелеев, Е.Н. Калиберда, Т.В. Бобик, Л.Д. Румш

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

В результате исследований пищеварительных ферментов *D. maculatus* в лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ был обнаружен цистеинзависимый протеолитический фермент – катепсин L (Cathepsin L, Cat L). Подобный фермент был обнаружен в кишечнике *Tenebrio molitor* (P.T. Cristofoletti, 2005) в виде как внутриклеточного, так и секретируемого фермента, экспрессируемого в форме препрофермента и способного к активации в кислых условиях. Позже был получен рекомбинантный катепсин L *Tenebrio molitor* и установлена его 3D структура (D. Beton, 2012). Целью данной работы было получить и очистить рекомбинантный катепсин L (rCatL) и оценить его ферментативные свойства. Рекомбинантный белок был экспрессирован на платформе *E. coli* штаммов DE3 и Rosetta в формах препрофермента (full-rCatL) и двух зрелых ферментов: C-rCatL и CHis-rCatL. Последовательности full-rCatL и C-rCatL включали 2 эпитопа (3FLAG, c-myc) и 6 гистидинов на С-конце белка. Для оценки влияния эпитопов на фермент был получен белок CHis-rCatL без эпитопов, но с 6 гистидинами на С-конце. Рекомбинантные белки были очищены методом металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-agarose. Наличие целевого белка в процессе получения и очистки подтвердили электрофорезом в 10% ПААГ, антителами к эпитопам full-rCatL и C-rCatL, к 6 гистидинам CHis-rCatL после переноса этих белков по Вестерну и их масс-спектрометрией. Методом Вестерн-блота была подтверждена способность препрофермента full-rCatL активироваться при кислых условиях (pH 4). Удельная активность фермента (субстрат Z-A-F-R-pNA, 1мМ DTT, оптимальные условия: pH 5, 37°C), полученного в разных клетках составила для full-rCatL (после рефолдинга при pH 4), CHis-rCatL и C-rCatL: в DE3 не выше 3.72 нмоль/мг×мин, Rosetta – до 22.3 нмоль/мг×мин. Таким образом, были получены и очищены препро- и зрелая формы рекомбинантного катепсина L, а их ферментативные свойства проанализированы.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ПАПАИН-ПОДОБНОЙ ЦИСТЕИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ПШЕНИЦЫ ТРИТИКАИНА-α, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЕГО СПЕЦИФИЧНОСТЬ

А.И. Петушкова[1], А.В. Головин[2], Н.В. Гороховец[3], А.О. Залевский[2], Е.Ю. Зерний[4], Н.В. Кузнецова[3], В.А. Макаров[3], Л.В. Савватеева[3], А.А. Замятнин (мл.)[3,4]

[1]Биологический факультет и [2]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Институт молекулярной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова; [4]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Тритикаин-α – папаин-подобная цистеиновая протеиназа пшеницы (*Triticum aestivum* L). Как и большинство протеолитических ферментов, Тритикаин-α транслируется в форме профермента, аутокаталитическая активация которого приводит к созреванию активной протеиназы, проявляющей выраженные глютеназную и коллагеназную активности при низких значениях pH. Анализ сайтов расщепления глютена и коллагена при помощи Тритикаина-α выявил, что, как и у других папаин-подобных цистеиновых протеиназ растений, субстратная специфичность Тритикаина-α определяется наличием гидрофобной аминокислоты в P2 положении субстрата. Однако проведенное сравнительное исследование кинетики расщепления флуорогенных пептидных субстратов при помощи Тритикаина-α, папаина и бромелаина, выявило существенные различия в эффективности расщепления субстратов этими ферментами, которые можно объяснить различной субстратной специфичностью ферментов. Сравнение полученных с помощью методов гомологичного моделирования структур протеиназных доменов Тритикаина-α и бромелаина с пространственной структурой папаина позволило выявить принципиальные различия в структурах S1 и S4 участков связывания ферментов. Наличие таких отличительных особенностей у активных центров Тритикаина-α, бромелаина и папаина хорошо объясняет различия в субстратных специфичностях ферментов, наблюдаемые нами ранее. Таким образом, можно заключить, что у папаин-подобных цистеиновых протеиназ растений в дополнение к определяющему специфичность участку связывания S2 имеются участки связывания S1 и S4, также вносящие свой вклад в определение субстратной специфичности ферментов. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-10410).*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ К ИНГИБИТОРАМ ИНТЕГРАЗ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ СУБТИПОВ ВИЧ-1: A, B И CRF63_021A

М.А. Пустоварова[1], Ю.Ю. Агапкина[1], В.В. Ивлев[2], Д.П. Зырянова[2], Е.С. Стародубова[3], А.В. Тотменин[2], Н.М. Гашникова[2], М.Г. Исагулянц[3], М.Б. Готтих[4]

[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Новосибирск; [3]Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва; [4]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Интеграза вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) является одним из ключевых ферментов вируса и представляет собой привлекательную мишень для создания препаратов, направленных на подавление развития ВИЧ. Она катализирует две последовательные реакции: 3'-процессинг – отщепление динуклеотида GT с 3'-конца вирусной ДНК и перенос цепи – последующее встраивание процессированной вирусной ДНК в клеточную. Известно, что особенности репликативного цикла ВИЧ способствуют увеличению его генетического разнообразия за счет естественного полиморфизма и развитию лекарственной устойчивости вируса. Замены в участке гена pol, кодирующем интегразу, могут приводить к изменению ее чувствительности к ингибиторам. Это обуславливает важность изучения структурно-функциональных особенностей препаратов интегразы разных субтипов ВИЧ-1. На территории Российской Федерации наиболее распространены субтипы A и B, а также новые рекомбинантные формы, одной из которых является довольно широко распространенная форма CRF63_021A. В настоящей работе были получены консенсусные последовательности интеграз субтипов A, B и CRF63_021A, соответствующие белки были выделены в бактериальной системе и очищены с помощью аффинной хроматографии. Каталитическая активность всех ферментов была охарактеризована в обеих реакциях, катализируемых интегразой. Определены начальные скорости 3'-процессинга, проанализированы профили интеграции и охарактеризована чувствительность к ралтегравиру - ингибитору интегразы, который применяется в терапии ВИЧ-1 в РФ. Кроме того, получены ферменты, содержащие основные мутации устойчивости к ральтегравиру, выявленные у пациентов, инфицированных субтипами ВИЧ, характерными для разных регионов мира. Исследуемые интегразы, содержащие мутации устойчивости, также были охарактеризованы. Учитывая, что сниженная мутациями лекарственной устойчивости активность рекомбинантной интегразы обычно соответствует пониженной репликативной способности мутантного вируса, можно ожидать появления и закрепления лекарственно устойчивых субтипов A, B и CRF63_021A, несущих первичную мутацию Q148K и компенсаторные мутации E138K и/или G140S. *Работа поддержана грантами Российского научного фонда № 16-15-10238 (интеграза субтипа CRF63_021A) и № 15-15-30039 (интеграза субтипов A и B).*

МЕТИЛЗАВИСИМЫЕ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ DNMT3A

А.В. Сергеев, О.В. Кирсанова, Е.С. Громова

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

Метилирование ДНК по CpG-участкам играет важную роль в регуляции экспрессии генов, дифференциации клеток, геномном импринтинге и других клеточных процессах. ДНК-метилтрансфераза (МТаза) Dnmt3a является одним из главных ферментов, устанавливающим «рисунок» метилирования ДНК в клетках эукариот. Разработан новый метод определения активности МТазы мыши Dnmt3a *in vitro* с использованием недавно охарактеризованных [1] метилзависимых (МЗ) эндонуклеаз рестрикции, специфически расщепляющих метилированную ДНК. Суть метода состоит в последовательном проведении реакций метилирования МТазой Dnmt3a и расщепления МЗ-эндонуклеазами специально сконструированных ДНК-субстратов с последующим анализом продуктов расщепления в денатурирующем полиакриламидном геле по флуоресцентной метке. Были изучены МЗ-эндонуклеазы KroI и PcsI, а также для сравнения и контроля традиционная эндонуклеаза Hin6I, которая не расщепляет метилированную ДНК. Наиболее перспективной оказалась МЗ-эндонуклеаза PcsI, которая в своем участке узнавания содержит две последовательности CpG, разделенные семью парами нуклеотидов, что примерно соответ-

ствует расстоянию между активными центрами в каталитически активном тетрамере Dnmt3a. Был создан ДНК-субстрат для тестирования активности Dnmt3a с двумя CpG на указанном расстоянии. В обе последовательности CpG предварительно ввели по одной метильной группе в противоположные цепи в соответствии с необходимым для метилирования расположением цитозинов-мишеней в комплексе Dnmt3a с ДНК. МЗ-эндонуклеаза KroI может иметь лишь ограниченное применение для определения активности Dnmt3a ввиду неполного расщепления метилированного субстрата. В отличие от традиционных методов определения активности МТаз, основанных на использовании радиоактивно меченного S-аденозил-L-метионина, данный метод является надежным, простым в исполнении и недорогим. В перспективе имеется принципиальная возможность одновременного использования МТазы и эндонуклеазы, что может быть осуществлено в ходе дальнейшей оптимизации метода. *Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-01087.*

Литература

1. Землянская Е.В., Дегтярев С.Х. 2013. Субстратная специфичность и свойства метилзависимых сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз. Молекуляр. биология. 47, 900-913.

РЕКОМБИНАНТНАЯ DPP 4 *TENEBRIO MOLITOR*: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И СПОСОБНОСТЬ ГИДРОЛИЗОВАТЬ ТОКСИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ ГЛИАДИНОВ

В.Ф. Терещенкова[1], Е.В. Клячко[2], С.В. Беневоленский[2], М.А. Белозерский[3], Я.Е. Дунаевский[3], И.Ю. Филиппова[1], Е.Н. Элпидина[3]
[1]Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова; [2]Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН; [3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Tenebrio molitor – вредитель запасов зерновых культур. Его основными пищевыми белками являются глиадины - главные запасные белки семян пшеницы. В состав глиадинов входят до 30% остатков пролина и до 50% остатков глутамина. Это обусловливает наличие пролин-специфичных пептидаз (PSP) в комплексе пищеварительных ферментов *T. molitor*. Среди них главной пищеварительной PSP является дипептидилпептидаза 4 (DPP 4), которая входит в состав подсемейства S9B серино-вых пептидаз по классификации MEROPS. DPP 4 отщепляет Xaa-Pro дипептиды от N-конца пептидной цепи любой длины, тем самым участвуя в деградации и регуляции активности пролин-содержащих белков и пептидов. В экспрессионной системе *Pichia pastoris* нами впервые получен рекомбинантный препарат DPP 4 *T. molitor* (rTmDPP4). Выход белка после очистки с использованием аффинной хроматографии на Ni^{2+}-NTA сефарозе составил 44 мг/л. Для очищенного препарата rTmDPP4 изучена электрофоретическая подвижность в нативных и денатурирующих условиях, последовательность фермента подтверждена масс-спектрометрически и совпадает с первичной структурой наиболее высокоэкспрессируемой пищеварительной DPP 4 *T. molior*. Показано, что оптимум работы фермента находится в области pH 8, интервал pH-стабильности - от 6 до 9. Проведено сравнительное изучение субстратной специфичности rTmDPP4 и рекомбинантной DPP 4 человека. На примере гидролиза дипептидных субстратов общей формулы Xaa-Pro-pNA (Xaa = Arg, Ala, Gly; pNA – остаток *пара*-нитроанилина) выявлена предпочтительность rTmDPP4 к Arg-содержащему субстрату, тогда как эффективность расщепления всех исследованных субстратов рекомбинантным ферментом человека одинакова. Впервые обнаружена способность rTmDPP4 гидролизовать фрагменты токсических пептидов глиадинов. С использованием 10-членного пролин- и глутаминсодержащего пептида показана большая эффективность его гидролиза rTmDPP4, чем рекомбинантной DPP 4 человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ совместно с Фондом «Национальное интеллектуальное развитие»: 17-34-80158 мол_эв_а; грантов РФФИ: 16-34-01012 мол_а, 15-04-08689-а, 15-03-06675-а; гранта Фонда содействия инновациям (FASIE): УМНИК 8874ГУ/2015 (0018984).

НОВЫЙ ИНГИБИТОР ТЕРМОЛИЗИНПОДОБНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ

К.Н. Чухонцева, И.С. Лемескина, Д.Р. Сафина, И.В. Демидюк
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Термолизинподобные протеазы – семейство протеолитических ферментов, представители которого широко распространены у эу- и архебактерий, а также встречаются у грибов. Семейство включает две группы. Представители первой близки к термолизину и, по-видимому, выполняют преимущественно трофические функции. Прототипом второй группы является протеализин – металлопротеаза бактерии *Serratia proteamaculans*. Многие микроорганизмы, продуцирующие протеализинподобные протеазы (ППП), являются симбионтами или патогенами растений и животных, некоторые – способны вызывать заболевания человека. Имеющиеся данные указывают на участие ППП во взаимодействии бактерий с высшими организмами, однако биологические функции этих ферментов изучены мало. Нами проведен анализ геномов микроорганизмов, продуцирующих ППП, и обнаружено, что во всех бактериальных геномах за геном ППП следует ген небольшого консервативного гипотетического белка – белка, ассоциированного с протеализином (БАП). Детальный анализ областей геномов, в которых локализованы гены ППП и белков, подобных БАП, показал, что эти гены организованы в оперон. Таким образом, ППП и ассоциированные с ними белки, по-видимому, выполняют общую функцию. Для характеристики БАП нами в клетках *E. coli* получен рекомбинантный белок из *S. proteamaculans* и впервые показано, что БАП является эффективным ингибитором протеализина: константа связывания, определённая с помощью изотермической калориметрии титрования, составляет 2×10^7 M^{-1}. Также было установлено, что БАП способен ингибировать термолизин. Кроме того, с использованием метода иммуноблоттинга было продемонстрировано, что в *S. proteamaculans* БАП имеет внутриклеточную локализацию. Таким образом, нами впервые установлено, что гены ППП у бактерий входят в состав операнов, включающих также гены новых ингибиторов термолизинподобных протеаз. Полученные результаты, по-видимому, указывают на существование неизвестного механизма регуляции активности ППП бактериальной клеткой.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-01048.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ 14,17,19-ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЛАНОСТЕРОЛА СО СТЕРИН-14А-ДЕМЕТИЛАЗОЙ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ НОЗОКОМИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ

Т.В. Шкель[1], С.А. Усанов[1], А.В. Барановский[1], Г.Ю. Чернов[1], М.А. Черновецкий[2], В.А. Стоник[3], Л.А. Калужский[4], А.С. Иванов[4], А.А. Гилеп[1]

[1]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; [2]РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минский р-н, Беларусь; [3]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия; [4]НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Цитохром Р450 стерол-14α-деметилаза (CYP51) участвует в биосинтезе эргостерола и является главной мишенью для противогрибковых препаратов класса азолов. Одним из механизмов устойчивости к данным препаратам является изменение сродства фермента к азольным соединениям, вызванное аминокислотными заменами. Нами проведено молекулярное клонирование стерол-14α-деметилаз резистентных штаммов патогенных грибов, выделенных из клинических образцов биологического материала от пациентов с сопутствующими грибковыми инфекциями на фоне основной онкологической и гематологической патологии (*C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kruzei*). В CYP51 *C. albicans* были обнаружены четыре новые аминокислотные замены - K179E; L224I; G307C; M372T. В CYP51 *C. guilliermondii* была идентифицирована одна новая аминокислотная замена C37W. В CYP51 *C. glabrata* были обнаружены две новые аминокислотные замены - S440C и G450D. Для оценки влияния мутаций у разных видов патогенных грибов на чувствительность к азольным фунгицидам и на выполняемые ферментами функции нами были экспрессированы в *E.coli* и очищены мутантные формы CYP51 *C. albicans u C. glabrata*, а также проведены спектральные исследования лиганд-связывающих свойств данных ферментов с соединениями азолового ряда (лекарственными средствами и пестицидами). Наши экспериментальные данные для мутантной формы CYP51 *C. albicans* K179E_L224I_G307C_M372T выявили отсутствие связывания фермента с флуконазолом и вориконазолом, что указывает на ассоциацию данных замен с развитием резистентности к азолам. CYP51 *C. glabrata* проявляет достаточно высокое сродство к азольным препаратам, что может быть объяснено другими механизмами возникновения резистентности, не связанными с CYP51. В качестве потенциальных лигандов CYP51 грибов нами также были протестированы уникальные окисленные стероидные соединения, выделенные из морских звезд, растений (которые были предварительно исследованы в экспериментах на биосенсоре) и 14,17,19-замещенные производные ланостерола. Высокое сродство к ферментам некоторых из рассматриваемых соединений побуждает нас к их дальнейшему изучению в качестве потенциальных и селективных ингибиторов стерол 14α-деметилаз патогенных грибов.

УЧАСТИЕ БЕЗ ДОКЛАДА

Nutlin-3a И RG-7112: ВЛИЯНИЕ НА p53-ЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

А.Х. Валиуллина, М.О. Гомзикова, Е.Е. Гаранина, А.А. Ризванов, Э.Р. Булатов

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Транскрипционный фактор p53 играет одну из ключевых ролей в регуляции клеточного цикла, метаболизма, апоптоза, репарации ДНК и ангиогенеза. Примерно в половине случаев инактивация p53 вызвана сверхэкспрессией его негативного регулятора – убиквитин-лигазы MDM2. В связи с этим, один из основных подходов по активации p53 основан на селективном ингибировании MDM2 при помощи низкомолекулярных соединений. В литературе описано значительное число работ по ингибированию MDM2, которое приводит к активации p53 и индуцирует p53-опосредованные молекулярные процессы, в первую очередь, в опухолевых клетках. Однако, в настоящее время спектр потенциального применения ингибиторов MDM2 не ограничивается лишь онкологией, а включает также нейродегенеративные и аутоиммунные заболевания. Поэтому важной и актуальной задачей является изучение действия ингибиторов MDM2 на молекулярные и клеточные процессы в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) человека. В представленной работе для активации p53 в МКПК использовались высоко-селективные ингибиторы MDM2, а именно Nutlin-3a и RG-7112. Для получения данных применялся набор молекулярно-биологических методов, в частности, колориметрический MTS-тест для оценки метаболической активности клеток под действием соединений, иммуноблоттинг для количественного анализа изменения уровня белка p53, ПЦР в реальном времени по технологии Taqman для количественного определения уровня экспрессии p53-зависимых генов, проточная цитофлуориметрия для оценки распределения субпопуляций МКПК. Определена цитотоксичность Nutlin-3a и RG-7112 на МКПК в диапазоне концентраций 0.001-100 мкМ при инкубировании в течение 24, 48, 72 часов. Показано, что повышение концентрации соединений проводит к росту уровня белка p53 в клетках. Продемонстрировано, что в Nutlin-3a оказывает более существенное влияние на экспрессию генов p21, Mdm2, Puma, Bax, по сравнению с RG-7112. При этом, ни Nutlin-3a, ни RG-7112 не оказали заметного влияния на экспрессию Bcl2. Таким образом, селективные ингибиторы MDM2, в частности Nutlin-3a и RG-7112, могут применяться для регуляции p53-опосредованных процессов в МКПК. *Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 16-34-60213 мол_а_дк.*

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛАККАЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ: ОКИСЛЕНИЕ ЛИГНАНОВ И МОДЕЛЬНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

О.А. Глазунова[1], Н.А. Трушкин[2], Е.А. Михантьева[2], Т.В. Федорова[1]

[1]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; [2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Лакказы (К.Ф. 1.10.3.2.) являются медь-содержащими оксидазами, которые катализируют одноэлектронное окисление субстрата с сопутствующим четырехэлектронным восстановлением молекулы кислорода до воды. Субстратная специфичность лакказ очень широка, они способны окислять разнообразные фенольные соединения, а также ряд нефенольных соединений. Известны лакказы, выделенные из растений, грибов, насекомых и бактерий, однако наиболее перспективными для промышленного применения являются лакказы базидиомицетов, обладающие высоким значением окислительно-восстановительного потенциала (ОВП). В нашей работе исследовались четыре лакказы базидиомицетов *Antrodiella faginea*

(AfL), *Steccherinum murashkinskyi* (SmL), *Coriolopsis caperata* (CcL) и *Trametes hirsuta* (ThL), для которых ранее были получены пространственные структуры. Для оценки субстратной специфичности было исследовано окисление 21 субстрата фенольной природы, а также 4 красителей, определены каталитические константы окисления лигнанов и лигнаноподобных соединений: пинорезинола, секоизоларицирезинола, секоизоларицирезинола-дигликозида, этопозида и мангиферина. Все лакказы окисляли практически все исследованные субстраты. Исключение составила лакказа SmL, не окислявшая м-кумаровую кислоту. Лакказы AfL и SmL значительно медленнее окисляли изомеры кумаровой кислоты, а также орцинол и ванильную кислоту, нежели ThL и CcL, что может быть связано с более низким значением ОВП этих лакказ. В случае окисления красителей - индигокармина, конго красного и фенолового красного наиболее эффективными оказались лакказы ThL и CcL, обладающие самым высоким ОВП среди исследованных лакказ. Аналогичная ситуация наблюдалась для окисления лигнанов. Наибольшую эффективность окисления проявили ThL и CcL, исключение составил мангиферин, который наиболее эффективно окисляла AfL. Причем эффективность катализа напрямую зависела от величины константы Михаэлиса, которая была значительно ниже в случае ThL и CcL для всех субстратов, кроме мангиферина. Это дает основания предположить, что в случае крупных субстратов определяющую роль в эффективности катализа играет не только ОВП, но и пространственная структура петель, образующих субстрат-связывающий карман. *Работа поддержана грантом РФФИ 16-34-01355-мол_а.*

ДУАЛИСТИЧНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ГИДРОПЕРОКСИДЛИАЗЫ/ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ ПОДСЕМЕЙСТВА CYP74C

С.С. Горина, Е.К. Бессолицына, Е.О. Смирнова, В.С. Фатыхова, Т.М. Ильина, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин
Казанский институт биохимии и биофизики, Казань, Россия

Ферменты клана CYP74 принадлежат к суперсемейству цитохромов P450. В состав клана CYP74 входят алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). Объектами данного исследования являются шесть предполагаемых ГПЛ подсемейства CYP74C: CYP74C4_ST (*Solanum tuberosum*), CYP74C2 (*Cucumis melo*), CYP74C31 (*Cucumis sativus*), and CYP74C13_MT (*Medicago truncatula*). Все рекомбинантные ферменты в зависимости от используемого субстрата наряду с продуктами ГПЛ продуцируют продукты ЭАС. Ферменты CYP74C4_ST, CYP74C2, CYP74C31 и CYP74C13_MT, в основном, участвуют в биосинтезе продуктов ГПЛ из 13-гидроперекиси линолевой кислоты, тогда как CYP74C13_GM производит сопоставимые количества продуктов 13-ГПЛ и 13-ЭАС, а CYP74C1_CS обладает преимущественно активностью 13-ЭАС. Большинство ферментов преобразуют гидроперекись альфа-линоленовой кислоты в продукты 13-ГПЛ. Все ферменты по отношению к 9-гидроперекисям обладают преимущественно 9-ЭАС активностью. Продукты идентифицировали по данным ГХ-МС и ЯМР. Кроме того, были получены мутантные формы с заменами в каталитически важных доменах (I-спираль, «F/L toggle»), которые проявляли частичную или практически полную активность АОС. Таким образом, результаты настоящей работы демонстрируют, что описанные ранее 9/13-ГПЛ подсемейства CYP74C помимо ГПЛ активности обладают активностью ЭАС. В зависимости от субстрата эти ферменты участвуют в образовании продуктов, которые в основном относятся к продуктам ГПЛ и ЭАС. Кроме того, в настоящем исследовании впервые проведено превращение бифункциональных ферментов ГПЛ/ЭАС в АОС путем сайт-направленного мутагенеза. Исследования ферментов CYP74C13_MT и CYP74C13_GM проводились при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10286). *Исследования ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 были поддержаны грантом РФФИ 16-34-60231-мол_а_дк. Исследования фермента CYP74C4_ST проводились при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-10022). Исследования фермента CYP74C2 были поддержаны грантом МК-2873.2017.4. Эксперименты по сайт-направленному мутагенезу CYP74C31 были поддержаны грантом РФФИ 15-04-04108_а. Эксперименты по сайт-направленному мутагенезу фермента CYP74C1_CS были поддержаны грантом РФФИ 15-04-08310_а.*

Fo·F1 ПРОТОН-ТРАНСЛОЦИРУЮЩАЯ АТРАЗА/СИНТАЗА: НОВЫЙ АСПЕКТ ОДНОНАПРАВЛЕННОЙ РАБОТЫ

Т.В. Жарова, А.Д. Виноградов
Кафедра биохимии, Биологический факультет, Московский государственный университет, Москва, Россия

Fo·F1 протон- (или Na^+-) транслоцирующая АТР синтетаза/гидролаза – хемо-электро-механическая наномашина, обеспечивающая синтез или гидролиз АТР мембранами митохондрий, микроорганизмов и хлоропластов растений. Атомная структура Fo·F1 из нескольких объектов установлена и ставшая канонической модель работающего как вращательный «мотор» фермента вошла в учебники биохимии. Этот «мотор» построен из 9–10 разных субъединиц, каждой из которых приписывается определенная функция для обеспечения его обратимой работы. Ранее опубликованные нашей группой результаты противоречат представлению об обратимом функционировании фермента [1–2]. Для дальнейшего обоснования и развития нашей точки зрения мы воспользовались уникальным объектом – прочно сопряженными везикулами, образованными «вывернутой» (inside-out) плазматической мембраной прокариота *Paracoccus denitrificans*, способного катализировать синтез или гидролиз АТР с соизмеримыми скоростями [3–4]. Мы показали, что закисление среды блокирует АТР-азную активность Fo·F1 везикул, не влияя на их АТР-синтетазную активность. Такое однонаправленное влияние pH не может быть объяснено качественными или количественными различиями интермедиатов прямой и обратной реакций, катализируемых одним и тем же ферментом. Вентурицидин – специфический ингибитор протонного канала Fo·F1 неконкурентно тормозит его активность в одном (синтез АТР) и противоположном (гидролиз АТР) направлении катализа с существенно различающимся сродством к ферменту. Полученные результаты, вместе с опубликованными ранее [1–2], позволяют нам предположить, что энергосопрягающие мембраны содержат две различные молекулярные изоформы Fo·F1: одна, катализирующая синтез, а другая гидролиз АТР. Различия между ними может быть обусловлено как разной структурной организацией субъединиц в составе этих изоформ, так и разным (количественно и качественно) составом, ассоциированных с изоформами фосфолипидов, необходимых для их активностей.

Литература

1. A.V.Syroeshkin, E.A.Vasilyeva, A.D. Vinogradov, FEBS Lett., 366 (1995) 29-32.
2. A.D. Vinogradov, J. Exp. Biol. 203 (2000) 41-49.
3. T.V. Zharova, A.D. Vinogradov, Biochemistry (Mosc) 77 (2012) 1000-1007.
4. T.V. Zharova, A.D. Vinogradov, Biochim. Biophys. Acta 1837 (2014) 1322-1329.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ ФОСФОЛИПИДНОГО БИСЛОЯ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ДЛЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

З.М. Ишкова, А.В. Кареева, В.Г. Гривенникова, А.Д. Виноградов
Кафедра биохимии, Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Перекись водорода – продукт и субстрат многих ферментативных реакций, локализованных в разных органеллах клеток эукариот. Для оценки стационарных концентраций перекиси водорода в клеточных органеллах необходимо знать не только скорости ее образования и распада, но и способность проникать через мембраны. Относительно недавно в литературе появились сведения о том, что некоторые клеточные органеллы ограниченно проницаемы для перекиси водорода, что приводит к возникновению градиентов ее концентрации между отдельными клеточными структурами [1–2]. Обладает ли фосфолипидный бислой мембран митохондрий таким свойством, неизвестно, хотя недавно мы получили указания на ограниченную проницаемость митохондриальных мембран для перекиси водорода [3]. В качестве модельной системы мы использовали липосомы, приготовленные из суммарной фракции фосфолипидов митохондрий сердца быка и содержащие во внутреннем пространстве фермент каталазу. Каталазная активность таких липосом линейно зависела от концентрации добавленной перекиси (0–12 мМ) и примерно в два раза стимулировалась после их разрушения холатом натрия. Эта стимуляция не была обусловлена сорбцией фермента на поверхности липосом, а была следствием ограниченной проницаемости перекиси через фосфолипидный бислой. Каталазная активность внутрилипосомального и растворимого фермента не зависела от температуры в диапазоне 10–40°C. Мы предполагаем, что для быстрого переноса перекиси водорода через мембрану необходимо, чтобы фосфолипиды находились в жидкокристаллическом состоянии. Каталазная активность интактных митохондрий сердца линейно зависела от концентрации добавленной перекиси водорода (0–12 мМ). Каналообразующий антибиотик аламетицин, создающий свободную проницаемость мембраны митохондрий для низкомолекулярных соединений [4], повышал каталазную активность в 2–3 раза. Полученные результаты указывают на то, что как искусственные фосфолипидные, так и природные мембраны митохондрий ограниченно проницаемы для перекиси водорода.

Литература

1. F. Antunes, E. Cadenas (2000) FEBS Lett. 475, 121–126.
2. G.P. Bienert et al. (2007) J. Biol. Chem. 282, 1183–1192.
3. Grivennikova V.G., Kareyeva A.V., Vinogradov A.D. (2010) Biochim. Biophys. Acta. 1797, 939-944.
4. I.S. Gostimskaya et al. (2003) Anal. Biochem. 313, 46–52.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И РЫБ В МОДЕЛИРУЕМЫХ ГИПОМАГНИТНЫХ УСЛОВИЯХ

Н.П. Канцерова[1], В.В. Крылов[2], Л.А. Лысенко[1], Н.Н. Немова[1]
[1]Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск; [2]Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок, Ярославская обл., Россия

Геомагнитное поле (ГМП) – важный экологический фактор, сопутствующий эволюции жизни на Земле. Параметры ГМП варьировали в разные периоды геологической истории, в том числе наблюдалось его существенное ослабление. К настоящему моменту установлено, что при существенном ослаблении ГМП (нулевом магнитном поле или гипомагнитных условиях) изменяются различные поведенческие, морфологические, физиологические и биохимические параметры растительных и животных организмов. Ранее мы показали, что моделируемые гипомагнитные условия влияют на уровень активности кальцийзависимых протеиназ семейства кальпаинов в тканях беспозвоночных и рыб и *in vitro*. В продолжение серии экспериментов по установлению механизмов действия ослабления ГМП на биохимию клетки, в настоящей работе было изучено различное по продолжительности воздействие гипомагнитных условий на кальцийзависимые протеиназы, а также на протеасому – нелизосомальные системы внутриклеточного протеолиза. Установлено, что влияние гипомагнитных условий на кальпаины прудовика, дафнии, плотвы, карася заключается в значительном снижении уровня их активности. Минимальный период, за который развивается биологический эффект исследуемого физического фактора, составляет 30 мин. Продолжительное воздействие нулевого магнитного поля (1–3 сут.) приводит к постепенной элиминации эффектов, наблюдающихся при кратковременных экспозициях. Интересно отметить, что кратковременное воздействие гипомагнитных условий вызвало разнонаправленное изменение активности протеасомы в скелетных мышцах плотвы и мягком теле прудовика, тогда как воздействие в течение суток не привело к изменению активности указанной протеиназы у исследованных организмов. Полученные результаты важны для понимания роли ГМП как фактора естественной среды обитания и эволюции жизни на Земле, а также существенно дополняют сведения о биологии протеолитических систем цитозоля клетки. *Финансирование исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0033 и при поддержке гранта Президента РФ МК-4737.2016.4.*

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ ДИНАМИЧЕСКИХ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ С РЯДОМ ФЕРМЕНТОВ В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ РОСТА *E. COLI*

С.А. Курилова[1], В.А. Анашкин[1], Н.Н. Воробьева[2], Е.В. Родина[2]
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, [2]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Для клеток *E. coli* описано более 40000 бинарных белок-белковых взаимодействий, однако в большинстве случаев не ясно, как влияет образование таких комплексов на свойства участвующих в них белков. С помощью металло-хелатной хроматографии нами идентифицировано несколько белков, взаимодействующих с неорганической пирофосфатазой (PPазой) в стационарной фазе роста клеток E.coli. Это 5-кето-4-дезоксиуронатизомераза (KduI), фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза B (FbaB), глутаматдекарбоксилаза A (GadA) и дигидролипоамиддегидрогеназа (Lpd). Гены этих белков были клонированы, оптимизированы системы их экспрессии и разработаны методы их очистки. Мы обнаружили, что *in vitro* все указанные ферменты способны образовывать между собой бинарные комплексы. Нами была изучена кинетика превращения субстратов этими ферментами *in vitro* в составе бинарных комплексов. Установлено, что образование комплексов почти во всех случаях значительно влияет на активность хотя бы одного из партнеров, причем изменяется в первую очередь максимальная ско-

рость катализируемой реакции. Так, например, для KduI Vmax увеличивается в 3-4 раза в присутствии FbaB, GadA или PPазы, а в комплексе с Lpd Vmax увеличивается на два порядка. Для FbaB Vmax увеличивается в 3 раза под действием GadA. Для Lpd Vmax уменьшается почти вдвое под действием PPазы. GadA аналогично влияет на PPазу. Единственный случай значительного изменения Km при образовании комплексов установлен для FbaB , когда под действием PPазы Km снижалась в 9 раз. Из полученных данных были рассчитаны константы диссоциации бинарных комплексов, которые имеют микромолярные значения, что характерно для динамических белковых комплексов. За исключением PPазы, важнейшего белка энергетического обмена, и GadA, который входит в систему защиты клетки от закисления, активности трех другие белков участвуют в гликолизе; обнаруженное изменение каталитических свойств может играть регуляторную роль при утилизации пищевых источников, доступных в стационарной фазе роста клеток.

АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В УСЛОВИЯХ ДЕСТРУКЦИИ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА У *SOLANUM TUBEROSUM*

Т.И. Пузина, Н.С. Власова, И.Ю. Макеева
Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, Орел, Россия

Имеются данные о вовлечении интактного цитоскелета в пространственную организацию белоксинтезирующего аппарата клеток. Показано, что полирибосомы тесно ассоциированы с микротрубочками и микрофиламентами. Это имеет значение для эффективности процесса трансляции. Однако, практически отсутствуют сведения о связи активности ферментов и структурного состояния цитоскелета. В связи с этим, исследовали активность антиоксидантных ферментов и лактатдегидрогеназы у картофеля в условиях действия деструктурирующего агента тубулинового цитоскелета колхицина. Деструкцию микротрубочек создавали путём опрыскивания растений 1 мМ раствором колхицина (Fluka, Швейцария) через 15 суток после появления всходов. Известно, что колхицин, связываясь с гетеродимером тубулина, предотвращает его полимеризацию и вызывает быструю разборку микротрубочек. Об активности каталазы судили по количеству выделяющегося кислорода, пероксидазы – по времени образования синей окраски в результате окисления бензидина, лактатдегидрогеназы – по скорости уменьшения оптической плотности NADH на спектрофотометре Clima MC-15 (Испания). В условиях фармакологического стресса, вызванного колхицином, выявлено, что каталаза не изменила своей активности, тогда как пероксидаза даже несколько уменьшила её. В литературе имеются данные об участии фитогормонов ауксинов в экспрессии генов антиоксидантных ферментов. Как показали наши предыдущие исследования, колхицин снижал уровень ауксинов. По-видимому, это не способствовало активизации изученных ферментов, нейтрализующих пероксид водорода. В отличие от антиоксидантных ферментов, нарушение целостности тубулинового цитоскелета значительно (в два раза) стимулировало работу лактатдегидрогеназы, участвующей в гликолизе и приводящей к накоплению молочной кислоты, то есть активизации брожения, а не процесса дыхания. Можно заключить, что структурная организация тубулинового цитоскелета имеет значение для проявления ферментативной активности.

ИЗМЕНЕНИЕ КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИИ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА FUS В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА РЕГУЛИРУЕТСЯ АКТИВНОСТЬЮ PARP1 И PARG

А.Ш. Сингатулина[1], Л. Хамон[2], А. Бош[2], М.В. Суханова[1], Д. Пастре[2], О.И. Лаврик[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия; [2]Университет Эври-Валь-де'Эссонна, Эври, Франция

PARP1 является одним из наиболее распространённых представителем семейства поли(ADP-рибоза)полимераз (PARP). PARP1 катализирует синтез поли-ADP-рибозы (PAR), используя NAD+ в качестве субстрата. Каталитическая активность PARP1 индуцируется при связывании с поврежденной ДНК, в результате фермент синтезирует PAR полимер, ковалентно-присоединенный к белку-акцептору. В клетке основной мишенью PARилирования является сама PARP1. Деградация PAR *in vivo* осуществляется за счет ферментативной активности поли(АДФ-рибоза)гликогидролазы (PARG). Полимер PAR имеет отрицательный заряд и может эффективно конкурировать с нуклеиновыми кислотами за связывание с ДНК- и РНК-связывающими белками, и регулировать их функцию. FUS (fused in sarcoma) – мультифункциональный ядерный РНК/ДНК-связывающий белок, участвует в регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции, процессинге транспорте и трансляции РНК. Мы показали, что в условиях окислительного стресса FUS транслоцируется из ядра в цитоплазму и этот процесс зависит от активации PARP1 и повышение базального уровня PAR в ядре. На клетках линии HeLa, подверженных окислительному стрессу, наблюдалось увеличение количества PAR в ядре и транслокация FUS из ядра в цитоплазму. Также проведено сравнение уровня транслокации FUS из ядра в цитоплазму в условиях посттранскрипционного РНК-сайленсинга белков PARP1 или PARG. Обнаружено, что подавление активности, как PARP1, так и PARG, сопровождается снижением уровня транслокация FUS из ядра в цитоплазму. Методом атомно-силовой микроскопии (AFM) мы показали, что FUS связывается с PAR с высоким сродством с образованием высокомолекулярного устойчивого комплекса PAR-FUS. Так же методом AFM установлено, что PARG активность способствует разрушению комплексов FUS с PAR и высвобождению FUS. На основании полученных результатов мы предположили, что связывание с PAR или поли(ADP-рибозил)ирование FUS и активность PARG являются необходимым условием для транслокации белка FUS в цитоплазму при оксидативном стрессе. Таким образом, можно предположить, что существует PAR-зависимый механизм регуляции транскрипции/трансляции при ответе клетки на стресс. *Работа выполнена в рамках проекта: РНФ (14-24-00038) и ПФНИ ГАН (VI.57.1.2, 0309-2016-0001).*

ЦИСТЕИН КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНГИБИТОР АКТИВНОСТИ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ

А.В. Соколов[1,2], В.А. Костевич [1,2], И.Р. Надельсон[1], В.Б. Васильев[1], О.М. Панасенко[2]
[1]Институт экспериментальной медицины, РАМН, Санкт-Петербург; [2]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Миелопероксидаза (МПО) – гем-содержащий фермент азурофильных гранул нейтрофилов участвует в реакциях врожденного иммунитета благодаря способности продуцировать HOCl. Однако хроническое воспаление вследствие чрезвычайной реакционной способности HOCl может приводить к развитию галогенирующего стресса и усугублению таких состояний

как атеросклероз. Поиск эффективных скавенджеров HOCl и ингибиторов активности МПО важен для разработки средств профилактики заболеваний, ассоциированных с воспалением. Ранее при скрининге веществ, снижающих провоспалительное действие модифицированных HOCl липопротеинов низкой плотности, мы обнаружили выраженный ингибирующий эффект цистеина в отношении галогенирующей активности МПО. Оказалось, что помимо очевидной способности цистеина взаимодействовать с HOCl, генерируемой МПО, эта аминокислота напрямую взаимодействует с МПО: согласно данным иммуноферментного анализа и поверхностного плазмонного резонанса. Изучение влияния цистеина на кинетику пероксидазной активности МПО в отношении хромогенного субстрата ABTS показало, что цистеин влияет на сродство МПО как к пероксиду водорода, так и к ABTS. Таким образом, действие цистеина на МПО не ограничивается быстрым взаимодействием с продуктом ее катализа (HOCl), а включает также прямое взаимодействие с ферментом, в том числе его активным центром. *Исследование поддержано грантом РФФИ № 17-04-00530.*

АКТИВНОСТЬ АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СУБПОПУЛЯЦИЯХ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

А.Г. Соловьева
Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр, Нижний Новгород, Россия

Патогенез ожоговой болезни сопровождается развитием эндогенной интоксикации и окислительного стресса, в результате которого образуются токсичные альдегиды. Цель работы – изучение активности и кинетических свойств альдегиддегидрогеназы (АлДГ, КФ1.2.1.3) в субпопуляциях митохондрий печени крыс в ранний период после ожога. Эксперимент проведен на 20 крысах Wistar. Под тиопенталовым наркозом (30 мг/кг) животным наносили ожог пламенем (20%, 45сек). Контроль представлен здоровыми крысами. Активность АлДГ определяли в М1 и М2-митохондриях по Б.М. Кершенгольц и Е.В. Серкиной (1981) через час после ожога. В животной клетке присутствуют «молодые» (менее 1 мкм, М1) и «зрелые» (более 1 мкм, М2) митохондрии (Kurz et al., 1999). Митохондрии получали путем дифференциального центрифугирования (Финдлей, Эванз, 1990). Суспению митохондрий подвергали ступенчатому центрифугированию в градиенте плотности сахарозы (0,8 М; 1,2 М) по Т.Б. Казакову (1969): гранулы, полученные при 600g – М1; при 2300g – М2. Кинетические характеристики АлДГ (Kt, Vmax, Ка) определяли по J. Kostir (1985). Результаты обрабатывали с помощью BIOSTAT. Показано падение удельной активности АлДГ в митохондриях печени крыс с ожогом, которое сопровождалось снижением каталитической эффективности АлДГ в М1 и М2-митохондриях в 2 раза по сравнению со здоровыми крысами. Выявлено, что основная активность АлДГ митохондрий здоровых крыс и животных с ожогом обнаруживается в «зрелых» митохондриях. Общая активность АлДГ в М2-митохондриях в 2 раза выше, чем в М1. При этом основная удельная активность АлДГ приходится на М1-митохондрии, активность которой в 2 раза больше активности АлДГ М2-митохондрий. Д.А. Шишмаков и др. (2004) указывают на меньший диаметр М1-митохондрий по сравнению с М2-митохондриями, следовательно, суммарная поверхность мембран у М1 больше, чем у М2-митохондрий, что должно приводить к большей удельной активности ферментов. Таким образом, выявлены различия каталитических свойств АлДГ в субпопуляциях митохондрий печени крыс при ожоге, что способствует развитию эндогенной интоксикации.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕКРЕТИРУЕМЫХ ПРОТЕИНАЗ БАЦИЛЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

А.О. Тихонова, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Создание эффективных экспрессионных систем является важной задачей биотехнологии. Для получения секретируемых сериновых протеиназ бацилл использовали LIKE систему экспрессии (LIa-Kontrollierte Expression), основанную на индуцируемом промоторе PliaI [Toymentseva et al., 2012]. Систему оптимизировали путем клонирования рекомбинантных сигнальных пептидов. Для оценки эффективности рекомбинантных штаммов необходимо количественное определения белка. Целью работы являлось количественное определение секретируемых протеиназ бацилл с использованием масс-спектрометрического анализа в режиме MRM. Оценка протеолитической активности сериновых протеиназ рекомбинантных штаммов, содержащих оптимизированную LIKE систему экспрессии, показала, что замена сигнального пептида глутамилэндопептидазы на рекомбинантный сигнальный пептид SPYngk способствовала увеличению активности фермента, замена собственного сигнального пептида субтилизиноподобной протеиназы не влияла на активность фермента. Для количественного анализа сериновых протеиназ B. pumilus подобраны протеотипические пептиды: TDTNIGNTVGYR+2y7 – для глутамилэндопептидазы, NAVDTANNR+2y6 – для субтилизиноподобной протеиназы. По результатам MRM анализа сигнальный пептид SPYngk *B. megaterium* способствовал увеличению секреции глутамилэндопептидазы в 20 раз, по сравнению с собственным сигнальным пептидом SPGseBp. Для продукции субтилизиноподобной протеиназы эффективнее оказался собственный сигнальный пептид в составе LIKE системы экспрессии – концентрация ферментов после индукции LIKE-системы увеличилась в 35 раз. *Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-04062).*

ИННОВАЦИОННЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ

Н.Ф. Мясоедов *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

В докладе приводятся результаты исследований по конструированию различных пептидов с определенными физиологическими свойствами. Эти исследования лежат в основе создания пептидов, таких как семакс, селанк, фармакологически важные глипролины, которые в качестве субстанций уже используются в качестве лекарственных препаратов. Разработанный подход позволяет значительно упростить работу по направленному созданию аминокислотной последовательности пептидов. Одной из самых трудных задач при создании лекарств на основе пептидов является выявление молекулярного механизма их действия. Приводятся результаты исследований молекулярных процессов при применении лекарственных препаратов на основе пептидов семакс, селанк. Показано взаимодействие этих пептидов с различными рецепторными системами клеток, в основном, за счет аллостерического взаимодействия, приводящего к изменению ортостерического эндогенного воздействия. Эти изменения приводят к изменению транскриптома и протеома клетки и формированию определенного физиологического ответа. Приводятся результаты исследований клеточных процессов под воздействием семакса и селанка как в норме, так и при различных патологиях, при которых применяются лекарственные препараты на основе этих пептидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» № 01201353020.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕПТИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

С.А. Лимборская *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

В настоящее время пептидные лекарственные препараты, созданные на основе природных регуляторных пептидов и белков, приобретают все большее значение в медицине. Обладая широким спектром клинических эффектов, пептидные препараты являются полифункциональными, способными влиять сразу на несколько биохимических процессов и физиологических функций. Однако до настоящего времени детальный механизм их действия на организм во многом остается неясным. Развитие методов молекулярной биологии, таких как ПЦР в реальном времени, использование микрочипов ДНК, секвенирование РНК (RNAseq), сделало возможным изучение транскрипционной реакции всего генома единовременно. Анализ изменений транскриптомного профиля различных типов клеток и тканей под действием регуляторных пептидов позволяет выявить основные гены-мишени тех или иных пептидных препаратов, определить главные биологические процессы, контролируемые ими, выяснить молекулярно-генетические механизмы их действия на метаболом в норме и при некоторых патологических состояниях. В настоящее время особое внимание уделяется пептидным препаратам, которые способствуют восстановлению работы мозга после таких патологических состояний, как стресс и острое нарушение мозгового кровообращения (инсульт). В докладе будут представлены результаты транскриптомного анализа действия пептидных препаратов на клетки головного мозга в условиях патологии. Сравнительный транскриптомный анализ позволил выявить дифференциально функционирующие гены, сигнальные пути, активируемые ими, а также основные биологические процессы, на которые они воздействуют. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №16-14-00077).*

НООПЕПТ – НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Р.У. Островская *НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия*

Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) - перорально активный дипептид, сконструированный на основании дипептидной стратегии поиска нейротропных препаратов Т.А. Гудашевой. Комплексное поведенческое, электрофизиологическое и нейрохимическое изучение Ноопепта (Н) в эксперименте выявило наличие выраженных когнитотропных и нейропротективных свойств. Эти экспериментальные данные были подтверждены результатами его клинического изучения. В настоящее время Н широко применяется при мягких когнитивных нарушениях цереброваскулярного и посттравматического генеза, при астенических расстройствах и других состояниях с признаками снижения когнитивных функций. Показана способность Н улучшать зрительные функции при глаукоме и тромбозе сетчатки. Что касается механизма действия Н, его ноотропный эффект первоначально связывался со способностью образовывать цикло-пролил-глицин, совпадающий по структуре с эндогенным метаболитом, усиливать экспрессию NGF и BDNF в гиппокампе, повышать эффективность холинергической передачи, а нейропротективный – с нормализующим влиянием на “метаболическую триаду” (накопление свободных радикалов, глютамата, кальция) и улучшением реологических свойств крови. Дальнейшие исследования Н выявили его способность вызывать селективное усиление базальной и индуцируемой гипоксией ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора HIF. Функциональная значимость генов, активируемых этим фактором транскрипции, дает основание рассматривать HIF-позитивный эффект в качестве важного механизма широкого спектра действия этого пролин-содержащего дипептида. На основании выдвинутой гипотезы о сходстве нейрохимических характеристик нейронов и панкреатических β-клеток как предпосылки для поиска новых способов лечения диабета, выполнено изучение Н на стрептозотоциновой модели диабета 2. Выявлен его антигипергликемический эффект, способность восстанавливать содержание инкретина ГПП-1 и инсулина, ослаблять выраженность оксидативного и нитрозативного стресса, устранять дефицит нейротрофических факторов в поджелудочной железе и печени; получены прямые доказательства цитопротективного действия Н в отношении β-клеток. Совокупность полученных данных свидетельствует о целесообразности расширения спектра клинического применения этого пептидного препарата.

ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОПЕПТИДНОЙ КОРРЕКЦИИ КОГНИТИВНЫХ И ПСИХО-ЭМОЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ СИНДРОМЕ ХРОНИЧЕСКОЙ УСТАЛОСТИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ (ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ)

Т.Н. Соллертинская[1], М.В. Шорохов[1], Н.Ф. Мясоедов[2], Л.А. Андреева[2] *[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург; [2]Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

В настоящее время к одним из распространённых и прогрессирующих заболеваний в мире относят синдром хронической усталости (СХУ). При его прогрессировании наблюдается когнитивный дефицит, развитие тревожных и депрессивных состояний. В клинике для компенсации нарушенных функций мозга большую роль отводят пептидным биорегуляторам (ПБ) Семаксу (Сем), Селанку (Сел). В настоящее время синтезирован новый нейропротектор АКТГ6-9, экспериментально не изученный. Экспериментальные данные по исследованию Сем и Сел в компенсации СХУ единичны. В 20^14–20^16 годах нами на приматах разработана экспериментальная модель СХУ. Целью настоящей работы является изучение сравнительной роли Сем, Сел и АКТГ6-9 в церебропротективном действии на амнестические, тревожные и депрессивные расстройства у грызунов и приматов. Эксперименты проведены в условиях свободного поведения, специальном станке (грызуны) и приматологическом кресле (приматы) с мультипараметрической компьютерной регистрацией, видеомониторингом и анализом объективных показателей ВНД: (ЭЭГ, вегетативных). Сем, Сел и АКТГ6-9 вводили внутримышечно и интраназально. У грызунов влияние ПБ более выражено на врождённые формы поведения. При СХУ значительные изменения имеют, место по показателям ЭЭГ лимбического мозга (гиппокамп и амигдала), а также кардиоваскулярной системы. Антиамнестическое влияние Сем, Сел и АКТГ6-9 кратковременно. Дифференциация их компенсаторных эффектов проявляется как выраженная тенденция. У крыс при наличии тревожно-депрессивного состояния Сел осуществлял анксиолитический эффект. Сем и АКТГ6-9 показывают антидепрессивное действие. У приматов антиамнестическое влияние Сем, Сел и АКТГ6-9 носит дифференцированный характер. Церебропротективное действие Сел длительно, проявляется на все виды памяти. У обезьян Сел обладает антиэпилептическим и противотревожным действием. Полная компенсация когнитивного дефицита и психо-эмоциональных нарушений по анализу ЭЭГ имеет место на 3-е сутки после введения Сел. Церебропротективные эффекты препарата на тревожные расстройства особенно выражены по ЭЭГ показателям левого полушария. Сем обладает кардиотропным и антигипоксическим спектром действия. АКТГ6-9 у обезьян снимает тревожное состояние по показателям ВНД и поведения, обладает выраженным антидепрессивным действием.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ И АНАЛЬГЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПЕПТИДА GLY-HIS-LYS (GHK) И ЕГО СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ

И.И. Бобынцев, О.И. Сороколетова, А.Е. Белых *Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия*

Учитывая полифункциональный характер биологических эффектов регуляторных пептидов, а также их важную роль в формировании реакций тревожности и болевого поведения, целью данного исследования являлось изучение анальгетических и анксиолитических эффектов пептида GHK и его структурных аналогов. В работе использовали пептид Gly-His-Lys (GHK) и его модифицированные аналоги Gly-His-D-Lys, D-Ala-Gly-His-Lys и Gly-His-Lys-D-Ala. Пептиды вводили внутрибрюшинно за ^{12} мин до начала исследования в дозах 0,5, 5 и 50 мкг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора. Анксиолитическая активность исследована на крысах-самцах Вистар с использованием модели приподнятого крестообразного лабиринта, анальгетические эффекты - на мышах-самцах линии BALB/c с использование теста «горячая пластина». Трипептид GHK в дозах 0,5, 5 и 50 мкг/кг оказывал анксиолитическое действие, которое проявлялось увеличением продолжительности нахождения животных в его открытых частях и снижением времени их пребывания в закрытых с наибольшей выраженностью в дозе 0,5 мкг/кг. Замена в молекуле GHK L-лизина на D-лизин вызывала ослабление данных эффектов во всех использованных дозах. Присоединение D-аланина к N- или к C-концу GHK во всех дозах вызывало нивелирование его анксиолитического действия, а при введении в дозе 50 мкг/кг – достоверное усиление ряда показателей тревожности. Трипептид GHK в дозах 0,5; 5 и 50 мкг/кг оказывал анальгетическое действие у мышей, которое проявлялось увеличением продолжительности латентного периода реакции облизывания лап. Замена в природной молекуле пептида L-лизина на D-изомер способствовала снижению выраженности анальгетических эффектов. Присоединение D-аланина к N или C-концу трипептида вызывало инверсию направленности эффекта с анальгетического на алгический. Таким образом, установлены анксиолитические и анальгетические эффекты трипептида GHK. Структурные модификации молекулы GHK с использованием D-изомеров аминокислот на различных концах молекулы оказывают существенное влияние на выраженность и направленность исследованных нейротропных эффектов природной молекулы.

НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ РАЗВИТИЯ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ИНФЕКЦИЙ

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

Примерно треть ежегодной мировой смертности составляют инфекционные заболевания, вызываемые возбудителями – микроорганизмами и вирусами. При этом особую важность имеют так называемые социально значимые инфекции, список которых утвержден Правительством РФ. Среди таких заболеваний – туберкулез, половые инфекции, гепатиты В и С, ВИЧ-инфекция и некоторые другие. Они представляют большую угрозу для нашей страны и человечества в целом, более того, для некоторых заболеваний ситуация усугубляется. Последнее обстоятельство в первую очередь связано с выработкой резистентности к применяемым в терапии препаратам. Проблема резистентности становится центральной в химиотерапии. Предполагается, что к 2050 г. смертность, связанная с резистентностью микроорганизмов к антибиотикам, достигнет 10 млн человек в год, обойдя таковую от рака и уступая лишь сердечно-сосудистым заболеваниям. Аналогичная ситуация характерна и для вирусных инфекций.

В докладе будут приведены данные по современному распространению социально-значимых инфекций, а также основным подходам к созданию новых препаратов для их профилактики и терапии. Основное внимание будет уделено поиску новых мишеней для действия противоинфекционных агентов. Такими мишенями могут быть как не рассматриваемые ранее компоненты возбудителей-, так и физиологически активные соединения, взаимодействующие с компонентами организма

хозяина, вовлеченных в жизненный цикл патогенов. Последний случай представляется особенно перспективным, поскольку против таких препаратов не должно вырабатываться резистентности.

Будут рассмотрены оригинальные работы, ведущиеся в лаборатории докладчика, и касающиеся, с одной стороны, исследований свойств и жизненных циклов инфекционных агентов и, с другой стороны, создания новых синтетических блокаторов туберкулеза, гепатита С и ВИЧ/СПИД,

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

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

Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) – эволюционно древние молекулярные факторы врожденного иммунитета, играющие ключевую роль в защите многоклеточных организмов. АМП обнаружены у позвоночных и беспозвоночных животных, растений, грибов и бактерий. Благодаря своей антимикробной активности природные АМП могут стать прототипами новых антибиотиков широкого спектра действия, которые позволят решить проблему резистентности к известным противомикробным агентам. Наряду с их прямым антимикробным действием АМП могут также играть роль медиаторов иммунной системы и участвовать в регенерации тканей. В этой связи в литературе сосуществуют два термина - «антимикробные пептиды» и «пептиды защиты хозяина», причем последний чаще используется в отношении пептидов, участвующих в регуляции иммунных процессов в организме хозяина. Классификация АМП может основываться на их физико-химических и биологических характеристиках. Наиболее распространенная классификация основана на разделении АМП на три структурные группы. Первая группа включает пептиды, которые принимают преимущественно α-спиральную структуру в гидрофобной среде и при контакте с мембранами или мицеллами детергентов. Вторая объединяет линейные пептиды, которые не образуют α-спиралей и характеризуются повышенным содержанием определенных аминокислотных остатков (Pro, Gly, His, Trp). Пептиды третьей группы отличаются наличием β-складчатых листов. Среди АМП третьей группы обнаружены молекулы с конформацией β-листа, состоящего из трех антипараллельных цепей (большинство дефенсинов позвоночных), или с конформацией β-шпильки, образованной двумя цепями, или со смешанной конформацией, содержащей как β-структуры, так и α-спирали. Небольшие β-шпилечные АМП, стабилизированные дисульфидными связями, представляют особый интерес с точки зрения их практического применения. Их малый размер, жесткая структура, устойчивость к протеазам и множество биологических функций, включая антибактериальные, противогрибковые, противовирусные, противоопухолевые, эндотоксин-связывающие, метаболизм-модулирующие и иммунорегуляторные активности, делают природные β-шпилечные АМП привлекательной основой для молекулярного дизайна инновационных лекарственных средств. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

ДОСТИЖЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ШКОЛЫ БИОХИМИКОВ В ИЗУЧЕНИИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В.Н. Кокряков[1,2], О.В. Шамова[1,2], Г.М. Алешина[1], М.Н. Берлов[1,2], Т.В. Овчинникова[3]
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Исследование структурных и функциональных свойств эндогенных антибиотических пептидов животных в нашей стране было инициировано в середине 1960-х г.г. профессором Ленинградского (Санкт-Петербургского) государственного университета И.П. Ашмариным и направлено на расшифровку молекулярных основ процесса инактивации микроорганизмов при фагоцитозе и воспалении. Антибиотические пептиды (дефенсины, кателицидины и др.) являются важнейшими молекулами иммунной защиты животных. Наши экспериментальные данные подтверждают концепцию о том, что суперсемейство дефенсинов (альфа-, бета- и тета-дефенсины, дефенсины насекомых и других беспозвоночных) составляет наиболее широко распространенную группу антибиотических пептидов. Наши исследования привели к открытию новых бета-дефенсинов в лейкоцитах черепахи (*Emys orbicularis*) и курицы (*Gallus gallus*). В ходе изучения антибиотических молекул обезьян *Macaca mulatta* и *Papio hamadryas* из лейкоцитов крови были выделены несколько представителей семейств альфа- и тета-дефенсинов. Эти данные подтверждают, что суперсемейство дефенсинов – наиболее значимая группа защитных пептидов в эволюции животных. Однако, для некоторых видов животных характерно отсутствие дефенсинов в фагоцитах. Например, мы показали, что целомоциты пескожила *Arenicola marina* (тип *Annelida*) содержат ареницины, которые имеют одну дисульфидную связь в молекуле и принимают конформацию бета-шпильки. Нами открыт антибиотический пептид аурелин медузы *Aurelia aurita* (тип *Cnidaria*), родственный пептидным нейротоксинам. Члены суперсемейства дефенсинов также отсутствуют в лейкоцитах крови свиньи, овцы, козы, собаки. Мы выделили и секвенировали ряд антибиотических пептидов семейства кателицидинов (протегрины и профенины свиньи, бактенецины козы и овцы). Особый тип антибиотических пептидов был обнаружен в лейкоцитах осетровых, эти пептиды, названные нами аципенсинами, являются производными N-концевой области гистона H2A. Антибиотические пептиды, представляющие собой фрагменты гистона H4, были выделены нами из лейкоцитов собаки и лисицы. Таким образом, нами обнаружены и охарактеризованы новые антибиотические пептиды, играющие ключевую роль во врожденном иммунитете исследованных видов животных. *Работа поддержана грантами РФФИ №15-04-06471а и №17-04-02177а.*

ПРОЛИН-БОГАТЫЕ ПЕПТИДЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА КАК ПРОТОТИПЫ НОВЫХ АНТИМИКРОБНЫХ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

О.В. Шамова[1,2], М.С. Жаркова[1], П.М. Копейкин[1], Т.А. Лукьянова[1], А.Ю. Артамонов[1], С.В. Баландин[3], Т.А. Филатенкова[1], А.С. Назаров[1,2], К.Э. Сафиуллина[1], М.С. Сухарева[1], Т.Ю. Пазина[1], Т.М. Гринчук[4], В.Н. Кокряков[1,2], Т.В. Овчинникова[3], Д.С. Орлов[1,2]
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [4]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Резистентность патогенных микроорганизмов к используемым в клинике антимикробным средствам стремительно растет, все более частыми становятся и случаи развития множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, что обусловливает необходимость поиска принципиально новых антимикробных и противоопухолевых средств. Одним из клю-

чей к решению данных проблем может стать применение аналогов природных защитных молекул – антимикробных пептидов (АМП) врожденного иммунитета. К подобным соединениям относятся и пролин-богатые АМП (ПБ-АМП), которые благодаря высокой антимикробной активности и низкой токсичности для клеток макроорганизма в настоящее время рассматриваются как перспективные прототипы новых лекарственных средств для борьбы с антибиотикорезистентыми бактериями. Целью нашей работы было изучение биологической активности ПБ-АМП семейства бактенецинов, а именно, описанных нами ранее АМП лейкоцитов домашней козы (ChBac5, ChBac3.4, mini-ChBac7.5Nα и β, а также их структурные модификации) и выявление свойств, важных с точки зрения перспектив практического применения. Показано, что эти соединения проявляют высокую антимикробную активность в отношении антибиотикоустойчивых изолятов *Pseudomonas aeruginnosa, Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumonia, Escherichia coli* и др. *in vitro*. Изучен механизм их антимикробного действия. Показано, что некоторые из исследуемых ПБ-АМП оказывают стимулирующее действие на процесс заживления кожной раны у экспериментальных животных. Один из пептидов, напротив, демонстрирует нетипичное для ПБ-АМП цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток, в том числе и обладающих лекарственной устойчивостью. Нами разработана модификация этого пептида с более высокой селективностью для малигнизированных клеток по сравнению с нетрансформированными, показана ее эффективность на модели перевиваемой карциномы Эрлиха у мышей. С другой стороны, ПБ-АМП могут рассматриваться и как переносчики лекарственных средств через мембраны опухолевых клеток. Нами получены АП-АМП, несущие флуорофор, показана их способность к быстрой интернализации в опухолевые клетки *in vitro*. Полученные результаты подтверждают перспективность исследования ПБ-АМП как прототипов новых антимикробных и противоопухолевых препаратов. *Поддержано грантом РФФИ №17-04-02177.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАТТЕРНОВ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДЛЯ ДИЗАЙНА АЛЬФА-СПИРАЛЬНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

И.Е. Елисеев[1], И.Н. Тертеров[1], О.В. Шамова[2], М.В. Дубина[1]
[1]Санкт-Петербургский академический университет;[2]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Антимикробные пептиды (АМП) обладают широким спектром активности и могут быть использованы для создания новых антибиотиков против резистентных бактерий. Однако, умеренная активность в биологических жидкостях и высокая цена производства ограничивают терапевтическое применение природных пептидов. Необходимы новые подходы к дизайну синтетических пептидов с простой структурой и увеличенной активностью. В настоящей работе мы представляем новый вычислительный подход к дизайну α-спиральных антимикробных пептидов, основанный на ранее предложенной «лингвистической» модели, адаптированной для данного структурного класса. Мы использовали алгоритм Teiresias для поиска паттернов в последовательностях АМП и разработали критерий для отбора специфичных паттернов, основанный на сравнении природных и перемешанных последовательностей. Анализ пептидов с разной структурой показал, что множества паттернов из пептидов с α и β структурой не пересекаются. Для дизайна новых синтетических пептидов мы использовали только паттерны из α-спиральных пептидов и разработали процедуру их объединения в шаблоны. Шаблоны были затем использованы для построения новых последовательностей пептидов, и 7 из них были синтезированы и очищены. Созданные таким образом пептиды были проанализированы методом кругового дихроизма, который показал, что все пептиды являются бесструктурными в растворе, но приобретают спиральную конформацию при связывании с липидными мицеллами. Для каждого пептида была измерена минимальная ингибирующая концентрация (МИК), при которой пептид ингибировал рост Грам (+) и Грам (-) бактерий. Большинство сконструированных пептидов (5 из 7) были активны в отношении всех протестированных бактерий, а их МИК была сравнима с натуральными АМП. Наиболее активный из пептидов продемонстрировал МИК в пределах 1–8 мкМ против *P. aeruginosa* и *S. aureus*, что сравнимо с лучшими природными пептидами. Предложенный подход позволяет эффективно конструировать активные пептиды простого состава, практически негомологичные известным природным АМП.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ С БЕЛКОМ C1Q И ИХ ВЛИЯНИЕ НА АКТИВАЦИЮ КОМПЛЕМЕНТА

М.Н. Берлов[1,2], Е.С. Умнякова[1], А.В. Соколов[1], Т.В. Овчинникова[3], В.Н. Кокряков[1,2]
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; 2Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Антимикробные пептиды (АМП) являются одними из важнейших молекулярных факторов врожденного иммунитета человека и животных. Помимо собственно антимикробной активности многие из этих пептидов обладают широким спектром иммуномодулирующих свойств. Известно, что некоторые АМП могут взаимодействовать с белком комплемента C1q и оказывать влияние на уровень активации комплемента. Способность взаимодействовать с C1q показана только для АМП, формирующих антипараллельные бета-слои (дефенсины, протегрин, ареницин, тахиплезин). В нашей работе мы исследовали взаимодействие бета-структурных АМП с C1q с использованием C1q, меченого пероксидазой, или антител к C1q, а также методом поверхностного плазмонного резонанса. По данным этого метода взаимодействие АМП с C1q характеризуется микромолярными Kd, однако результаты плохо воспроизводились и не соответствовали модели связывания 1:1. Мы предполагаем, что в коллагеновом домене C1q происходит поливалентное связывание АМП в сайтах с различной аффинностью. Результатом может быть активация или, напротив, ингибирование комплемента. Уровень активации комплемента в нашей работе оценивали по лизису сывороткой крови человека клеток-мишеней: сенсибилизированных антителами эритроцитов барана и клеток грамотрицательной бактерии *Escherichia coli*. АМП млекопитающих (дефенсины человека HNP-1-3 и кателицидин свиньи протегрин PG-1) в этих экспериментах проявляли активность различного характера. Протегрин активировал комплемент в низких концентрациях, но ингибировал в высоких, в то время как дефенсины проявляли только ингибирующую активность. На основании структуры гена и молекулы-предшественницы PG-1 относится к семейству кателицидинов, однако зрелый пептид имеет определенную гомологию (и, вероятно, общее эволюционное происхождение) с дефенсинами. В то же время, молекула протегрина короче, содержит 2 антипараллельных бета-тяжа (а не 3, как дефенсины) и обладает по сравнению с дефенсинами более высоким положительным зарядом. По этим структурным свойствам протегрины подобны АМП беспозвоночных ареницину и тахиплезину, хотя не имеют гомологии с ними по первичной структуре. Тем не менее, по ха-

рактеру действия на активацию комплемента протегрин сходен с ареницином и тахиплезином, а не с дефенсинами. *Работа поддержана грантом РФФИ №15-04-06471а.*

РАЗРАБОТКА ИННОВАЦИОННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА НА ОСНОВЕ БЕЛКА YB-1

Л.П. Овчинников[1], Н.В. Бобкова[2] *[1]Институт белка РАН, Пущино; [2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия*

Болезнь Альцгеймера (БА) – это тяжелое и пока неизлечимое нейродегенеративное заболевание людей пожилого возраста. Количество больных БА непрерывно растет. БА характеризуется гибелью нейронов головного мозга и потерей памяти. Индикаторами и предполагаемыми причинами БА является накопление β-амилоидного (Аβ) пептида, образующего в головном мозге Аβ фибиллы и бляшки, и гиперфосфорилирование τ-белка, его диссоциация с микротрубочек и образование внутриклеточных фибриллярных клубковых структур. Утрата сродства гиперфосфорилированного τ-белка к тубулину приводит к утрате его способности поддерживать структуру микротрубочек и к нарушению аксонального транспорта мРНК. YB-1 – это многофункциональный ДНК/РНК связывающий белок с эволюционно консервативным доменом «холодового шока». YB-1 принимает участие в формировании нервной трубки в эмбриогенезе и его нокаут нарушает развитие эмбриона на стадии закладки нервной трубки. YB-1 обнаруживается в мозге взрослого организма преимущественно в нейронах и исчезает при старении. Исходя их описанных свойств YB-1 мы исследовали его действие на развитие болезни Альцгеймера на двух мышиных моделях БА. Мы показали, что хроническое интраназальное введение YB-1 мутантным 5XFAD мышам (модель наследственной формы БА) сохраняет у них способность к обучению, уменьшает количество Аβ и замедляет образование Аβ бляшек. Интраназальное введение YB-1 бульбэктомированным мышеам (модель спорадической формы БА) предотвращает потерю памяти и гибель нейронов и снижает количество Аβ. В опытах на нейрональной культуре показано, что YB-1 снимает цитотоксическое действие τ-белка и Аβ пептида. Интраназально введенный YB-1 проникает в мозг, «обволакивает» Аβ бляшки и обнаруживается в цитоплазме нейронов. YB-1 также предотвращает образование Аβ фибрилл *in vitr*o и частично разрушает уже образовавшиеся фибриллы. Ранее мы показали, что YB-1 взаимодействует с тубулином и стимулирует образование микротрубочек. Мы полагаем, что YB-1 в нейронах может компенсировать недостаток активного τ-белка при БА. Полученные результаты позволили предложить мультифунуциональный белок YB-1 на доклинические испытания в качестве потенциального лекарственного средства для лечения болезни Альцгеймера. *Исследование поддержано грантом РНФ (проект 14-14-00879) и РФФИ (#15-54-16006).*

ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ В НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ АЛЬЦГЕЙМЕРОВСКОГО ТИПА

О.М. Вольпина[1], Д.О. Короев[1], Т.Д. Волкова[1], А.В. Камынина[1], М.П. Филатова[1], С.М. Баласанянц[1], Н.И. Медвинская[2], П.В. Некрасов[2], И.В. Нестерова[2], А.Н. Самохин[2], Н.В. Бобкова[2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской области, Россия

Существенную роль в развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа играет активация рецептора конечных продуктов гликозилирования (RAGE). Мы предположили, что короткие синтетические фрагменты RAGE будут предотвращать негативные эффекты, вызываемые активацией RAGE при нейродегенерации. Были выбраны и синтезированы пептидные фрагменты, соответствующие экспонированным неструктурированным петлям внеклеточной части молекулы RAGE. Пептиды вводили интраназально бульбэктомированным (БЭ) мышам, которые развивают поведенческие, биохимические и морфологические признаки нейродегенерации альцгеймеровского типа. Показано, что только введение фрагмента RAGE (60–76) предотвращают нарушение пространственной памяти БЭ животных. Иммунизация БЭ животных синтетическими пептидами выявила, что лишь пептид (60–76) проявляет протективную активнось. Как интраназальное введение, так и иммунизация пептидом (60–76) существенно снижают уровень мозгового бета-амилоида. Изучение активности коротких перекрывающихся пептидов участка (60–76) позволило выявить, что за проявление активности ответственен N-концевой фрагмент (60–70). Морфо-функциональное исследование нейронов коры и полей гиппокампа мозга БЭ животных после интраназального введения пептидов показало, что максимальный протективный эффект на нейроны оказывает пептид (60–76). Введение флуоресцентно меченного пептида Flu-(60–76) БЭ или трансгенным животным с нейродегенерацией альцгеймеровского типа позволило обнаружить проникновение пептида в мозг, причем в случае трансгенных животных показана солокализация Flu-(60–76) с отложениями бета-амилоида. С помощью SDS-PAGE показано, что Flu-(60–76) образует комплекс с бета-амилоидом. Эти данные подтверждают, что бета-амилоид может быть одной из молекулярных мишеней пептида (60–76), а сам пептид может стать основой для разработки средств терапии нейродегенерации альцгеймеровского типа, а также для изучения путей активации RAGE при патогенезе. *Работа выполнена в рамках проектов РФФИ 15-04-01360а*

ДИПЕПТИДНЫЙ МИМЕТИК МОЗГОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГСБ-106 – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ АНТИДЕПРЕССАНТ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

А.В. Таллерова, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин *НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия*

Согласно экспериментальным и клиническим данным развитие депрессивного состояния связано с нарушением нейропластичности в гиппокампе, обусловленным дефицитом мозгового нейротрофического фактора (BDNF). Активация BDNF-TrkB сигнальных путей вовлечена в регуляцию синаптогенеза, нейрогенеза и выживаемости нейронов. Эффекты классических антидепрессантов сопровождаются увеличением концентрации BDNF и усилением MAP-киназного сигналинга. Очевидно, что BDNF является перспективным объектом для создания новых фармакологических подходов к лечению депрессии. Однако его терапевтическое использование ограничивается нестабильностью в биологических жидкостях, плохой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и свойственной ему плейотропностью. Поэтому актуальным представляется создание низкомолекулярнх миметиков BDNF. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова на основе гипотезы о том, что фармакофорными участками нейротрофинов являются бета-изгибы их петлеобразных структур, сконструирован и синтезирован миметик наиболее экспонированной наружу 4-ой петли BDNF. Он представляет собой замещенный димерный ди-

пептид, гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина), лабораторный шифр ГСБ-106. Методом Вестерн-блот анализа установлено, что ГСБ-106, подобно полноразмерному белку, активирует TrkB и его сигнальные пути MAP/ERK и PI3K/AKT. В фармакологических исследованиях на батарее валидированных тестов на грызунах для дипептида ГСБ-106 показана выраженная антидепрессивная активность при внутрибрюшинном и пероральном введении. ГСБ-106 нетоксичен ($ЛД_{50}$>4000 мг/кг) и проникает через гематоэнцефалический барьер. Для развития ГСБ-106 в качестве потенциального антидепрессанта в Институте разработана таблетированная лекарственная форма. В экспериментах депрессивно-подобного состояния на грызунах 14-ти дневное введение лекарственной формы ГСБ-106 оказывало антидепрессивное действие в дозах 0,05–5 мг/кг перорально, превосходящее по выраженности золотой стандарт антидепрессантов амитриптилин. Таким образом, фармакологический препарат ГСБ-106 при системном введении обладает выраженным антидепрессивным эффектом, действуя по BDNF-ергическому механизму, что определяет актуальность его разработки в качестве антидепрессанта нового поколения.

ЗАМЕЩЕННЫЙ ГЛИПРОЛИН ГЗК-111 – НОВЫЙ ДИПЕПТИД С АНКСИОЛИТИЧЕСКОЙ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЯМИ

К.Н. Колясникова, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин *НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия*

Многолетние фундаментальные исследования в НИИ фармакологии им.В.В. Закусова привели к открытию эндогенного нейропептида циклопролилглицина (ЦПГ) (Gudasheva T.A. et al., 1996). В фармакологических исследованиях установлено, что ЦПГ способен регулировать память и тревогу (Середенин С.Б. и др., 2002), а также обладает антигипоксическим и нейропротекторным действием. Эти эффекты могут быть связаны с тем, что ЦПГ оказывает положительное модулирующее действие на глутаматные AMPA-рецепторы и усиливает синтез мозгового нейротрофического фактора BDNF (Гудашева Т.А. и др., 2016). С целью создания потенциального нейропротекторного лекарственного препарата нами получен замещенный дипептид, этиловый эфир N-фенилацетилглицил-L-пролина (ГЗК-111), который, как нами показано, легко превращается в ЦПГ в биологических средах. Дипептид ГЗК-111 проявляет нейропротекторную активность в фармакологических тестах как *in vitro*, так и *in vivo*. Так, на модели 6-оксидофаминовой токсичности с использованием клеток линии SH-SY5Y (клеточная модель болезни Паркинсона) при внесении за 24 ч до повреждения ГЗК-111 в концентрациях 10^{-6} и 10^{-7} М достоверно улучшал выживаемость клеток до контрольного уровня. На модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс, ГЗК-111 в дозе 0,5 мг/кг внутрибрюшинно в 1,6 раз уменьшал объем зоны инфаркта и улучшал неврологический статус животных. Кроме того, в батарее валидированных тестов у грызунов для ГЗК-111 выявлено ноотропное, анксиолитическое и антигипоксическое действие в интервале доз 0,1–1,0 мг/кг. Таким образом, нами был получен новый перспективный нейропротектор с ЦПГ-эргическим механизмом действия, полезный для лечения нейродегенеративных заболеваний.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ К ВНЕКЛЕТОЧНОМУ ДОМЕНУ RAGE ВОССТАНАВЛИВАЮТ МИТОХОНДРИИ В МОЗГЕ БУЛЬБЭКТОМИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

А.В. Аветисян[1], Р.А. Зиновкин[1], Р.А. Симонян[1], П.В. Некрасов[2], А.Н. Самохин[2], Д.О. Короев[3], О.М. Вольпина[3], Н.В. Бобкова[2]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва; [2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Двусторонняя ольфакторная бульбэктомия (ОБЭ) у мышей вызывает нейродегенерацию с характерными для болезни Альцгеймера (БА) поведенческими и биохимическими признаками, а именно, потеря пространственной памяти, повышенный уровень бета-амилоида в мозговых тканях, нарушение энергетического обмена. Митохондрии играют важную роль в патогенезе БА, их функциональное повреждение является ранним признаком БА и предшествует образованию амилоидных бляшек. Накопление бета-амилоида (1–40) внутри митохондрий коры и гиппокампа ОБЭ мышей приводит к нарушениям окислительного метаболизма, ингибированию комплексов дыхательной цепи. Значительное снижение активности электронтранспортной цепи, а именно, NADH: убихинон-оксидоредуктазы (комплекс I) и цитохромоксидазы (комплекс IV) сопровождается снижением мембранного потенциала, окислительным стрессом и увеличением продуктов перекисного окисления липидов. Было обнаружено уменьшение относительного числа копий митохондриальной ДНК в коре головного мозга ОБЭ мышей, тогда как активность цитратсинтазы, как показателя количества интактных митохондрий, не менялась. Рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE) является мембранным мультилигандным рецептором, в том числе для бета-амилоида, и опосредует транспорт свободных амилоидов крови в мозг. Наоборот, растворимая форма sRAGE, генерируемая протеолитическим расщеплением, связывается с амилоидными пептидами и способствует их удалению из мозга. Предположительно, подобный эффект очищения мозга от бета-амилоида мог быть реализован синтетическими пептидами, повторяющими неструктурированные области внеклеточного V-домена RAGE, предполагаемого сайта связывания бета-амилоида. Несколько синтетических пептидов RAGE были синтезированы и исследованы в качестве мишеней для связывания амилоидов при интраназальном введении. Обработка ОБЭ мышей с помощью RAGE фрагментов в течение 3 недель имела терапевтическое влияние на активность митохондрий, а том числе, на дыхательные комплексы I и IV в митохондриях коры и гиппокампа, за исключением короткого пептида (60–62), который не оказывал положительного действия. Только фрагмент (60–76) улучшал пространственную память ОБЭ мышей одновременно с восстановлением митохондриальных функций. *Работа поддержана РФФИ, грант № 16-04-0094.*

КОМБИНИРОВАННЫЕ ПЕПТИДЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

А.Д. Слободина[1,2], О.И. Большакова[1], А.Л. Шварцман[1], С.В. Саранцева[1]
[1]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Наиболее распространенной формой первичных нейродегенеративных заболеваний в современном обществе является болезнь Альцгеймера (БА), сопровождающаяся прогрессирующим когнитивным снижением, расстройством памяти, развитием слабоумия и накоплением в головном мозге фибриллярных агрегатов амилоидного пептида бета, состоящего из 42

аминокислот (Аβ). Несмотря на огромный объем накопленных за последнее время данных о морфологических, биохимических и физиологических характеристиках БА, до сих пор не удалось разработать однозначную концепцию молекулярных основ развития этого заболевания, а также эффективных методов его терапии. Сегодня основная стратегия терапии БА сконцентрирована на поиске и разработке препаратов, предотвращающих или разрушающих Аβ-агрегаты. При скрининге комбинаторных пептидных библиотек и анализе миметиков транстиретина нами были определены пептиды, блокирующие различные стадии образования амилоидных фибрилл, включая элонгацию Аβ (SH5, SH8, TTR37-43, TTR106-117). Однако данные пептиды не могли проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Для превращения уже найденных «ингибиторов образования амилоида» в потенциальные терапевтические мы модифицировали их, присоединив к их последовательности вектора, способные проходить через клеточные мембраны и ГЭБ. В качестве векторов были использованы домены белковой трансдукции – TP2 и Arg9 и пептид-миметик аполипопротеина E – Cog14-10. Целью настоящей работы было исследование способности комбинированных пептидов (пептид-ингибитор + векторный пептид) ингибировать рост фибрилл Аβ и проходить через клеточные мембраны *in vitro*. Для этого были использованы конфокальная, трансмиссионная электронная и атомно-силовая микроскопии, динамическое светорассеяние и цитометрический анализ. Исследования проводили на культурах клеток V79 и HELA. Мы установили, что все исследованные пептиды проходят внутрь клеток обеих линий с разной эффективностью и регистрируются в цитоплазме и ядре клеток. В работе показано, что инкубация Аβ с комбинированными пептидами в течение 24 часов при температуре 370С снижает агрегацию Аβ, т. е. эти пептиды обладают антиамилоидной активностью. Для дальнейших экспериментов *in vivo* были отобраны препараты с наибольшим антиамилоидогенным потенциалом.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-29-01350.

РАЗРАБОТКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ БИНАЗЫ

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

Проблема повышения эффективности методов воздействия на злокачественные новообразования, в особенности на их высокометастатические формы, является крайне актуальной. Повреждение РНК опухолевых клеток с помощью рибонуклеаз (РНКаз) является перспективной стратегией подавления опухолевой прогрессии. Одной из таких РНКаз является бináза из *Bacillus pumilus*. Бináза индуцирует селективную гибель злокачественных клеток по пути апоптоза. При этом бináза не вызывает некроз клеток, как в культуре, так и на уровне целого организма, что является одной из ключевых особенностей, необходимых для цитотоксических терапевтических агентов. На мышиных моделях показано, что бináза эффективно ингибирует рост первичных опухолей и образование метастаз и запускает регенеративные процессы в печени. Чувствительность опухолевых клеток к действию биназы зависит от экспрессии определенных онкогенов (KIT, FLT3, RAS, AML1-ETO, E6, E7). Выявленные молекулярно-генетические особенности опухолевых клеток, определяющие их чувствительность к действию биназы, позволяют прогнозировать эффективность ее применения в отношении определенных типов опухолей. Бináза является исключительно стабильным белком, не подверженным окислительным модификациям, что позволяет препаратам на ее основе сохранять свои свойства в течение долгого времени, а также быть эффективными в клетках, подверженных окислительному стрессу, характерному для клеток опухолей.

Работа поддержана Российским научным фондом, проект №14-50-00060.

ПРИМЕНЕНИЕ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-КЛЕТОК СЛИТНЫХ С ЛИГАНДОМ В-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА ДЛЯ ТЕРАПИИ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ

А.В. Степанов[1,2], А.А. Белогуров[1,2], А.Г. Габибов[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Неходжкинские лимфомы (НХЛ) – неоднородная группа злокачественных новообразований лимфоцитарной этиологии, включающих в себя все лимфомы за исключением лимфогранулематоза. В 85–90% случаях регистрируемых НХЛ именно В-клетки являются объектом опухолевой трансформации. На сегодняшний день существует большое количество препаратов для терапии НХЛ, однако наиболее эффективные препараты обладают существенным недостатком – повышенным уровнем элиминации нормальных лимфоцитов. Поэтому поиск более специфических маркеров патологических лимфоцитов для направленной терапии является крайне актуальной задачей. Уникальным поверхностным маркером определенного клона В-клеток является В-клеточный рецептор (BCR). Идентификация лиганда BCR лимфомных клеток позволит специфически элиминировать патологические В-лимфоциты. Для реализации поставленной задачи у пациентов с диагнозом фолликулярная лимфома были изолированы биоптаты лимфоузлов. После определения нуклеотидных последовательностей, кодирующих гены вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов, В-клеточные рецепторы лимфомных клеток были получены в виде трансмембранно-заякоренных химерных рецепторов. Далее, с помощью разработанной репортерной линии клеток, был обнаружен циклопептид, специфически гибридизующийся с лимфомными клетками. Данный пептид был интегрирован в состав химерного антигенного рецептора Т-клеток для получения лентивирусных конструкции и последующей трансдукции цитотоксических лимфоцитов. В результате анализа цитотоксического действия Т-лимфоцитов человека, модифицированных химерным рецептором, по отношению к контрольным и лимфомным клеткам было показано, что предлагаемый подход направленной элиминации позволяет с высокой специфичностью подавлять опухолевые клетки, не подвергая опасности здоровые В-клетки. Разрабатываемый подход позволит создавать персонифицированные препараты для терапии большинства неходжкинских лимфом В-клеточного происхождения.

Данная работа была поддержана грантом RFMEFI60716X0145.

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛАКТАПТИНА

В.А. Рихтер[1], Е.В. Кулигина[1], О.В. Коваль[1], Г.В. Кочнева[2], А.А. Немудрая[1], А.А. Макарцова[1], О.С. Троицкая[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия [2]Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Из молока человека был выделен пептид лактаптин, индуцирующий апоптоз раковых клеток различного происхождения. Получены штаммы-продуценты и рекомбинантные аналоги лактаптина. На основе одного из аналогов – RL2 – было разработано противоопухолевое лекарственное средство – Лактаптин. В доклинических исследованиях было показано, что Лактаптин эффективно подавляет рост опухолей различного происхождения. Однако, как и многие препараты белковой природы, лактаптин равномерно распределяется по органам и тканям организма и имеет короткий период полужизни. Для повышения противоопухолевой эффективности лактаптина были использованы два подхода – адресная доставка лактаптина к опухоли и разработка онколитического вируса, содержащего ген лактаптина. Для направленной доставки лактаптина мы использовали опухоль-адресующие пептиды, полученные методом фагового дисплея. Были созданы генетические конструкции, обеспечивающие получение рекомбинантных слитых белков, состоящих из RL2 и отобранных пептидов. Показано, что цитотоксическая активность слитых белков не отличалась от таковой для RL2. При этом слитые белки тормозили рост опухоли значительно эффективнее, чем RL2. Мы также разработали двойной рекомбинантный вирус осповакцины (VV-GMCSF-Lact) экспрессирующий экзогенные белки: цитотоксический пептид лактаптин и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека (GM-CSF). Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact оказалась значительно выше цитотоксической активности рекомбинантного VACV, кодирующего только GM-CSF. Было показано, что VV-GMCSF-Lact эффективно тормозит рост мышиных и человеческих опухолей, в том числе лекарственно устойчивых. Таким образом, полученные результаты показывают, что рекомбинантный VACV, кодирующий апоптоз индуцирующий белок лактаптин, обладают значительным противоопухолевым терапевтическим потенциалом.

НАПРАВЛЕННАЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ДОСТАВКА ПРОТИВОРАКОВЫХ АГЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ МОДУЛЬНЫХ НАНОТРАНСПОРТЕРОВ

А.А. Розенкранц, Т.А. Сластникова, А.В. Уласов, А.С. Соболев
Институт биологии гена РАН; Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Разработан спектр искусственных белков – модульных нанотранспортеров (МНТ), - «узнающих» клетку-мишень, проникающих внутрь неё и попадающих в заданную часть клетки – в частности, в клеточное ядро. В принцип построения МНТ заложена возможность быстрой замены их модулей с целью перенаправления МНТ вместе с доставляемым ими «грузом» на разные заданные типы клеток-мишеней и их субклеточных структур. Противораковые средства, доставляемые МНТ, приобретают клеточную специфичность и в десятки тысячи раз более эффективно поражают раковые клеток. У лабораторных животных противораковые средства за счет доставки с помощью МНТ значительно более эффективно тормозят развитие опухолей, увеличивают среднюю продолжительность жизни и выживаемость животных.

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННО-ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

И.В. Алексеенко *Институт молекулярной генетики РАН; Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Суицидальная генная терапия (СГТ) основана на доставке в опухолевые клетки суицидальных генов, ответственных за *in situ* превращение пролекарства в токсин. СГТ потенциально универсальна и низкотоксична, поскольку токсин образуется непосредственно в раковых клетках и специфически ингибирует репликацию ДНК. Однако СГТ имеет недостатки, связанные в том числе с трудностями в доставке терапевтической ДНК в раковые клетки. Обычно для доставки ДНК в опухоль используют вирусные векторы, которые обеспечивают высокую эффективность трансфекции раковых клеток, но при этом имуногенны, имеют высокую стоимость производства и транспортировки. Невирусные системы доставки характеризуются простым и дешевым способом производства, они практически неимунногенны, что позволяет проводить многократное повторение курсов лечения, но имеют сравнительно низкую эффективность проникновения в раковые клетки. Одним из способов повышения эффективности СГТ является комбинирование суицидальных генов с генами системы регуляции иммунного ответа, наиболее перспективными из которых являются гены цитокинов, в частности GM-CSF и гены лигандов иммунных контрольных точек (ИКТ). Ранее мы показали, что введение в опухоль комбинации суицидального гена HSVtk и гена цитокина GM-CSF обеспечивает более высокий уровень подавления роста опухоли и метастазирования, чем введение конструкций, содержащих одиночные гены. В качестве системы доставки экспрессионных конструкций в опухоль мы использовали блок-сополимеры ПЭГ-ПЭИ-ТАТ, включающие линейные поликатионы полиэтиленимин (ПЭИ) и полиэтиленгликоль (ПЭГ), а также ТАТ-пептид. При этом добавление к комбинации HSVtk-GM-CSF гена лиганда ИКТ OX40L повышало ее эффективность, в частности увеличивало вероятность подавления метастазирования. В ходе исследования безопасности комбинации не было выявлено биологически значимых токсических эффектов. Также мы, как и другие авторы показали, что комбинирование невирусной генной терапии и лучевой терапии значительно повышает эффективность последней, не приводя к повышению токсичности. Таким образом, комбинирование невирусной генной терапии с традиционными подходами, такими как химиотерапия, лучевая терапия, и терапия малыми молекулами, видится одним из наиболее перспективных подходов к лечению рака. *Работа поддержана грантом РФФИ №16-34-60185.*

МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ ШАПЕРОНА HSP70 И ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Д.В. Сверчинский, В.Ф. Лазарев, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

В последние годы произошел серьезный прогресс в молекулярной и клинической онкологии, что привело к появлению новых подходов к противоопухолевой терапии. Однако некоторые виды такой терапии могут оказаться недостаточно эффективными ввиду наличия у опухолевых клеток многочисленных защитных механизмов. Важным элементом системы защиты опухолевой клетки является белок Hsp70 – молекулярный шаперон, экспрессирующийся в опухолевых на высоком уровне.

Одним из путей увеличения эффективности противоопухолевой терапии является подавление защитных механизмов опухолевых клеток, основанных на функциях Hsp70. Недавние исследования показали, что небольшие олигопептиды – фрагменты последовательности Hsp70 могут обладать функциями целой молекулы. Кроме того, процесс димеризации и олигомеризации Hsp70, влияющий на его активность, зависит от небольших его участков. Также. Пептиды обычно обладают меньшей токсичностью и большей стабильностью, чем другие малые молекулы, исследуемые в качестве потенциальных противоопухолевых средств, изменяющих активность Hsp70. Именно поэтому в нашей работе, с помощью предложенной нами системы скринга, мы исследовали олигопептиды, являющиеся фрагментами Hsp70, в качестве потенциальных регуляторов активности этого шаперона. Нами были найдены пептиды, способные подавлять или усиливать субстрат-связывающую и шаперонную функции Hsp70. Один из этих пептидов, SP-2, обладавший ингибирующими функциями Hsp70, показал способность связываться с Hsp70 и проникать внутрь клеток. Наконец, SP-2 усиливал цитотоксический эффект противоопухолевого цитостатика доксорубицина в системе *in vitro*. Низкая собственная токсичность SP-2, даже при высоких концентрациях, делает его возможное фармакологическое применение более безопасным.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №14-50-00068.

ОТ ИССЛЕДОВАНИЙ МОРСКИХ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ К НОВЫМ ИДЕЯМ И БИОПРЕПАРАТАМ

В.А. Стоник *Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.В.Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия*

Исследования морских природных соединений (МПС) - развивающаяся область науки, обеспечивающая большое разнообразие низкомолекулярных метаболитов. Многие из 27000 новых соединений имеют необычные структуры и свойства. Кроме того, недавно найдены новые молекулярные мишени, которые участвуют в иммунном ответе на изученные нами соединения, что позволяет объяснить особенности их действия.

Нами найдены и изучены несколько новых групп алкалоидов. Например, в глубоководной губке *Monanchora pulchra* обнаружены новый алкалоид монанхоцидин А и его структурные аналоги с очень высокой цитостатической активностью против опухолевых клеток. Индуцируя цитостатическую аутофагию и лизосомную мембранную проницаемость, монанхоцидин А преодолевает лекарственную устойчивость опухолевых клеток. Новые необычные алкалоиды с важными для медицины свойствами были найдены ещё в нескольких морских губках.

Экстремофильные морские организмы привлекают внимание как источник МПС. Один из примеров наших исследований микробных экстремофилов касается тритерпеновых гликозидов из голотурии *Kolga hyaline*, собранной на глубине 4354 м нашими коллегами из Института Океанологии им. П.П. Ширшова в котловине Амундсена в Арктике. Это был самый глубоководный биологический объект, из которого мы выделили такие сложные МПС.

В течение последних трех лет более 100 новых вторичных метаболитов выделено из морских микроорганизмов, особенно из морских грибов. Разнообразие метаболитов морских грибов велико, что обеспечивает выделение из них различных групп соединений от пептидов до алкалоидов.

Методы молекулярной генетики находят все более широкое применение в поиске и исследовании МПС. Этот поиск теперь базируется не только на отборе экстрактов морских микроорганизмов по их биологической активности, но и на установлении нуклеотидной последовательности. Геномное секвенирование морской флавобактерии *Mesonia algae* из нашей Коллекции показало, что эта бактерия продуцирует новые ферменты класса гликозилтрансферазы. Работа выполнена при частичной поддержке гранта РНФ № 17-14-01065.

ПОИСК НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ И ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ИХ ДЕЙСТВИЯ

П.В. Сергиев[1,2], И.А. Остерман[1,2], Е.С. Комарова[1,2], А.А. Богданов[1], О.А. Донцова[1,2]
[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, [2]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Поиск новых антибактериальных соединений и создание производных известных антибиотиков является важнейшей задачей биомедицинской химии. Существующие схемы поиска достаточно малопроизводительны и включаю в себя несколько стадий. Первичная идентификация антибактериальной активности обычно дополняется гораздо более трудоемким определением механизма действия «с чистого листа». В нашей лаборатории был создан репортерный штамм бактерий, который позволяет одновременно с определением антибактериальной активности и без дополнительных затрат установить мишень действия соединения в бактериальной клетке. При этом ген RFP, находящийся под контролем промотора sulA начинает экспрессироваться при повреждениях ДНК, вызванных, например, ингибиторами ДНК-гиразы, такими, как фторхинолоны. Ген дальне-красного флюоресцентного белка, katushka2S, находящийся под контролем генетически модифицированного триптофанового аттенюатора, активируется при обработке клеток веществами, останавливающими трансляцию. Созданная конструкция позволяет проводить высокопроизводительный скрининг антибактериальных соединений с определением мишени при нанесении тестируемых соединений на поверхность агара с репортерным штаммом. Таким образом в нашей лаборатории был проведен скрининг 60 000 соединений, как природных, так и синтетических. Найденные в ходе скрининга соединения-ингибиторы биосинтеза белка были исследованы в системе биосинтеза белка in vitro. Выявлено несколько новых классов веществ-ингибиторов биосинтеза белка. Для нескольких природных антибиотиков установлен детальный механизм действия. *Работа выполнена при поддержке РНФ, грант 14-14-00072.*

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СЕМАКСА НА АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНАЛЬНЫХ СЕТЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МАГНИТО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ (ФМРТ)

Я.Р. Паникратова[1], И.С. Лебедева[1], О.Ю. Соколов[1], Д.А. Куприянов[2], А.Д. Румшиская[3], Н.В. Кост[1], Н.Ф.Мясоедов[1]
[1]ФГБНУ НЦПЗ; [2]ОО Филипс;[3]ФГАУ «ЛРЦ» МЗ РФ, Москва, Россия

Пептидный ноотроп Семакс эффективно применяется в неврологии и психиатрии, однако механизмы его действия до конца не изучены. Целью работы являлось выявление возможных «перестроек» работы нейрональных сетей головного мозга под действием Семакса у здоровых добровольцев методом фМРТ.

Обследовано 24 испытуемых, основная группа 14 чел (43±8 лет, 7 муж, 7 жен), контрольная группа 10 чел (45.9±9.9 лет, 4 муж, 6 жен). ФМРТ покоя (томограф Philips Ingenia 3T, Голландия) проводили трижды - до введения (фон), через 5 и 20

минут после однократного введения 1 % Семакса (по 60 мкл в каждую ноздрю, доза 1.2 мг) или плацебо (3% нипагин, по 60 мкл). Во время фМРТ испытуемые лежали неподвижно с открытыми глазами. Анализ изображений проводили с помощью пакетов SPM12 и GIFT 3.0a. Анализировали сеть оперативного покоя (DMN) и регуляторную сеть левого полушария (LECN). Статистический анализ показал различия в динамике субкомпонентов обеих тестируемых нейрональных сетей после введения препарата и плацебо. Обнаружено значительное повышение объема лобного субкомпонента сети DMN (область парацингулярной извилины и передней поясной коры) через 20 минут после приема Семакса. К этому времени также наблюдалась редукция лобного субкомпонента сети LECN, что может быть связана с реципрокными взаимодействиями между сетями. В группе плацебо данные эффекты отсутствовали. Предполагается, что воздействие Семакса на лобные отделы головного мозга опосредовано как васкулярными (изменение гемодинамики), так и нейрональными (синхронизация большего числа нейрональных популяций) эффектами. Таким образом, впервые методом фМРТ подтверждено влияние Семакса на нейрональные сети головного мозга и выявлена топография этих эффектов.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ В ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ: ПЕПТИДНЫЕ ИММУНОГЕНЫ И ПЕПТИДЫ-ТРАНСПОРТЕРЫ

Е.Ф. Колесанова, Е.А. Егорова, В.Н. Прозоровский, О.М. Ипатова *НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия*

Синтетические пептидные иммуногены и многие пептиды-транспортеры, обеспечивающие направленную доставку лекарственных соединений к тканям и в клетки, представляют собой фрагменты белковых молекул. В ходе разработки синтетических пептидов с такими функциями и с дальнейшей перспективой использования в лекарственных препаратах решаются следующие задачи. 1. Выбор фрагментов аминокислотных последовательностей белков, способных проявлять необходимую биологическую активность (антигенность, способность вырабатывать нейтрализующие антитела, связываться со специфическими рецепторами, проникать в клетки и т.д.) вне целой белковой молекулы. Для антигенных детерминант: анализ уникальности первичной структуры (отсутствия сходных фрагментов в белках человека, консервативность структуры – для генетических разновидностей конкретного возбудителя заболевания) 2. Дизайн искусственных пептидных молекул: выбор способа фиксации нужной структуры, линкеров, модификаторов и якорных фрагментов. 3. Разработка способа синтеза с учетом особенностей структуры и последующих модификаций. 4. Выбор способа презентации: единичные молекулы, конъюгаты с белками, синтетическими полимерами, липосомами, другими наночастицами, гелями. Для пептидных иммуногенов: выбор адъюванта. Пример разработки синтетических пептидных иммуногенов: экспериментальная пептидная вакцина против гепатита С на основе сконструированных синтетических пептидов, включающих консервативные В- и Т-эпитопы оболочечного белка вируса гепатита С. Примеры использования пептидов-транспортеров в разрабатываемых лекарственных препаратах: олигоаргинины и лиганды интегринов и CD13 для доставки лекарственных соединений в опухолевые клетки. *Работа выполнена в рамках Государственного задания, тема № 0518-2014-0003 «Поиск фармакологических мишеней и создание биологически активных соединений».*

ПЕПТИДНЫЕ КОНЪЮГАТЫ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

Б.П. Челобанов[1,2], А.А. Фокина[1], А.М. Ильина[2], К.В. Клабенкова[2], Е.А. Буракова[1], М. Фуджии[3], Д.А. Стеценко[1,2]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия; [3]Университет Киндай, Фукуока, Япония

Конъюгаты олигонуклеотидов с пептидами рассматриваются как перспективные терапевтические агенты, способные обеспечивать эффективную доставку антисмысловых олигонуклеотидов в клетки [1]. Показано, что с помощью пептидных конъюгатов наиболее эффективно протекает доставка в клетки лишенных отрицательного заряда аналогов нуклеиновых кислот, например, фосфордиамидных морфолиновых олигонуклеотидов (ФМО) [2]. Впервые полученные в ИХБФМ СО РАН новые аналоги нуклеиновых кислот – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) – содержат вместо отрицательно заряженных фосфодиэфирных групп незаряженные фосфорилгуанидиновые группы [3, 4]. Ранее было обнаружено, что ФГО проявляют антисмысловую активность *in vitro* на уровне, не уступающем ФМО. В данной работе мы показали, что конъюгат 25-звенного ФГО с векторным пептидом Pip6a [2] не только обладает почти на порядок большей антисмысловой активностью *in vitro*, чем неконъюгированный ФГО, но и способен вызывать терапевтический эффект *in vivo* после внутривенной инъекции. Таким образом, конъюгаты фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов с пептидами могут рассматриваться как перспективные кандидаты на роль антисмысловых терапевтических агентов. В докладе освещаются различные аспекты получения пептидных и олигонуклеотидных фрагментов, их конъюгации и использования.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №№ 15-03-06331 и 15-29-01334. Синтез модифицированных олигонуклеотидов проводился при поддержке гранта РНФ 15-15-00121.

Литература

1. Järver P., Coursindel T., Andaloussi S.E., Godfrey C., Wood M.J., Gait M.J. Peptide-mediated Cell and *in vivo* Delivery of Antisense Oligonucleotides and siRNA. // Mol. Ther. Nucleic Acids. - 2012. - V. 1. - N. 6. - e27.
2. Lehto T., Castillo Alvarez A., Gauck S., Gait M.J., Coursindel T., Wood M.J., Lebleu B., Boisguerin P. Cellular trafficking determines the exon skipping activity of Pip6a-PMO in mdx skeletal and cardiac muscle cells. // Nucleic Acids Res. - 2014. - V. 42. - N. 5. - P. 3207–3217.
3. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот. // Acta Naturae. - 2014. - Т. 6. - №. 4. - С. 123–125.
4. Стеценко Д.А., Купрюшкин М.С., Пышный Д.В. Заявка на патент WO 2016/028187A1 от 22.08.2014.

СОЗДАНИЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ДЕТОКСИФИКЦИИ ГЛЮТЕНА

А.А. Замятнин (мл.)[1,2], А.В. Балакирева[1], Н.В. Гороховец[1], Е.Ю. Зерний[2], Н.В. Кузнецова[1], В.А. Макаров[1], А.И. Петушкова[3], Л.В. Савватеева[1] *[1]Институт молекулярной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва; НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва; [3]Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Глютеновая непереносимость представлена тремя основными видами расстройств: целиакией, аллергией на пшеницу, а также чувствительностью к глютену, отличной от целиакии. Только от целиакии в мире страдает примерно 1% населения. У предрасположенных пациентов индукторами заболеваний являются пептиды – продукты переваривания в желудочно-

кишечным тракте смеси нерастворимых белков, исходно входящих в состав эндосперма злаковых, в том числе, пшеницы, ячменя, ржи и овса (глютен, гордеины, секалины и авенины, соответственно). На данный момент единственным общепризнанным способом терапии данных заболеваний во всем мире является абсолютная безглютеновая диета. Глютен из пшеницы и родственные ему белки других злаковых являются основными запасающими белками растений, обеспечивающими потребность в аминокислотах проростки злаковых на начальных этапах развития. При этом гидролиз глютена осуществляться пока не охарактеризованными протеолитическими ферментами. В то же время такие ферменты могут быть использованы в биотехнологии и медицине для детоксификации глютена. Во время прорастания пшеницы в проростках обнаруживаются мРНК, кодирующие ряд протеолитических ферментов, в том числе, папаин-подобную цистеиновую протеиназу Тритикаин-α. В ходе данной работы был клонирован ген этого фермента, была подобрана оптимальная доменная организация профермента, приводящая к созреванию фермента, проявляющего выраженную глютеназную активность. Биохимический и масс-спектрометрический анализ продуктов гидролиза, катализируемого Тритикаином-α, выявил ряд сайтов протеолиза в белках, составляющих глютен. Сайты протеолиза были также обнаружены в 33-звенном пептиде, который является продуктом трипсинолиза α-глиадина и является основным индуктором воспалителения у пациентов, страдающих целиакией. Также выяснилось, что Тритикаин-α оказался относительно стабильным в условиях, моделирующих условия желудочно-кишечного тракта человека. Таким образом, можно заключить, что рекомбинантный Тритикаин-α может быть использован в качестве основы для (i) создания лекарственных препаратов эффективных при терапии целиакии; (ii) биотехнологического использования в пищевой промышленности для производстве продуктов, не содержащих глютен. *Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 16-15-10410).*

ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

И.А. Гривенников[1], Е.В. Новосадова[1], С.А. Антонов[1] , Е.С. Мануилова[1], Е.Л. Арсеньева[1], М.А. Грефенштейн[1], А.М. Зыкова[1], А.Г. Кобылянский[1], В.В. Симонова[3], Л.Г. Хаспеков[3], О.С. Лебедева[2], М.А. Лагарькова[2], С.Н. Иллариошкин[3], В.З. Тарантул[1], Н.Ф. Мясоедов[1] *[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [3]Научный центр неврологии РАМН, Москва, Россия*

Технология репрограммирования соматических клеток и получения индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПС) клеток млекопитающих, включая человека, открыла новые перспективы в трансплантологии и изучении молекулярных и клеточных основ тяжелых болезней человека in vitro. Развитие этой технологии также открыло новые возможности для создания тест-систем, позволяющих проводить масштабный скрининг in vitro и выяснять свойства лекарственных средств с нейропротекторными свойствами, направленных на лечение конкретных заболеваний, учитывая при этом индивидуальные особенности пациента. Тот факт, что технология репрограммирования позволяет получать ИПС клетки из индивидуальных дифференцированных соматических клеток больных и здоровых пациентов создает ей существенные преимущества перед технологией ЭС клеток, а также первичных культур клеток животных. Развитие такой технологии в дальнейшем позволит существенным образом сократить эксперименты по тестированию перспективных для фармакологии соединений на клетках различных животных, а осуществлять их сразу на клетках человека. В результате проведенной работы создана многоуровневая тест-система позволяющая проводить оценку цито- и эмбриотоксических, также нейропротекторных и нейротоксических свойств веществ различной природы, включая соединения пептидной природы. В рамках апробации разработанной тест-системы проведено тестирование ряда пептидных аналогов меланокортинов и некоторых каннабиноидов на наличие нейропротекторных активности. Выявлено нейропротекторное действие ряда соединений в модели окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода. Показана возможность использования разработанной тест-системы для персонализированного отбора соединений представляющих фармакологический интерес. *Данная работа была поддержана грантами: Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий», Российского фонда фундаментальных исследований (№ 17-04-01661).*

ПЕПТИДЫ СЕМЕЙСТВА МЕЛАНОКОРТИНОВ СПОСОБНЫ МОДУЛИРОВАТЬ ЭКСПРЕССИЮ НЕЙРОНСПЕЦИФИЧНЫХ ГЕНОВ В ПРОЦЕССЕ НЕЙРОНАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Е.В. Новосадова, Е.Л. Арсеньева, Е.С. Мануилова, М.А. Грефенштейн, Н.Ф. Мясоедов, И.А. Гривенников
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (ИПСК) являются уникальным источником для получения неограниченного количества разнонаправленно дифференцированных клеток. Полученные клетки позволяют проводить разнообразные молекулярно-генетические исследования на разных этапах дифференцировки. В результате направленной дифференцировки ИПСК человека были получены коммитированные нейрональные предшественники. На полученных клетках проведено исследование способности пептидов семакс, альфа-МСГ и PGP модулировать экспрессию генов вовлеченных в нейрональную дифференцировку. С помощью метода ПЦР в реальном времени была показана повышенная экспрессия генов Nestin, Pax6, Nurr1, GDNF, AADS и пониженная – генов NT3, NGF, BDNF. Таким образом, нами показана способность исследуемых пептидов модулировать экспрессию нейронспецифичных генов на ранней стадии нейрональной дифференцировки ИПСК. *Работа поддержана грантами: РФФИ №17-04-01661, Программой Президиума РАН "Фундаментальные исследования для медицинских технологий".*

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОГО НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА

А.П. Богачук[1], З.И. Сторожева[2], Ю.А. Золотарев[3], Г.И. Ковалев[4], В.Н. Азев[5], А.Н. Мурашев[5], Д.И. Ржевский[5], Г.Б. Телегин[5], В.М. Липкин[1] *[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского; [3]Институт молекулярной генетики РАН; [4]НИИ фармакологии РАН, Москва; [5]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино Московской области, Россия*

Проведены полномасштабные доклинические исследования инновационного лекарственного средства на основе фрагмента фактора дифференцировки лейкоцитов - пептида HLDF-6, для лечения нейродегенеративных и цереброваскулярных

заболеваний. В целях увеличения времени жизни и усиления специфической активности пептида было проведено амидирование его С-концевой карбоксильной группы. В результате реализации проекта разработана оптимальная схема химического синтеза амидной формы пептида, разработана лекарственная форма для интраназального введения лекарственного средства на основе пептида, проведены его доклинические исследования. Изучение специфической активности на трех моделях болезни Альцгеймера (одна из них трансгенная) показало наличие несомненной нейропротекторной активности в отношении нарушенных когнитивных функций у испытуемых животных. Исследование различных доз позволило выявить дозу, при которой наблюдалось практически полное восстановление функций. На модели ишемического инсульта было показано, что пептид обеспечивает достоверный нейропротекторный эффект, защищая нейроны мозга от гибели. Были изучены общая токсичность (острая субхроническая и хроническая) и специфические виды токсичности (аллергенность, мутагенность, канцерогенность, иммунотоксичность и репродуктивная токсичность). Результаты показали, что исследуемый препарат в диапазоне изученных доз нетоксичен, безопасен и не обладает побочными эффектами. Выяснение механизма нейропротекторного и ноотропного действия фармацевтической субстанции методом радиолигандного анализа показало, что в него вовлечена глутаматергическая система гиппокампа, в частности, NMDA-тип рецепторов. В результате изучения фармакинетики и токсикокинетики ФС получены данные о биодоступности препарата (34%). Рассчитаны фармакокинетические параметры, изучено распределение пептида в крови и тканях. В результате выполнения работы получен патент на изобретение «Пептид, обладающий нейропротекторной и ноотропной активностью, и фармацевтическая композиция на его основе». В настоящее время проводятся формирование регистрационного досье и подготовка к клиническим исследованиям лекарственной формы на основе пептида.

АНКСИОЛИТИЧЕСКАЯ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕГУЛЯТОРНОГО ПЕПТИДА HLDF-6 НА МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И ТРЕВОЖНЫХ РАССТРОЙСТВ

Ю.А. Золотарев[1], Г.И. Ковалёв[2], Н.В. Кост[3], О.Ю. Соколов[3], А.К. Дадаян[1], В.С. Козик[1], С.И. Шрам[1], Е.В. Васильева[2], А.П. Богачук[4], В.М. Липкин[4], Н.Ф. Мясоедов[1] *[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]НИИ фармакологии им. В.В. Закусова; [3]Научный центр психического здоровья; [4]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Объектом данного исследования является новое амидное производное пептида HLDF-6 (Thr-Gly-Glu-Asn-His-Arg-NH2), аминокислотная последовательность которого соответствует фрагменту 41-46 фактора дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor). Ранее на экспериментальных моделях болезни Альцгеймера и ишемического инсульта было показано, что пептид HLDF-6-амид обладает высокой нейропротекторной активностью и обеспечивает практически полное восстановление когнитивных нарушений при этих патологиях. Впервые нами показано, что пептид HLDF-6 обладает также высокой противотревожной активностью и он свободен от нежелательных побочных эффектов, присущих бенздиазепинам. Механизм формирования специфической анксиолитической активности пептида HLDF-6-амида связан в первую очередь с воздействием на глутаматергическую рецепторную систему гиппокампа. Высокая психотропная активность делает пептид HLDF-6-амид перспективным в плане внедрения в клиническую практику в качестве высокоэффективного противотревожного средства для коррекции психических и неврологических расстройств. Используя экспериментальные модели болезни Паркинсона (БП), основанные на введении мышам токсина МФТП, нами впервые было показано, что хроническое трех недельное интраназальное введение пептида HLDF-6-амида приводит как к восстановлению нарушенной нигростриатной дофаминовой системы головного мозга, так и восстановлению нарушенных поведенческих функций животных. Изучение нейропротекторных свойств пептида HLDF-6-амида проводили на МФТП-моделях досимптомной и ранней клинической стадии БП созданных двукратным внутрибрюшинным введением мышам C57BL/6 нейротоксина МФТП в дозе 15 мг/кг. Показано, что введение МФТП с интервалом 10 часов приводит через три недели к 25% снижению уровня дофамина в стриатумах, в то время как введение тех же доз МФТП с интервалом 2 часа приводит к 50% снижению уровня дофамина. На модели досимптомной клинической стадии БП было показано, что в результате хронического трехнедельного интраназального введения пептида HLDF-6-амида в дозе 300 мкг/кг происходит достоверное увеличение с 74% до 87% от контроля уровня дофамина в стриатумах, что делает пептид HLDF-6-амид перспективным для создания на его основе лекарственного средства для лечения болезни Паркинсона.

ФАРМАКОКИНЕТИКА АЦЕТАМИДНОЙ ФОРМЫ ПЕПТИДА HLDF-6 В ТКАНЯХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ И ДЕЙТЕРИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ

А.К. Дадаян[1], Ю.А. Золотарев[1], В.С. Козик[1], С.И. Шрам[1], И.Ю. Нагаев[1], В.Н. Азев[2], А.П. Богачук[3], В.М. Липкин[3], Н.Ф. Мясоедов[1] *[1]Институт молекулярной генетики РАН, Москва; [2]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино; 3 Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Объектом данного исследования является ацетамидное производное пептида HLDF-6 (Ac-TGENHR-NH2), аминокислотная последовательность которого соответствует фрагменту 41TGENHR46 фактора дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor). Пептид HLDF-6 полностью воспроизводит дифференцирующую активность полноразмерного фактора и ранее для него на экспериментальных животных была показана высокая противоопухолевая активность. В сравнительных экспериментах было показано, что введение ацетамидной защиты позволяет повысить противоопухолевую активность пептида HLDF-6. Фармакокинетика и механизм биотрансформации пептида Ac-TGENHR-NH2 были исследованы с использованием меченных тритием и дейтерием производных этого пептида. Меченые производные пептида Ac-TGENHR-NH2 были получены с использованием реакции высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО). Меченный тритием пептид [3H]Ac-TGENHR-NH2 получен с молярной радиоактивностью 82 Ки/ммоль и меченный дейтерием пептид [2H]Ac-TGENHR-NH2 - со средним включением дейтерия равным 2,9 атомов на молекулу пептида. Анализ распределения изотопной метки по молекуле пептида был выполнен MS-методом. Разработан метод количественного определения пептида Ac-TGENHR-NH2 и всех возможных фрагментов его биодеградации в тканях организма. С использованием меченного тритием производного проведен количественный анализ основных метаболитов пептида Ac-TGENHR-NH2, образующихся при его протеолитическом расщеплении в плазме крови, а также была исследована фармакокинетика этого пептида и его основных метаболитов при внутривенном введении пептида мышам, крысам и кроликам. На основе полученных фармакокинетических профилей Ac-TGENHR-NH2 в крови были рассчитаны значения основных фарма-

кокинетических параметров, проверена гипотеза линейности и изучен метаболизм данного пептида в тканях мыши. Показано, что биодеградация защищенного пептида происходит в результате отщепления С-концевого дипептида HR-NH2. Исследованный пептид Ac-TGENHR-NH2 обладает высокой устойчивостью к протеолитическому гидролизу *in vivo* и *in vitro*. Показано, что, период полудеградации пептида после его внутривенного введения кролику составляет в крови 5 мин, а для основного долгоживущего фрагмента HR-NH2 – 8 мин.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

НОВЫЙ ДИПЕПТИДНЫЙ ЛИГАНД TSPO: СИНТЕЗ И АНКСИОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

О.А. Деева, М.А. Яркова, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин
НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия

18 kDa транслокаторный белок (TSPO), ранее известный как периферический бензодиазепиновый рецептор, участвует в транспорте холестерина от внешней к внутренней митохондриальной мембране, что является лимитирующей стадией в синтезе нейростероидов, которые обладают выраженной анксиолитической активностью [Rupprecht R., Nat. Rev. Drug Discov. 2010]. Ранее нами с использованием собственной оригинальной стратегии пептидного дизайна был получен первый дипептидный лиганд TSPO амид N-карбобензокси-L-триптофанил-L-изолейцина, лабораторный шифр ГД-23 [Гудашева Т.А. и др., ДАН, 2015]. Для дипептида ГД-23 было показано наличие анксиолитической активности в батарее валидированных фармакологических тестов у грызунов в интервале доз 0.1-1.0 мг/кг при внутрибрюшинном и пероральном введении. С помощью фармакологического ингибиторного анализа были доказаны его лигандные свойства [Гудашева Т.А. и др., ДАН 2016]. Проведение молекулярного докинга ГД-23 в активный центр рецептора с помощью программы AutoDock Vina 1.1.2. позволило нам уточнить структуру дипептидного лиганда TSPO: боковая цепь остатка Ile в структуре ГД-23 была заменена на менее разветвленную боковую цепь остатка Leu, а бензилоксикарбонильный радикал при Trp - на фенилпропионильный, что, не нарушая гидрофобных лиганд-рецепторных взаимодействий в активном центре, позволило уменьшить стерические затруднения положения лиганда в кармане. На этом основании нами синтезировано соединение амид N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, получивший лабораторный шифр ГД-102. В фармакологическом эксперименте для него подтверждено наличие анксиолитической активности, которая проявлялась в дозах на порядок меньших, чем у исходного ГД-23. Полученные результаты не противоречат литературным данным, что для связывания с активным сайтом рецептора TSPO необходима высокая гидрофобность фармакофорных групп лиганда. Таким образом, нами получен новый дипептидный лиганд TSPO, который может стать основой для развития анксиолитиков с новым механизмом действия. *Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-00861.*

ГЕПТАПЕПТИД СЕЛАНК КАК МОДУЛЯТОР ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГАМК-РЕЦЕПТОРНОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА

Т.В. Вьюнова[1], Л.А. Андреева[1], К.В. Шевченко[1], Н.Ф. Мясоедов[1,2]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]Научный центр психического здоровья, Москва, Россия

В последние годы все чаще при лечении и профилактике нервных расстройств и неустойчивых эмоциональных состояний психики применяют лекарственные препараты на основе пептидов. Тревожность является наиболее распространенными проблемами психического здоровья по всему миру. Без своевременного лечения, они могут привести к более серьезным психическим и психосоматическим нарушениям. Механизм действия наиболее часто применяемых в клинической практике анксиолитиков основан на фармакологической коррекции уровня активности ГАМК-эргической нейрорецепторной системы головного мозга. “Классические” ГАМК-эргические препараты (бензодиазепины, в частности) действуют быстро и хорошо переносимы, однако хроническое их применение приводит к возникновению у пациентов широкого спектра клинических проблем: зависимость, ухудшение памяти, сонливость и т.д. Гептапептид Селанк, характеризуемый по фармакологической активности как «мягкий» нетипичный анксиолитик, является, по-видимому, аллостерическим модулятором ГАМК рецепторов. Хроническое применение Селанка не вызывает негативных побочных эффектов. В представленном исследовании показано, что одним из молекулярных механизмов, предположительно лежащих в основе анксиолитического действия селанка, может являться эффект селективного дозозависимого аллостерического регулирования функциональной активности рецепторов ГАМК. Исследовано также сочетанное влияние на связывание меченной тритием ГАМК пептидов и непептидных аллостерических модуляторов ГАМК(А) рецепторов, применяемых в медицинской практике. Установлено, что в определенном диапазоне концентраций селанк способен усиливать связывание радиолиганда ([^{3}H]ГАМК), а при совместном введении с бензодиазепинами - частично блокировать собственные эффекты указанных выше препаратов на связывание меченной тритием ГАМК. Места специфических взаимодействий селанка и указанных выше бензодиазепинов не идентичны, но могут частично перекрываться. *Работа выполнена при финансовой поддержке программы исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» № 0^{1}20^{1}353020.*

ОЛИГОПЕПТИДЫ КАК КОРРЕКТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА СТАРЕЮЩИХ КЛЕТОК КРОВИ

С.В. Жарков[1,2], Д.А. Сентябрева[2], И.В. Гаврилов[1,2], В.А. Лукаш[1,2], Т.Ю. Вержбицкая[1], В.Н. Мещанинов[1,2], В.Х. Хавинсон[3]
[1]Лаборатория антивозрастных технологий, Институт медицинских клеточных технологий; [2]Кафедра биохимии Уральского государственного медицинского университета, Екатеринбург; [3]Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАН, Санкт-Петербург, Россия

Переливание крови в медицинской практике сопряжено со снижением функциональных свойств крови во время ее забора, консервации, хранения и транспортировки, что моделирует процесс ускоренного старения (Анисимов В.Н., 20^{1}0). Олигопептиды пинеалон (глу-асп-арг), везуген (лиз-глу-асп) и кристаген (про-глу-асп) обладают цитопротекторными и антиоксидантными свойствами, геропрофилактическим влиянием на состояние клеточных мембран и на пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток (Хавинсон В.Х. с соавт.,20^{1}5; Мещанинов В.Н. с соавт., 20^{1}6). Они могут стать потенциальными консервантами и продлить срок хранения донорской крови. Цель исследования: выявить влияние пинеалона, везугена и кри-

стагена на изменение клеточного и биохимического состава крови пациентов в условиях ее хранения *in vitro*. Исследованы образцы донорской крови, стабилизированной ЭДТА, с конечной концентрацией пинеалона, везугена и кристагена (Химико-биологическое объединение при РАН «Фирма Вита», Санкт-Петербург, Россия) 20 мкг/мл и пробы без добавления олигопептидов. Пробы отбирались до начала инкубации, через 24, 48 и 72 часа хранения при 4 градусах Цельсия. Плазма крови использовалась для исследования биохимических показателей («Chem Well 29[1]0 Combi» Awareness Technology, США, реагенты «Sentinel Diagnostics», Италия) и хемилюминесценции («Lucy 3» Anthos Labtec Instruments, Австрия) как показателя перекисного окисления липидов. В цельной крови определяли содержание клеток («PCE – 90Vet» HTI, США), маркеры гемопоэтических стволовых клеток CD34+ («BD FACS Canto II» Becton & Dickinson, США), осмотическую и перекисную резистентность эритроцитов. Обнаружено ингибирующее гликолиз действие трипептидов пинеалона (глу-асп-арг), везугена (лиз-глу-асп) и кристагена (про-глу-асп). Исследованные вещества обладают эффектом, стимулирующим пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток крови и увеличивающим резистентность эритроцитов к окислительному стрессу. Трипептиды эффективны и перспективны для применения в качестве стабилизаторов форменных элементов крови при ее консервации и хранении. Они сохраняют состояние клеток в условиях их ускоренного старения под влиянием воздействия повреждающих факторов и увеличивают время их жизнеспособности.

ИЗУЧЕНИЕ СОВМЕСТНОГО ЭФФЕКТА АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ТАХИПЛЕЗИНА I И ЦИСПЛАТИНА НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

М.Б. Калашникова, А.А. Емельянова, Д.В. Кузьмин, П.В. Пантелеев, Т.В. Овчинникова
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Одной из наиболее перспективных терапевтических стратегий, позволяющих преодолеть резистентность опухолевых клеток, является комбинированная химиотерапия, основанная на одновременном применении двух и более цитотоксических или цитостатических агентов. С целью составления наиболее эффективных комбинаций действующих веществ используются соединения, принадлежащие к различным структурным классам и действующие на разные клеточные мишени. В данной работе было изучено совместное действие на опухолевые клетки рекомбинантного β-шпилечного антимикробного пептида тахиплезина I из мечехвоста *Tachypleus tridentatus* и цитостатика цисплатина.

На первом этапе с помощью МТТ-теста была проведена оценка выживаемости нормальных и опухолевых клеток при индивидуальном действии тахиплезина I или цисплатина, затем были рассчитаны значения концентраций полумаксимального ингибирования (IC_{50}). Оценка неспецифической токсичности действующих веществ проводилась на нормальных клеточных линиях – астроцитах и фибробластах человека. Было показано, что цисплатин в концентрации 10 мкМ вызывал гибель более 50% астроцитов и фибробластов. При действии тахиплезина I в концентрациях, превышающих 20 мкМ, погибала половина астроцитов. При составлении комбинации были взяты индивидуальные компоненты в концентрациях, не превышающих наименьшие значения IC_{50} для каждого из веществ, определенных для нормальных клеток. Были проведены серийные разведения тахиплезина I в диапазоне концентраций от 20 мкМ до 2,5 мкМ, цисплатин был использован в концентрации 5 мкМ. Экспериментальные данные, полученные с помощью МТТ-теста, указывают на то, что оптимальным сочетанием является 5 мкМ цисплатин и 10 мкМ тахиплезин I. Такая комбинация действующих веществ оказывает наибольший цитотоксический эффект на опухолевые клетки, вызывая гибель 52±3% фибробластов и 45±3% астроцитов. Показано, что добавление тахиплезина I сенсибилизирует опухолевые клетки по отношению к цисплатину, тем самым позволяя снизить эффективную концентрацию и неспецифическую токсичность цисплатина.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОТЕАЗЫ 3C ВИРУСА ГЕПАТИТА А ЧЕЛОВЕКА И ГИБРИДНОГО БЕЛКА FCU[1] ПРИ КОЭКСПРЕССИИ В СОСТАВЕ БИЦИСТРОННОГО ВЕКТОРА

М.А. Карасева, А.А. Комиссаров, И.В. Демидюк, Д.Р. Сафина, М.П. Рощина, Н.А. Лунина, С.В. Костров
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Генная терапия – многообещающий подход к лечению онкологических заболеваний. Однако применению данного подхода в клинической практике препятствует целый ряд проблем, одной из которых является ограниченность действия генно-терапевтических препаратов определенным типом опухолей или определенным типом опухолевых клеток. Для решения этой проблемы может быть применен подход, основанный на комбинировании терапевтических генов, продукты которых обладают разными механизмами действия. В данной работе мы впервые оценили цитотоксический эффект при совместном действии протеазы 3C вируса гепатита А человека (3C) и суицидальной системы, состоящей из гена слитого белка дрожжевых цитозиндезаминазы/фосфорибозилтрансферазы (FCU^1) и пролекарства 5-фторцитозина (5-ФЦ). Для этого гены FCU^1 и 3C были интегрированы в составе бицистронного плазмидного вектора с использованием последовательности, кодирующей 2A пептид вируса Тешена свиней. Для оценки цитотоксического эффекта использовались линии клеток человека HEK293 и HeLa. Было установлено, что действие FCU^1 и протеазы 3C проявляется по-разному. При индивидуальном действии FCU^1/5-ФЦ количество жизнеспособных клеток в культуре уменьшалось постепенно и максимальный эффект наблюдался к концу эксперимента – [1]68 ч после трансфекции (п.т.). Наибольший эффект 3C, напротив, был обнаружен в первой экспериментальной точке (24 ч п.т.), а затем количество живых клеток увеличивалось и практически сравнивалось с контролем. Комбинация генов FCU^1 и 3C в составе бицистронного вектора не препятствовала проявлению индивидуального действия каждого фермента и приводила к суммированию их цитотоксических эффектов. При этом значимой синергии не наблюдалось.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕПТИДА Ueq 12-1, СЕЛЕКТИВНО ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩЕГО С TRPA1-РЕЦЕПТОРАМИ

Ю.А. Паликова[1], В.А. Паликов[1], Я.А. Андреев[2], И.А. Дьяченко[1], А.Н. Мурашев[1]
[1]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Морские анемоны, как известно, являются продуцентами биологически активных пептидов, и из-за того, что *U. eques* в значительной степени не изучен, сотрудники лаборатории биорецепторов и биорегуляторов ИБХ РАН стремились выделить и идентифицировать новые биоактивные пептиды в *U. eques*. Им удалось выделить и охарактеризовать новый пептид Ueq 12-1 с необычным распределением цистеина и новым молекулярным каркасом, обеспечивающим как антимикробные, так и антиноцицептивные свойства. Целью работы является изучение анальгетической активности рекомбинантного пептида Ueq 12-1 на мышах ICR. Пептид исследовали в тесте гиперчувствительности, спровоцированной CFA. Мышей разделили на 3 группы по 7 в каждой. Воспаление у мышей, кроме контрольной группы, индуцировали с использованием полного адъюванта Фрейнда (CFA), суспендированного в эмульсию CFA/физиологический раствор (1:1). Мышам вводили 20 мкл эмульсии CFA в подошвенную поверхность левой задней лапы. Контрольным мышам вводили 20 мкл физиологического раствора. Через 24 часа внутривенно вводят 200 мкл физиологического раствора животным групп «без CFA» и «физ. раствор», остальным группам внутривенно вводят раствор пептида в стерильном физиологическом растворе в дозах 0,2 мг/кг и 1 мг/кг. Время отдергивания левой задней лапы регистрировали с использованием горячей пластины (53°C) через 30 мин после введения пептида или физиологического раствора. Диаметр лапы оценивали до внутривенного введения пептида и через 2, 4, 24 часа после введения пептида Ueq 12-1 или введения физиологического раствора с использованием электронного цифрового штангенциркуля. Результаты: было исследовано влияние внутривенной инъекции Ueq 12-1 в дозе 0,2 и 1 мг/кг на неспецифическое воспаление с использованием теста гиперчувствительности, индуцированной полным адъювантом Фрейнда (CFA). Пептид достоверно снижал тепловую гипералгезию в обеих дозах и уменьшил отек лапы на 27% через 24 ч после инъекции в дозе 0,2 мг/кг.

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ МОДИФИКАЦИЙ МОЛЕКУЛЫ ПЕПТИДА GHK НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ У КРЫС

О.И. Сороколетова, А.Е. Белых, И.И. Бобынцев *Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия*

Целью исследования являлось изучение влияния трипептида Gly-His-Lys (GHK) и его структурных аналогов Gly-His-D-Lys, D-Ala-Gly-His-Lys и Gly-His-Lys-D-Ala на поведение крыс-самцов Вистар в тесте «открытое поле». Пептиды вводили внутрибрюшинно за $^{1}2$ мин до начала исследования в дозах 0,5, 5 и 50 мкг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора. Трипептид GHK во всех использованных дозах оказывал выраженное влияние на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность, эмоциональное состояние животных. Наиболее выраженное влияние на исследованные формы поведения пептид оказывал после введения пептида в дозе 0,5 мкг/кг. Характер изменения ориентировочно-исследовательской активности в различных отделах экспериментальной установки и реакций груминга свидетельствуют об анксиолитической направленности выявленных эффектов пептида. Замена L-лизина на D-лизин в молекуле GHK способствовала нивелированию выявленных анксиолитических эффектов природной молекулы, а после введения данного структурного аналога в дозе 50 мкг/кг наблюдалось изменение направленности его действия на анксиогенное, что проявилось снижением ориентировочно-исследовательской активности животных. Присоединение D-аланина к N-концу молекулы GHK так же вызывало существенное изменение характера эффектов пептида. При этом поведенческие эффекты GHK полностью нивелировались, а после введения в дозе 5 мкг/кг их направленность изменялась на противоположную. Присоединение к C-концу молекулы GHK D-аланина способствовало ослаблению ее влияния на все исследованные формы поведение крыс, а после введения в дозе 50 мкг/кг наблюдалось достоверное проявление показателей тревожности. Таким образом, пептид GHK оказывает выраженное влияние на поведение крыс в тесте «открытое поле» с преимущественно анксиолитической направленностью, наиболее выраженной после введения пептида в дозе 0,5 мкг/кг. Замена L-лизина на D-лизин в молекуле GHK, присоединение D-аланина к C- или N-концу способствовали нивелированию выявленных поведенческих эффектов, а в отдельных случаях изменению их направленности и усилению проявлений тревожности.

КОНКУРС МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

КОНЪЮГАТЫ ЦИТОКИНОВ С БИФОСФОНАТОМ ДЛЯ ТЕРАПИИ КОСТНЫХ МЕТАСТАЗОВ

Е.А. Волосникова, Л.Р. Лебедев, А.В. Батенева, Е.Д. Даниленко
Институт медицинской биотехнологии ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская обл., Бердск, Россия

Разработаны методы синтеза препаратов конъюгатов для лечения костных метастазов на основе рекомбинантных противоопухолевых цитокинов: фактора некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) и аналога интерферона гамма (Дельтаферона) с векторными молекулами. В качестве векторов для направленной доставки цитокинов в костные метастазы был использован представитель класса бисфосфонатов алендроновая кислота. Конъюгаты получали двумя способами: прямым конъюгированием молекул белка и бифосфоната и с использованием спейсера. Первый метод заключался в ковалентном присоединении алендроновой кислоты к молекуле цитокина в трех вариантах: через сульфгидрильную, карбоксильную и аминогруппы белка с помощью сшивающих агентов разных типов. Реакции проводили, фиксируя компоненты на твердой фазе. Гомогенность полученных продуктов составила 95% при выходе около 90%. Во втором случае в качестве спейсера использовали аминодекстран, активированный периодатом натрия. Присоединение молекул белка проходило по аминогруппам. Оценка специфической активности цитокинов в культуре клеток L929 и L-68 показала, что удельная активность конъюгированных белков сохранялась на высоком уровне. При использовании первого варианта в составе конъюгатов активность ФНО-альфа составляла $(2–3)\times10^7$ МЕ/мг белка, Дельтаферона – $(1–2)\times10^7$ МЕ/мг. Для конъюгатов ФНО-альфа, полученных с использованием спейсера – $(68)\times10^6$ МЕ/мг; для конъюгатов Дельтаферона – $(6–9)\times10^5$ МЕ/мг. На модели костных метастазов, индуцированных введением мышам клеток лимфоцитарного лейкоза L1210/1, методом ИФА установлено, что полученные конъюгаты отличались более высокой способностью к накоплению в опухолевой ткани метастазов, по сравнению с исходными белками.

Содержание ФНО-альфа, конъюгированного с алендроновой кислотой, в ткани опухоли превышало контрольный уровень в 1000 раз, Дельтаферона-в 4 раза. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки на основе конъюгатов ФНО-альфа и аналога интерферона гамма с алендроновой кислотой нового средства терапии костных метастазов опухолей.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА СЕМАКС НА ТРАНСКРИПТОМ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИ ОБРАТИМОЙ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА КРЫС

И.Б. Филиппенков[1], В.В. Ставчанский[1], А.Е. Денисова[2], Е.В. Медведева[1], К.А. Иванова[1], О.Ю. Сударкина[1], В.Г. Дмитриева[1], Л.В. Дергунова[1,2], Н.Ф. Мясоедов[1], С.А. Лимборская[1,2] *[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

Синтетический пептид семакс, состоящий из фрагмента АКТГ(4-7) (Met-Glu-His-Phe) и С-концевого трипептида PGP (Pro-Gly-Pro), успешно используют при лечении больных с тяжелыми нарушениями мозгового кровообращения. Церебральная ишемия – наиболее распространенная причина нарушений функций мозга. Анализ транскриптома является одним из подходов к изучению функционирования мозга в нормальном состоянии, при ишемии и при действии семакса. Работа направлена на изучение механизма действия семакса и поиск метаболических мишеней воздействия данного пептидного препарата при ишемии.

В анализе использована экспериментальная модель ишемического инсульта у крыс, которая заключается в обратимой окклюзии правой средней мозговой артерии с использованием филамента. Данная модель является наиболее близкой ишемическому инсульту у человека. В условиях модели с помощью «RNA-Seq» проведен полнотранскриптомный анализ изменений содержания мРНК в подкорковых структурах мозга крыс, содержащих очаг повреждения, под воздействием семакса относительно ишемии. Спустя 24 ч после окклюзии выявлены достоверные изменения экспрессии 654 генов. Под воздействием семакса отмечается компенсаторный эффект – снижение уровня мРНК 245 генов (*Hspa1a*, *Fos*, *Lrg1* и других) и увеличение уровня мРНК 328 генов (*Gabra5*, *Neurod6*, *Cplx2* и других), на экспрессию которых ишемия оказала противоположное воздействие. Биоинформатический анализ результатов с помощью программы DAVID v6.8 показывает, что гены, повысившие экспрессию при ишемии и воздействии семакса, относятся к сигнальным путям, связанным с нейротрансмиссией – кальциевый сигнальный путь ($p=9{,}4\cdot10^{-4}$), глутаматергические синапсы ($p=1{,}0\cdot10^{-3}$), холинергические синапсы ($p=2{,}0\cdot10^{-2}$), дофаминергические синапсы ($p=2{,}1\cdot10^{-2}$) и другие. При этом гены, понизившие экспрессию, относятся к сигнальным путям, связанным с воспалением – трансэндотелиальная миграция лейкоцитов ($p=1{,}4\cdot10^{-2}$), молекулы клеточной адгезии ($p=4{,}0\cdot10^{-2}$) и другие. Результаты анализа указывают на комплексный ответ генома клеток мозга на воздействие семакса и свидетельствуют о нейропротективных свойствах данного пептидного препарата при ишемии. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (16-14-00077).*

ПОДАВЛЕНИЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ РАКОВЫХ КЛЕТОК БЕЛКАМИ ЧЕЛОВЕКА SLURP-1 И SLURP-2

М.А. Шулепко[1,2], М.Л. Бычков[1], А.В. Ефременко[1,2], Г.В. Шаронов[1,2], Д.С. Кульбацкий[1,2], З.О. Шенкарев[1,3], А.В. Феофанов[1,2], Д.А. Долгих[1,2], М.П. Кирпичников[1,2], Е.Н. Люкманова[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва; [2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Московский физико-технический институт, Москва, Россия

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) являются лигандозависимыми ионными каналами, экспрессирующимися во многих тканях организма и участвующими в регуляции ключевых клеточных процессов. В опухолевых клетках nAChR вовлечены в процессы пролиферации, миграции, инвазии, ангиогенеза и апоптоза. Таким образом, nAChR представляет собой перспективную мишень для терапии онкологических заболеваний, а антагонисты nAChR могут стать новыми эффективными противоопухолевыми препаратами, прототипами которых являются секретируемые белки человека SLURP-1 и SLURP-2. Ранее нами была разработана система бактериальной продукции SLURP-1 и SLURP-2, и показано, что оба белка являются антагонистами nAChR. Задачей данной работы было исследование антипролиферативной активности SLURP-1 и SLURP-2 на опухолевых линиях эпителиального и глиального происхождения. Мы обнаружили, что SLURP-1 и SLURP-2 эффективно подавляют рост клеток меланомы (линия A431), рака груди (линии SKBR3 и MCF-7) и колоректальной карциномы (линия HT-29), но не ингибируют рост глиобластом (линии A172 и U257MG). В случае немелкоклеточного рака легкого (линия A549) SLURP-1 ингибирует рост раковых клеток, а SLURP-2, наоборот, стимулирует их пролиферцию. На клетках меланомы A431 показано, что антипролиферативный эффект белков SLURP обусловлен взаимодействием именно с nAChR, но не с β-адренергическими рецепторами или EGFR. Показано, что добавление к клеткам препарата рекомбинантного SLURP-1 уменьшает экспрессию гена α7-nAChR и стимулирует секрецию эндогенного SLURP-1. На клетках рака легкого A549 показано, что SLURP-1 тоже подавляет экспрессию α7-nAChR и вызывает секрецию эндогенного регулятора, а также полностью отменяет стимулирующий пролиферацию эффект никотина. Исследование совместного действия белков SLURP и гефитиниба (IRESSA™), препарата, применяющегося в настоящее время для терапии ряда онкологических заболеваний, выявило аддитивное усиление антипролиферативной активности, приводящее к полной остановке роста клеток A431 и A549 в течение суток. Полученные данные позволяют рассматривать SLURP-1 и SLURP-2 как перспективные эндогенные препараты для терапии раковых опухолей эпителиального происхождения. *Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (№ 16-04-01697) и РАН (Программа «МКБ»).*

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ ПРИРОДНЫХ ИНГИБИТОРОВ ТРОМБИНА

М.А. Костромина[1], Е.А. Туховская[2], Э.Р. Шайхутдинова[2], А.Н. Мурашев[2], Р.С. Есипов[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

Внедрение антитромботических препаратов прямого действия, таких как ингибиторы тромбина и фактора Xa, в медицинскую практику при венозных тромбоэмболиях обусловлено высокими рисками побочных эффектов при стандартной терапии препаратами группы гепаринов. Производные природного ингибитора тромбина гирудина из пиявки *Hirudo*

medicinalis, дезирудин под торговой маркой Iprivask (Canyon Pharmaceuticals, США) одобрен для терапии тромбоза глубоких вен после проведения ортопедических операций по замене тазобедренных и коленных суставов, а его модифицированный С-концевой фрагмент, бивалирудин под торговой маркой Angiomax/Angiox (The Medicines Company, США) – для терапии при проведении чрескожного транслюминального коронарного вмешательства. Данная работа посвящена исследованию антитромботического потенциала рекомбинантных аналогов ряда природных ингибиторов тромбина прямого действия: гаемадина из пиявки *Haemadipsa sylvestris*, анофелина из комара *Anopheles albimanus* и вариегина из клеща *Amblyomma variegatum* в сравнении с рекомбинантным гирудином-1, нефракционированным гепарином и этексилатом дабигатрана (Pradaxa, Boehringer Ingelheim, Германия). Было проведено комплексное исследование антитромботической активности препаратов, включающее: определение антитромботической активности *in vitro* с помощью амидолитического теста; влияние препаратов на изменение времен свертывания плазмы крови человека (тромбинового, протромбинового и активированного частичного тромбопластинового времен); установлены фармакодинамические эффекты при внутривенном введении мышам линии CD-1. Для исследования специфической антитромботической активности in vivo были использованы модели хвостового кровотечения и венозного тромбоза на фоне гиперкоагуляции на крысах Sprague Dawley. На основании полученных результатов наиболее перспективными для дальнейших исследований являются вариегин и гаемадин.

РАЗРАБОТКА БЛОКАТОРОВ ТОЧЕК КОНТРОЛЯ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

С.В. Подлесных[1], Е.А. Колосова[1], Д.С. Анисимов[1], Д.Н. Щербаков[1], М.А. Рязанов[1], С.А. Джонстон[2], А.Ф. Лазарев[3], А.И. Шаповал[1,2]
[1]Российско-американский противораковый центр, Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия, [2]Центр инноваций в медицине, Институт биодизайна, Университет штата Аризона, Темпи, Аризона, США, [3]Алтайский филиал РОНЦ им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Барнаул, Россия

Блокада точек контроля иммунного ответа (от англ. immune checkpoints) является одной из наиболее перспективных стратегий для активации собственного противоопухолевого иммунитета у онкологических пациентов. Эта стратегия показала высокую эффективность. Снижение иммунитета происходит за счет взаимодействия клеток опухоли с молекулами (ингибиторные точки контроля иммунного ответа) на Т-лимфоцитах. Если блокировать это взаимодействие, Т-лимфоциты вновь приобретают способность уничтожать раковые клетки, что приводит к отторжению опухоли. К ингибиторным точкам контроля, в первую очередь, относят молекулы семейств B7, такие как PD-1, CTLA4, B7-H1(PD-L1), B7-H4 и др. Современные стратегии блокады контрольных точек включают использование моноклональных антител. Блокада молекул CTLA-4, PD-1 или PD-L1, с помощью моноклональных антител (Yervoy, Keytruda, Opdivo, или Avelumab), показала значительные клинические эффекты при терапии онкологических заболеваний. Мы предлагаем использовать вместо моноклональных антител – пептиды, которые блокируют функции ингибиторных точек контроля иммунного ответа. Пептиды могут обеспечить альтернативный подход к манипуляции иммунным ответом против рака, за счет того, что они имеют малый размер, не иммуногены и могут быть химически синтезированы, что существенно снижает затраты на их производство для использования в клиниках. Используя микрочипы, на которых представлены 120 тыс. пептидов со случайными аминокислотными последовательностями длинной в 12-15 аминокислот, мы выявили пептиды, которые взаимодействуют с молекулами, контролирующими иммунный ответ. Учитывая то, что пептиды могут иметь короткий период полураспада, при введении в организм, мы планируем использовать пептиды, в состав которых входят D-аминокислоты. Альтернативно, пептиды могут быть включены в состав белка-носителя. Окончательный отбор пептидов производиться на основе их способности блокировать функции точек контроля иммунного ответа и стимулировать иммунитет. Предлагаемый комплексный анализ позволит достоверно оценить возможность пептидов регулировать продукцию цитокинов, активацию, цитотоксичность и пролиферацию Т-лимфоцитов *in vitro* и *in vivo*, что послужит основой для разработки новых иммуномодулирующих препаратов для иммунотерапии онкологических заболеваний.

N-(СУЛЬФОНИЛ)-ФОСФОРАМИДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ (СФО) КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АНТИСМЫСЛОВЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

Д.В. Прохорова, Б.П. Челобанов, А.Е. Захрямина, С.В. Васильева, А.А. Фокина, Е.А. Буракова, Д.А. Стеценко
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Аналоги ДНК, модифицированные по межнуклеотидной фосфатной группе, рассматриваются как перспективные терапевтические препараты для лечения рака, генетических болезней, вирусных и бактериальных инфекций. Ранее мы показали, что олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие одну или несколько N-(тозил)-фосфорамидных групп, могут образовывать устойчивые комплексы с ДНК и РНК, однако оставались неизвестными производные, замещенные по всем фосфатным группам [1]. Доклад посвящен синтезу новых N-(сульфонил)-фосфорамидных олигодезоксирибонуклеотидов (СФО), в которых фосфатные группы полностью замещены N-тозилфосфорамидными и др. группами. Из них N-мезилфосфорамидные олигодезоксинуклеотиды образуют наиболее прочные комплементарные комплексы как с ДНК, так и с РНК, устойчивы к нуклеазам, нецитотоксичны и способны вызывать необратимое расщепление РНК путем активации клеточной РНКазы H [2]. Это позволяет рассматривать данные аналоги ДНК как перспективную основу для создания антисмысловых терапевтических препаратов.

Литература

1. Прохорова Д.В., Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Фокина А.А., Стеценко Д.А. Новые производные олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие межнуклеотидную N-тозилфосфорамидную группу: синтез и взаимодействие с комплементарными последовательностями ДНК и РНК. // Биоорган. Хим. - 2017. - Т. 43. - N. 1. - С. 45–50.
2. Стеценко Д.А., Челобанов Б.П., Фокина А.А., Буракова Е.А., заявка на патент РФ № 2017105743 от 21.02.2017.

IN SILICO МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕПТИДНЫХ РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ

А.О. Якушева, А.А. Митрофанов *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Ядерная медицина – направление медицины, использующее радиоактивные вещества, радиофармпрепараты, для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Радиофармпрепарат включает в себя биологический вектор (пептиды, антите-

ла), отвечающий за направленную доставку к очагу поражения, радионуклид, несущий лечебную дозу ионизирующего излучения, и лиганд, обладающий сродством как к биологической молекуле, так и к иону радионуклида. Рассматриваемыми лигандами являются соединения из класса азакраун-эфиров, образующие комплексы с f-элементами. Для определения перспективных центров связывания и оценки среднего времени образования комплекса пептид-хелатор для каждой системы с различными лигандами производился расчет траектории методом молекулярной динамики. По результатам расчетов определялось время образования конъюгата. Исследуемый пептид – октреотид, аналог гормона соматостатина. Существует пять типов соматостатиновых рецепторов (sst1–sst5), обладающих повышенной экспрессией на поверхности нейроэндокринных опухолей. Известно, что октреотид способен связываться с двумя из них, sst2 и sst5. Для предсказания наиболее выгодной ориентации для образования комплекса рецептора с пептидом была получена третичная структура для всех соматостатиновых рецепторов, а затем проведен молекулярный докинг. По результатам полученных моделей выбиралась модель с наибольшей энергией связи. Таким образом, с помощью методов молекулярной динамики рассчитаны траектории движения систем хелатор-пептид, металл-хелатор-пептид; получено среднее время образования конъюгата; с помощью молекулярного докинга проанализировано взаимодействие исследуемой системы с рецепторами соматостатинового ряда и белками плазмы крови.

УЧАСТИЕ БЕЗ ДОКЛАДА

СИСТЕМА ДОСТАВКИ ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДНЫХ АНАЛОГОВ В КЛЕТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ SiO_2

С.В. Васильева[1], А.А. Штиль[2], А.С. Петрова[2], С.М. Балахнин[3], П.Ю. Ачигешева[4], Б.П. Челобанов[1], И.Р. Грин[1], В.Н. Сильников[1], Д.А. Стеценко[1] *[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [2]Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва ;[3]Институт молекулярной патологии и патоморфологии, Новосибирск; [4]Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия*

Аналоги нуклеозидов широко используются в клинической практике. Однако химическая модификация нуклеозида может отрицательно повлиять на его взаимодействие с транспортными системами клетки, узнавание соответствующими киназами и скорость фосфорилирования. Высокие дозы могут вызывать токсические эффекты и развитие устойчивости к препарату. Решением этой проблемы может быть использование фосфорилированных форм: моно-, ди- или трифосфатов, однако они не проникают в клетки. Авторы предложили использовать в качестве системы доставки наночастицы SiO_2 с ковалентно-присоединенными трифосфатами аналогов нуклеозидов (дНТФ) [1]. Нанокомпозиты SiO_2~дНТФ были получены с помощью клик-химии (CuAAC) из азидо- либо алкинилмодифицированных наночастиц SiO_2 и дНТФ, содержащих алкинилированный гамма-фосфат или азидотимидинтрифосфата соответственно. С помощью конфокальной микроскопии было показано, что нанокомпозиты SiO_2~дНТФ проникают в цитоплазму и ядра клеток [1]. Нанокомпозит SiO_2~дЦТФ является субстратом фрагмента Кленова и обратной транскриптазы ВИЧ-1 [2]. Скорость включения в растущую цепь ДНК связанного с наночастицами и свободного дЦТФ отличалась лишь незначительно. Полученные нанокомпозиты, содержащие трифосфаты противовирусных препаратов залцитабина, зидовудина, ламивудина и дидезоксиуридина (последний нуклеозид неактивен против ВИЧ-1) проявили себя мощными ингибиторами пролиферации клеток карциномы кишечника HCT116. Была показана также противовирусная активность нанокомпозитов в отношении ВИЧ-1 [3]. Результаты позволяют заключить, что наночастицы SiO_2 могут быть эффективной системой доставки нуклеозидтрифосфатов в клетки, способной повысить их эффективность в качестве противовирусных и противоопухолевых препаратов. *Работа была поддержана РФФИ (грант № 16-04-00847).*

Литература

1. Vasilyeva S.V., Silnikov V.N., Shatskaya N.V., Levina A.S., Repkova M.N., ZarytovaV.F., Bioorg. Med. Chem., 2013, 21, 6101-6114.
2. Vasilyeva S.V., Levina A.S., Li-Zhulanov N.S., Shatskaya N.V., Baiborodin S.I., Repkova M.N., Zarytova V.F., Mazurkova N.A., Silnikov V.N., Bioorg. Med. Chem., 2015, 23, 2168-2175.
3. Vasilyeva S.V., Shtil A.A., Petrov A.S., Balakhnin S.M., Achigecheva P.Y., Stetsenko D.A., Silnikov V.N., Bioorg. Med. Chem., 2017, 25, 1696-1702.

КОНЪЮГАТЫ КОЛХИЦИНОИД-ВИТАМИН А ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Ю.А. Грачёва[1], Е.В. Свирщевская[2], Г.-Г. Шмальц[3], А.Ю. Федоров[1]
[1]Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [3]Кёльнский университет, Кёльн, Германия

Анализ литературных данных показывает, что колхицин не только ингибирует митоз и клеточную подвижность, но также подавляет синтез цитокинов, неоангиогенез и эпителиально-мезинхемальные переходы – параметры, вовлеченные в патологию фиброза печени. Главную роль в фиброгенезе – образовании рубцовой ткани – занимают перисинусоидальные звездчатые клетки (Ито-клетки). Существенной особенностью Ито-клеток является экспрессия рецепторов к ретиноидам (витамину А) на их поверхности. Это свойство может быть использовано для доставки колхициновых терапевтических агентов в Ито-клетки. С этой целью нами были синтезированы и исследованы биологические свойства конъюгатов производных колхицина с ретиноевой кислотой или ретинолом. Было получено семь конъюгатов (К-Рет1-7), различающихся длиной линкера и типом связи колхициноид-ретиноид. К-Рет1 получен по реакции Штеглиха из ретиноевой кислоты и ранее синтезированного нами фурано-аллоколхициноида. К-Рет2-6 были синтезированы, исходя из деацетилколхицина с использованием в качестве линкеров в положении С7 гликолевой (этерификация с ретинолом в присутствие DIC и HOBt) и γ-аминомасляной кислот (амидирование по Штеглиху с ретиноевой кислотой), янтарного и глутарового ангидрида (этерификация по Ямагучи с ретинолом), а также без линкера (амидирование с ретиноевой кислотой по Штеглиху). К-Рет7 получен при этерификации по Штеглиху литературно-известного колхициноида [Danieli B. et al. Helvetica Chimica Acta 2003, 86 (6), 2082-2089] по гидроксиметильному положению в С7 с ретиноевой кислотой. Строение синтезированных соединений подтверждено ЯМР и масс-спектрометрическим анализом высокого разрешения. Функциональную активность производного колхицина в составе конъюгатов оценивали на клетках линий Colo-357, HEK293, MiaPaCa-2, PANC1 и CHO методом MTT. Показали, что наибольшей активностью обладает конъюгат, в котором ретиноид отделен от терапевтического агента линкером на основе янтарного ангидрида (IC_{50}=32 нМ). Данное производное перспективно для дальнейшего тестирования *in vivo* на мышиной

модели фиброза печени. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №16-13-10248 и немецкого научно-исследовательского общества (проект 857/18-1).*

ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ЛЕПТИНА, КАК НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ АКТИВАЦИИ ЛЕПТИНОВОЙ СИСТЕМЫ В ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ КРЫС С ОЖИРЕНИЕМ

К.В. Деркач[1], И.О. Захарова[1], В.Н. Сорокоумов[2], И.В. Романова[1], А.О. Шпаков[1]
[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Основной мишенью лептина являются гипоталамические нейроны, в которых локализованы лептиновые рецепторы LepR и другие компоненты лептиновых сигнальных путей, в том числе Akt-киназа. Через центральные механизмы лептин регулирует пищевое поведение. Снижение активности лептиновой системы гипоталамуса ведет к гиперфагии и ожирению. До сих пор не разработано эффективных подходов для регуляции лептиновой системы в ЦНС, поскольку периферическое введение лептина приводит к лептиновой резистентности и нарушению транспорта лептина в мозг. Перспективными в этом случае являются центральное введение лептина и использование ингибиторов протеинфосфотирозинфосфатазы 1B (ПФТФ1B), негативного регулятора лептинового сигналинга. Цель работы состояла в сравнительном изучении эффективности влияния интраназально введенного лептина (ИВЛ) на гипоталамическую лептиновую систему у здоровых крыс, животных с ожирением, вызванным высокоуглеводной/высокожировой диетой (ОЖ), и у крыс с ожирением, обработанных ингибитором ПФТФ1B – этил-3-(гидроксиметил)-4-оксо-1,4-дигидроциннолин-6-карбоксилатом (ОЖИ). Предварительно было показано, что по способности стимулировать Akt-киназу интрацереброventрикулярное и интраназальное введение лептина (2 мкг, 30 мин) сопоставимы. Обработка крыс группы ОЖ с помощью ИВЛ повышала фосфорилирование Akt-киназы по Ser473 и Thr308 и соотношение фосфо-Akt/общая Akt в большей степени, чем у контрольных животных, что положительно коррелирует с повышением на 39% числа LepR в группе ОЖ. Повышение чувствительности к ИВЛ может быть обусловлено нарушением LepR-опосредуемого транспорта лептина в ЦНС при ожирении, ведущего к его дефициту в мозге. В группе ОЖИ, на фоне подавления активности ПФТФ-1B в результате длительного введения ингибитора, чувствительность к ИВЛ усиливалась, о чем свидетельствует повышение фосфорилирования Akt по Thr308 и соотношения фосфо-Akt/общая Akt. Таким образом, продемонстрированы эффективность ИВЛ для активации лептиновой системы в гипоталамусе и для восстановления активности этой системы при индуцированном диетой ожирении, а также усиление эффекта ИВЛ при его совместном применении с ингибиторами ПФТФ1B. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 16-15-10388).*

СЕМАКС ПРЕПЯТСТВУЕТ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ЦИТОКИНОВ ПРИ ИШЕМИИ

В.Г. Дмитриева[1], Е.В. Медведева[1], В.В. Ставчанский[1], А.Е. Денисова[2], К.А. Иванова[1], О.Ю. Сударкина[1], И.Б. Филиппенков[1], Л.В. Дергунова[1,2], Н.Ф. Мясоедов[1], С.А. Лимборская[1,2]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Синтетический пептид семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro), включающий фрагмент АКТГ(4-7), принадлежащий к семейству меланокортинов, в настоящее время используется в терапии ишемического инсульта мозга. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе действия семакса, все еще требуют изучения. Ранее на модели необратимой окклюзии средней мозговой артерии нами были получены данные о воздействии семакса на транскрипцию некоторых генов иммунного ответа. В настоящее время на модели временной окклюзии средней мозговой артерии, которая в большей степени отражает развитие ишемического инсульта у человека, мы исследовали изменение уровня мРНК генов цитокинов при ишемии и при терапии семаксом. Сравнение уровня мРНК генов цитокинов в подкорковых структурах мозга крыс с ишемией, включающих очаг повреждения, проводили с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени и программы REST (Relative expression software tool). В качестве генов внутреннего контроля использовали гены «домашнего хозяйства», кодирующие ферменты глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (Gapdh), лактат-дегидрогеназу A (Ldha) и рибосомальный белок 60SL3 (Rpl3). Сравнение групп животных с ишемией и ложнооперированных крыс показало существенное повышение относительного уровня мРНК генов интерлейкинов Il-1a, Il-1b, Il-6, Il-12b и хемокинов Ccl22, Cxcl2 через 24 часа после операции. При этом у крыс с ишемией, получавших семакс, выявлено более чем двукратное снижение относительного уровня мРНК генов интерлейкинов Il-1a, Il-1b, Il-6, а также хемокина Cxcl2 по сравнению с животными, не получавшими препарат. Обнаруженное нами ингибирующее воздействие семакса на транскрипцию генов провоспалительных цитокинов, с одной стороны, согласуется с имеющимися данными о том, что меланокортиновые пептиды, в частности α-MSH и ACTH(1–24), могут ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов, с другой стороны – указывают на еще одно направление протективных свойств пептидного препарата при ишемии.

СТАБИЛЬНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ПАПАИНА, АДСОРБИРОВАННОГО НА МАТРИЦЕ СРЕДНЕМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА

В.А. Королева[1], М.Г. Холявка[1], С.М. Сазыкина[1], С.С. Ольшанникова[1], В.В. Ермолаева[1], Т.Н. Шеломенцева[1], Ю.М. Вышкворкина[2], В.Г. Артюхов[1] *[1]Воронежский государственный университет, Воронеж; [2]Московский физико-технический институт, Москва, Россия*

Цистеиновые протеазы находят все большее применение не только в пищевой промышленности, но также в медицине и ветеринарии в качестве препаратов для лечения кожных покровов и антигельминтных агентов [1]. Папаин (EC 3.4.22.2) – тиоловая протеаза широкого спектра действия, проявляет каталитическую активность по отношению к белкам и коротким пептидам. Иммобилизация ферментов позволяет предотвратить молекулу фермента от преждевременной инактивации, от протеолиза и воздействия агрессивных факторов окружающей среды, что увеличивает время полужизни биокатализатора. Хитозан весьма перспективен для сорбции энзимов на своей поверхности и давно применяется в области медицины [2]. Целью работы являлось изучение стабильности гетерогенного биокатализатора на основе папаина, иммобилизованного на матрице кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана. В качестве объекта исследования был выбран папаин (Sigma), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma), носителем для иммобилизации – кислоторастворимый среднемолекулярный (Mr=200 кДа, степень деацетилирования – 82%) хитозан (ЗАО «Биопрогресс»). Для сорбции фермента на кислото-

растворимом хитозане использовали глициновый буфер (0.05 М, pH 9.0) [3]. Исследование стабильности свободного папаина и гетерогенного биокатализатора мы проводили в течение двух суток по следующей схеме: инкубация образцов при 37°С с измерением ферментативной активности через 1, 2, 3, 4, 5, 24 и 48 часов. Анализ каталитической способности растворимого и иммобилизованного энзима показал, что растворимый папаин теряет 30 % от исходной активности после двух суток инкубации. Адсорбированный на кислоторастворимом хитозане папаин даже после двух суток инкубации сохраняет не менее 97 % активности от исходной. Таким образом, иммобилизация папаина на матрице кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана препятствует быстрой инактивации энзима и увеличивает время его полужизни, расширяя возможности его использования в промышленных, медицинских и ветеринарных целях.

Литература

1. Холявка М.Г. и др. (2013) Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. Т. 11.№ 7. С. 29-35.
2. Логинова О.О. и др. (2013) Фундаментальные исследования. № 11-3. С. 484-487.
3. Королева В.А. и др. (2015) Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация». № 4. С. 90-94.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ТАФТСИНА С КУКУРБИТ[7]УРИЛОМ НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Е.А.Пашкина[1], Л.В. Гришина[1], Е.А. Коваленко[2], В.А. Козлов[1] *[1]НИИ фундаментальной и клинической иммунологии; [2]Институт неорганической химии им. А. В. Николаева СО РАН, Новосибирск, Россия*

Введение. Одним из важных аспектов современной медицины является проблема эффективности лекарственных препаратов, связанная со стабильностью и специфичностью их действия. Комплексообразование кукурбит[7]урила (СВ[7]) с различными иммуномодулирующими пептидами, в частности с тафтсином, позволяет защитить пептидные препараты от разрушения ферментами организма. В данном случае представляет интерес сравнение иммуномодулирующих свойств свободного тафтсина и пептида, находящегося в комплексе с СВ[7]. Цель. Исследовать влияние комплекса пептида тафтсина с наноразмерным кавитандом кукурбит[7]урилом на гематологические показатели лабораторных животных. Материалы и методы. В работе были использованы мыши-гибриды F1 (СВА×С57Bl/6) в возрасте 2 мес, содержащиеся в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на группы по 5 мышей, которым интраперитонеально двукратно через 2 дня проводили инъекции. Первой группе вводили комплекс тафтсина с СВ[7] (25 мкг тафтсина в 0,25 мл 4М раствора СВ[7]), второй группе – 25 мкг тафтсина в 0,25 мл буфера, третьей - 0,25 мл 4М СВ[7], четвертой – 0,25 мл фосфатно–солевого буфера. Гематологические показатели оценивались на следующий день после инъекций. Результаты и обсуждение. Было обнаружено, что после первого введения комплекса тафтсина с СВ[7], также как и при введении свободных тафтсина либо СВ[7], гематологические показатели лабораторных животных практически не изменялись по сравнению с контрольной группой. После второго введения тафтсина наблюдалось статистически значимое снижение количества эритроцитов, концентрации гемаглобина и значения гематокрита у мышей по сравнению с показателями контрольной группы. В то время как повторное введение тафтсина в комплексе с СВ[7] и свободного СВ[7] не влияло на гематологические показатели. Вывод. Следовательно, повторное ведение комплекса тафтсина с СВ[7], в отличие от инъекций свободного тафтсина, не приводит к снижению гематологических показателей у лабораторных животных.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА ЧЕЛОВЕКА В СИСТЕМЕ ДОСТАВКИ

Г.М. Сысоева[1], Е.П. Зуева[2], Н.А. Попова[3], В.И. Каледин[3], О.В. Симакова[1], С.Г. Гамалей[1], Л.Р. Лебедев[1], Г.М. Левагина[1], Е.Д. Даниленко[1] *[1]Институт медицинской биотехнологии ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская область, Бердск, [2]НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск; [3]ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

Высокий противоопухолевый потенциал фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа) является причиной того, что во многих странах мира ведутся работы по созданию лекарственных препаратов на основе этого белка. В последние годы очень бурно развивается направление по конструированию средств адресной доставки белков в патологический очаг. Есть сведения о создании транспортных форм ФНО-альфа на основе неорганических наночастиц, синтетических полимеров, липосом. Однако при всех несомненных достоинствах этих подходов у каждого из них есть свои недостатки. Поэтому разработка новых транспортных форм ФНО-альфа по-прежнему актуальны. В ИМБТ ГНЦ ВБ «Вектор» для улучшения терапевтических свойств ФНО-альфа была разработана молекулярная конструкция с целью защиты белка от протеаз и его транспортировки к клеткам-мишеням [2]. Целью исследования являлась оценка противоопухолевой активности препарата на основе рекомбинантного ФНО-альфа в средстве доставки, так называемой «вирусоподобной частице» (ВПЧ-ФНО-альфа). Исследование проводили на мышах линии SCID и C57BL6, с трансплантированными опухолями в соответствии с методическими рекомендациями [1]. В качестве опухолевых моделей были использованы ксенографты эпидермоидной карциномы ротовой полости человека КВ-3.1, меланома B16F10 и карцинома легких Льюис. Препарат вводили мышам-опухоленосителям внутривенно в дозах 5×10^2, 1×10^4 или 5×10^4 МЕ на мышь трехкратно, через день. Инъекции препарата начинали со стадии сформировавшегося опухолевого узла. Оценку противоопухолевого эффекта проводили по индексу торможения роста опухоли (ТРО). Величина торможения роста ксенографтов карциномы человека КВ-3.1 при введении препарата в дозе 1×10^4 МЕ/мышь составляла 45%. Введение животным с карциномой легких Льюис препарата в дозах 5×10^2 или 1×10^4 МЕ/мышь сопровождалось торможением развития опухоли, ТРО составлял 38-46%. Внутривенное введение препарата в дозе 5×10^4 МЕ/мышь оказывало достоверное ингибирующее действие на рост меланомы B16F10. В опытной группе через 7 суток после третьего введения ТРО составлял 68%. Таким образом, исследование показало, что внутривенное введение препарата ВПЧ-ФНО-альфа животным опытных групп оказывало ингибирующий эффект на развитие всех изученных типов опухолей.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Литература

1. Патент РФ 2386447
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, Часть первая. – М: Гриф и К, 2012.

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

ГИДРОГЕЛЕВЫЕ БИОЧИПЫ – ИНСТРУМЕНТЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ БИОМАРКЕРОВ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Д.А. Грядунов, Е.И. Дементьева, О.В. Смолдовская, В.И. Бутвиловская, Г.У. Фейзханова, С.А. Волошин, А.А. Тихонов, А.С. Арефьева, Е.Н. Савватеева, М.А. Филиппова, А.Ю. Рубина, А.С. Заседателев
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Биологические микрочипы являются аналитическим инструментом, позволяющим реализовать в доступной форме сложные интегративные подходы геномики и протеомики и решать задачи персонализированной медицины - проводить обследование пациента для выявления заболевания задолго до проявлений клинических симптомов, прогнозировать тяжесть протекания патологических и инфекционных процессов, выбирать эффективные и рациональные режимы терапии. Эффективность биочипов обусловлена возможностью параллельного проведения множества специфических реакций и исследования взаимодействий молекул биополимеров, таких как ДНК, белки, гликаны. В ИМБ РАН разработана универсальная платформа гидрогелевых биочипов и на ее основе создан ряд приложений для мультиплексного анализа ДНК и белковых биомаркеров социально-значимых заболеваний, включая молекулярно-генетические, иммунологические и эпидемиологические аспекты патогенеза. Разработаны, запатентованы и внедрены в медицинскую практику методы идентификации ДНК возбудителей инфекционных заболеваний (туберкулез, гепатит С, инфекции органов репродукции) с одновременным генотипированием и установлением генетических детерминант, ассоциированных с ответом на антибактериальную либо противовирусную терапию. Развитие технологии гидрогелевых биочипов позволило создать ряд систем для проведения мультиплексного иммунохимического анализа. Совместно с сотрудниками ИБХ РАН под руководством академика Е.В.Гришина разработан метод одновременного количественного анализа 15 белковых токсинов бактериального и растительного происхождения. Создан метод мультиплексного анализа аллерген-специфичных иммуноглобулинов классов Е и G4. Тестирование >400 образцов сывороток пациентов с аллергическими заболеваниями и здоровых доноров показало эффективность применения аллергобиочипа для выявления гиперчувствительности I типа. Разрабатывается новый подход, основанный на одновременном анализе белковых серологических онкомаркеров и антител различных классов к онкоассоциированным гликанам. Идентификация таких комбинаций (сигнатур) в сыворотках крови пациентов позволяет выявлять колоректальный рак на ранних стадиях с высокой (>90%) диагностической чувствительностью и специфичностью, превосходящими эффективность *in vitro* методов, используемых в клинико-диагностических лабораториях.

БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ИНТЕИН-ОПОСРЕДОВАННЫХ СИСТЕМ ЭКСПРЕССИИ

Р.С. Есипов, В.Н. Степаненко, М.А. Костромина, Д.А. Макаров, О.О. Михеева, Т.И. Муравьева, А.И. Мирошников
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва Россия

Биотехнология рекомбинантных белков медицинского назначения в настоящее время является одной из наиболее перспективных, динамически развивающихся областей науки и производства в мире. Внедрение современных препаратов в клиническую практику осуществимо лишь при условии детального изучения их специфической фармакологической активности и безопасности на этапе экспериментальных исследований. Для широкого исследования свойств белков и проведения медико-биологических испытаний требуется разработка эффективных методов их получения. Классическая схема получения небольших белков включает в себя биосинтез в составе гибрида и затем стадию отделение целевого полипептида под действием химических реагентов или сайт-специфичных протеаз. Такой подход, в ряде случаев, значительно увеличивает затраты на технологию и делает масштабирование экономически нецелесообразным. Альтернативный подход заключается в получении интеин-содержащих гибридных белков, способных к управляемому автокаталитическому расщеплению в результате которого происходит высвобождение целевого пептида. Преимуществом использования интеин-опосредованной системы экспрессии является: • возможность получения целевых белков с требуемой аминокислотой на N-конце, • исключение стадии ферментативного гидролиза гибридного белка протеазами, • возможность химической модификации целевого белка. Многолетние научные разработки по применению интеин-опосредованной схемы получения рекомбинантных полипептидов позволили нам перейти к созданию пилотных и промышленных биотехнологий получения белков медицинского назначения. На сегодняшний день в промышленном масштабе отработано получение целого ряда фармацевтических субстанций: глюкагона, оксинтомодулина, эпидермального фактора роста, фрагмента фактора дифференцировки пигментного эпителия (PEDF) (44-77), тимозина альфа1 и бета 4, аналогов гирудина – дезирудина и лепирудина, пуротоксина-1 из *Geolycosa sp*. и анальгетического пептида из *H. crispa* (АРНС-3).

ОБРАЩЕННОЕ БЕТА-ОКИСЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОМЫШЛЕННО ЗНАЧИМЫХ С4-С10 СОЕДИНЕНИЙ

А.Ю. Гулевич, А.Ю. Скороходова, В.Г. Дебабов
Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, Россия

Современной тенденцией для биотехнологического получения промышленно значимых химикатов является разработка микробных биосинтетических платформ. В рамках данного подхода биосинтез структурно родственных соединений обеспечивается на основе единого базового штамма при вовлечении определенного центрального метаболита в серии реакций выбранного итеративного биохимического пути. Консервативным интермедиатом центрального метаболизма, способным обеспечить биосинтез многих значимых производных в результате относительно простых превращений, является, в частности, ацетил-КоА. В этой связи, удобной и гибкой биосинтетической платформой для микробиологического синтеза широкого

спектра веществ с высокой добавленной стоимостью служит обращенный цикл бета-окисления жирных кислот (БОЖК). При искусственном обращении в биосинтетическую сторону, БОЖК использует ацетил-КоА в качестве ключевого предшественника, вовлекая этот же метаболит в наращивание углеродной цепи на каждом последующем раунде цикла. Ключевые реакции обращенного БОЖК включают первичную конденсацию затравочной молекулы ацил-КоА и удлиняющей молекулы ацетил-КоА с формированием 3-кетоацил-КоА, его конверсию в 3-гидроксиацил-КоА, дегидратацию последнего с формированием 2-еноил-КоА и восстановление двойной связи с образованием удлиненной молекулы ацил-КоА. Таким образом, в зависимости от терминальных ферментов, катализирующих финальные стадии превращений соответствующих КоА-интермедиатов цикла, конечными продуктами биосинтеза могут являться алканы, кетоны, карбоновые кислоты, их кето- и гидрокси-производные, одно- и двухатомные спирты. Вовлечение в первичную конденсацию функционализированных молекул ацил-КоА значительно расширяет спектр потенциальных продуктов платформы. С использованием принципа обращения БОЖК продемонстрирован биосинтез из гликолитических субстратов С3-С5 алканов, алифатических карбоновых кислот и спиртов, содержащих от 4 до 10 углеродных атомов. В качестве функционализированных производных показан биосинтез 1,3-бутандиола, 3- и 4-гидроксимасляной, а также адипиновой и левулиновой кислот. Эти соединения обладают высоким рыночным потенциалом и их микробиологический синтез может стать экологически оправданной альтернативой традиционному нефтехимическому. *Работа поддержана грантом РНФ № 16-14-10389.*

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ФИЛЬТРАЦИИ В ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Н.Н. Осипов, Е.Е. Каталевский, С.П. Савельев
ЗАО «Владисарт», Владимир, Россия

За последнее десятилетие интенсивное развитие промышленной биотехнологии, биофармацевтики, пищевой промышленности на самом высоком уровне не могло не потребовать совершенствования современных методов фильтрации для процессов очистки, разделения и концентрирования.

В чём же заключается современность этих методов? Во-первых, появились новые мембраны, которые позволяют изготавливать фильтрующие элементы, способные выдержать большие нагрузки – давление, температуру, химстойкость. Во-вторых, получение ассиметричных мембран нового поколения позволило интенсифицировать процессы фильтрации прежде всего в биофармацевтической и пищевой промышленности, при переработке плазмы человека и животных, а также при переработке вторичного сырья в молочной и мясоперерабатывающей промышленности. В-третьих, получение ферментов нового поколения также потребовало создания керамических фильтров нового поколения. Сегодня можно сказать, что в создании керамических фильтров произошла революция: (1) значительно повысилось качество самих элементов; (2) расширился спектр оксидов металлов, используемых в керамических фильтрах; (3) сегодня керамические фильтры могут выпускаться для всех стадий фильтрации – микро-, ультра- и нанофильтрации.

Одновременно с развитием мембран шло развитие насосного оборудования, ферментационного оборудования, систем автоматизации и управления, а также методов контроля проведения процесса. Всё это вместе взятое позволяет сегодня организовать практически любой биотехнологический процесс получения необходимого продукта на самом высоком уровне.

ПОЛИФЕРМЕНТАТИВНЫЕ КАСКАДЫ В СИНТЕЗЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ

И.Д. Константинова[1], И.В. Фатеев[1], Р.С. Есипов[1], И.А. Михайлопуло[2], А.И. Мирошников[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [2]Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Разработана и экспериментально реализована новая стратегия синтеза биологически важных нуклеозидов, которая состоит в мультиферментном каскадном превращении *D*-пентоз в пуриновые и пиримидиновые нуклеозиды и их аналоги. Получены рекомбинантные ферменты из *E. coli*: рибокиназа, фосфопентомутаза и нуклеозидфосфорилазы, в частности уридин-, тимидин- и пуриннуклеозидфосфорилазы. Изучены условия их функционирования, определены оптимальные условия для максимального проявления их каталитической активности в индивидуальных и полиферментативных процессах. Реализован каскадный биосинтез модифицированных нуклеозидов, состоящий в последовательном превращении в «одной колбе» *D*-пентоз в 5-фосфаты под действием рибокиназы, которые затем изомеризуются под действием фосфопентомутазы в α-*D*-пентофуранозо-1-фосфаты, конденсация последних с модифицированными гетероциклическими основаниям в присутствии нуклеозидфосфорилаз приводит к образованию целевых нуклеозидов. В отличие от химических методов, ферментативные методы синтеза нуклеозидов обладают, как правило, высокой эффективностью в сочетании с *регио-* и *стерео*-специфичностью.

Предложен механизм функционирования ключевых ферментов полиферментативных каскадов – нуклеозидфосфорилаз, определена роль структурных, электронных и стереохимических факторов в реакциях, катализируемых этими ферментами. Эти результаты положены в основу дизайна новых субстратов и ингибиторов нуклеозидфосфорилаз. Разработаны биотехнологические способы получения модифицированных нуклеозидов для молекулярной биологии и медицины.

Оптимальные условия функционирования полученных ферментов значительно различаются, и ключевой проблемой в реализации каскадного синтеза нуклеозидов был поиск компромиссных условий реакции в одной колбе, которые бы позволяли удовлетворительно функционировать всем ферментам. Эта проблема была успешно решена и осуществлен синтез ряда пиримидиновых и пуриновых нуклеозидов. Разработанная методология каскадного ферментативного синтеза нуклеозидов позволила разработать эффективные методы синтез ряда противоопухолевых и противовирусных препаратов, таких как, Кладрибин, Флударабин, Клофарабин, Неларабин, Рибавирин и их новых аналогов, биологические свойства которых в настоящее время изучаются. Кроме того, получены метаболически устойчивые аналоги нуклеозидного антибиотика Кордицепина, которые представляют огромный интерес для терапии африканского трипаносомоза человека.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ АНТИТЕЛ НА ПРИМЕРЕ ГИБРИДОМЫ, ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ВЫСОКОАФФИННЫЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

О.Н. Солопова[1], Е.Н. Ильина[2], Т.К. Алиев[3], М.В. Ларина[4], П.Г. Свешников[1], М.П. Кирпичников[2,4]
[1]Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения; [2]Биологический факультет и [3]Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; [4]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Рынок препаратов на основе моноклональных антител является одним из самых быстрорастущих рынков в мире. Получение стабильного и высокоэффективного продуцента человеческих моноклональных антител является сложной и не до конца решенной задачей. В настоящее время терапевтические человеческие антитела получают либо при помощи фагового дисплея, либо с использованием трансгенных животных. В первом случае в молекуле антитела остаются участки нечеловеческого происхождения, а второй метод слишком трудоемок и не позволяет напрямую получать полноразмерные человеческие антитела из-за ограниченности размеров вставляемых локусов. Данная работа направлена на разработку технологии получения человеческих нейтрализующих антител против вируса бешенства. Согласно рекомендациям ВОЗ экстренная профилактика бешенства должна включать в себя введение антирабического иммуноглобулина. В процессе работы был получен опухолевый партнер, способный эффективно гибридизоваться с человеческими В-лимфоцитами с образованием клеточных линий со стабильной антителопродукцией. Эффективность гибридизации, стабильность антителопродукции и продуктивность получаемых гибридом не уступает показателям, соответствующим традиционной технологии получения мышиных антител. Была разработана технология *in vitro* иммунизации с использованием популяций клеток человеческой периферической крови и рекомбинантных цитокинов, в результате которой были получены В-лимфоциты, продуцирующие высокоаффинные антитела класса IgG. После реверсии зрелых В- лимфоцитов в лимфобласты и гибридизации их с опухолевым партнером были получены и наработаны нейтрализующие антитела против гликопротеида вируса бешенства. Полученная гибридома может быть использована в качестве самостоятельного продуцента человеческих антител к вирусу бешенства, либо в качестве источника генетического материала для конструирования соответствующих векторов. Технология может быть использована для получения человеческих антител разной специфичности. *Работа выполнялась при поддержке субсидии Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60716X0154.*

ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ БЕЛКОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ, БИОХИМИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ

В.В. Шумянцева, Т.В. Булко, Е.В. Супрун, А.В. Кузиков, Р.А. Масамрех, Л.В. Сиголаева, А.И. Арчаков
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Разработаны электрохимические системы на основе цитохромов Р450. На основе анализа информационных параметров электрохимических сигналов рассчитаны кинетические константы ферментативных процессов, определены особенности электродных процессов и электродная кинетика переноса электронов в системе электрод/фермент, определены эффективные формальные потенциалы редокс-активных компонентов, исследована стехиометрия компонентов электродных реакций, рассчитано количество электроактивных веществ, участвующих в процессе, исследованы условия обратимости/необратимости реакций, рассчитаны термодинамические параметры (ΔG, ΔS, ΔH), а также получена информация о типе процесса (диффузионный или поверхностный) для исследуемого биокомпонента. На основе анализа электрокаталитической активности различных изоформ цитохромов Р450 (2B4, 1A2, 3A4, 51b1 (стерол-14α-деметилазы *Mycobacterium tuberculosis* CYP51b1), 11A1 (P450scc), 17A1, BM3, 260A1, 109C1, 109C2 и 109D1) разработан метод фармакокинетического терапевтического мониторинга и исследования лекарственных средств на уровне биотрансформации. Разработанный метод применим для оценки субстратного и ингибиторного потенциала цитохромов Р450, а также для целенаправленной регуляции биотрансформации лекарственных веществ, путем изменения активности системы цитохрома Р450.Разработан метод анализа электрохимической активности белков и пептидов на основе регистрации электроокисления аминокислот цистеина (Cys), триптофана (Trp) и тирозина (Tyr)) при потенциалах Emax 0.6÷0.7 V (vs. Ag/AgCl) и методики регистрации аминокислотных замен, модификаций и образования функционально значимых комплексов. С помощью электрополимеризации получены полимерные антитела к кардиомиглобину на основе молекулярно импринтированных полимеров (МИП), и проанализированы образцы здоровой плазмы и плазмы больных острым инфарктом миокарда. *Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы*.

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ СЕНСОРОВ КАСПАЗ-8/9/3

К.К. Малышевская[1,2], Н.Г. Гурская[1,2], А.И. Степанов[1], К.А. Лукьянов[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия

Апоптоз, или программируемая клеточная гибель - это один из ключевых процессов, важный для мониторинга развития опухоли и лекарственных воздействий на неё. Идентифицировать апоптотическую гибель раковой клетки можно с помощью генетически кодируемых сенсоров активности различных участников апоптоза. Для выявления активации апоптотических каскадов можно отслеживать активности различных каспаз. Частой мишенью является каспаза-3, которая играет центральную роль в различных путях активации апоптоза. Сейчас уже получено несколько вариантов сенсоров каспазы-3 на основе FRET между флуоресцентными белками разных цветов, сигнал которых можно наблюдать как с помощью обычного флуоресцентного имиджинга (по интенсивности сигналов донора и акцептора), так и с помощью FLIM имиджинга (по возрастанию времени жизни флуоресценции донора). Однако возможность использования таких сенсоров в опухолевых *in vivo* моделях нередко бывает весьма ограничена. Чаще всего это связано с низкой проницаемостью биологических тканей для большей части света видимого спектра. Длинноволновой свет лучше проникает в биологические ткани, поэтому рационально использовать красные и дальнекрасные флуоресцентные белки. Ранее был получен флуоресцентный FRET-сенсор, содержащий в качестве донора красный GFP-подобный белок mKate, а в качестве акцептора - инфракрасный белок iRFP. Линкер между этими белками содержит специфический сайт DEVD, который узнается и разрезается каспазой-3. На основе сенсора каспазы-3 был сконструирован сенсор каспаз-8/9/3. Для расширения специфичности в полипептидный линкер дополнительно к сайту DEVD был введен сайт LEHD, который узнается и разрезается каспазами-8/9. Каспаза-8 и каспаза-9 в ходе разви-

тия апоптоза актируются раньше, чем каспаза-3, поэтому такая конструкция обеспечивает ранний ответ - то есть позволяет детектировать индукцию каспаз-зависимого апоптоза на более ранних стадиях. Следующей важной задачей является получение каспазных сенсоров с улучшенными свойствами. Чтобы добиться увеличения яркости и динамического диапазона сенсора, используются новые флуоресцентные белки из недавно опубликованных работ: красный белок mScarlet в качестве FRET-донора, и ближне-инфракрасный белок miRFP в качестве FRET-акцептора. *Работа поддержана Российским научным фондом (грант 14-25-00129).*

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРОДУЦЕНТОВ ЛИПАЗЫ ИЗ *THERMOMYCES LANUGINOSUS* И ТВЁРДЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ С АКТИВНОСТЬЮ ЛИПАЗЫ

А.Б. Беклемишев[1], А.Л. Мамаев[1], Г.А. Коваленко[2,3], Л.В. Перминова[2]
[1]НИИ биохимии СО РАН; [2]Институт катализа СО РАН, Новосибирск; [3]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Липазы микроорганизмов широко используются в различных биокаталитических процессах для гидролиза жиров и масел, для различных реакций синтеза, в том числе, этерификации, переэтерификации, ацидолиза, алкоголиза и аминолиза. В связи с этим значительное внимание уделяется исследованиям, направленным на получение микроорганизмов-продуцентов рекомбинантных липаз и созданию на их основе твёрдых биокатализаторов.

Данная работа посвящена конструированию рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* BL21(DE3) и *Pichia pastoris* X33, продуцирующих 1,3-специфичную липазу из *Thermomyces lanuginosus*, а также разработке твердых биокатализаторов на основе рекомбинантной липазы.

Последовательности двух генов зрелой липазы были оптимизированы для экспрессии в бактериях и дрожжах, синтезированы и затем клонированы в соответствующих микроорганизмах. В результате генно-инженерных манипуляций были сконструированы штаммы *E. coli* и *P. pastoris*, эффективно продуцирующие рекомбинантную липазу. Бактерии синтезировали липазу, накапливающуюся в цитоплазме в количестве 30-35% от суммарного белка клетки. Дрожжевые клетки секретировали рекомбинантную липазу в культуральную среду; концентрация фермента на 5-ый день индукции достигала 2 г/л среды.

Рекомбинантные липазы были использованы для получения твердых катализаторов на основе диоксида кремния или углеродного аэрогеля. Было обнаружено, что активность и стабильность приготовленных биокатализаторов зависят от химической природы адсорбентов. Приготовленные биокатализаторы отличались высокой стабильностью в реакции этерификации в органических растворителях. Так, биокатализатор, приготовленный путем адсорбции липазы на углеродном аэрогеле, полностью сохранил активность после 1000 ч синтеза эфира *изо*-амил каприната при 20-40°C.

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ АИКАР И PITA-ЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА ФОСФАТОВ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА ГИСТИДИНА КЛЕТКАМИ *ESCHERICHIA COLI*

Е.А. Полякова, И.А. Бутов, А.Б. Равчеева, С.В. Машко, Н.В. Стойнова
ЗАО НИИ «Аджиномото – Генетика», Москва, Россия

Протеиногенная аминокислота L-гистидин (His) относится к ряду незаменимых и находит применение в пищевой и фармацевтической промышленности. В настоящее время, для получения His микробиологическим способом используются продуценты на основе штаммов *C. glutamicum*, *B. flavum*, *S. marcescens* и *E. coli*. Путь синтеза His включает десять реакций, первую из которых у *E. coli* катализирует ключевой фермент биосинтеза − АТФ-фосфорибозилтрансфераза (HisG), который подвержен как конкурентному ингибированию со стороны АДФ и АМФ, так и аллостерическому ингибированию конечным продуктом биосинтетического пути, His. Ранее было показано, что для известного мутантного фермента $HisG^{E271K}$ *E. coli*, несмотря на полное отсутствие ретроингибирования His, ингибирование молекулами АДФ и АМФ сохраняется. Поэтому принципиально важным представлялся анализ ингибирования этого фермента структурным аналогом АМФ – 5-аминоимидазол-4-карбоксамидо-рибонуклеотидом (АИКАР), который, в свою очередь, является общим интермедиатом пути биосинтеза His и образования пуринов *de novo*, причем биосинтез His сопряжен с эквимолярным образованием АИКАР. Оказалось, что, как нативный HisG, так и мутантный, устойчивый к His, $HisG^{E271K}$, чувствительны к ингибированию АИКАР в еще большей степени, чем АМФ. Следовательно, эффективная конверсия АИКАР в АТФ, субстрат HisG, является определяющим условием сверхсинтеза His. Поэтому для того, чтобы избежать негативного влияния АИКАР на продукцию этой аминокислоты, у штамма-продуцента были дополнительно сверхэкспресированы ферменты пути регенерации АИКАР в АТФ, а именно, бифункциональная АИКАР-трансформилаза/ИМФ-циклогидролаза PurH и аденилосукцинат-синтаза PurA, что привело к увеличению накопления His. Продуктами ключевых ферментов биосинтеза His, в том числе, фермента HisG, является пирофосфат (PPi), дальнейшее расщепление которого до неорганического фосфата (Pi) является для соответствующих реакций лимитирующим. Обнаружилось, что отсутствие PitA, импортера Pi, приводит к увеличению накопления His. Предположительно данный эффект вызывается изменением баланса PPi/Pi, что, в свою очередь, смещает равновесие в пирофосфатазной реакции, тем самым усиливая эффективность реакций биосинтеза His, высвобождающих PPi. Комбинация указанных модификаций увеличила продукцию His в 2.7 раза.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОМУ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЮ КЛЕТОК ЭУКАРИОТ

О.В. Дьяченко, С.В. Тарлачков, Т.В. Шевчук, Я.И. Бурьянов
Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

В ходе разработки новых подходов к эпигенетическому перепрограммированию клеток эукариот путем экзогенного сайт-специфического метилирования ДНК, модулирующего активность генетических программ развития клетки, были получены рекомбинантные векторы для экспрессии в клетках млекопитающих генов ДНК-метилтрансфераз M.EcoRII и M.EcoRII, модифицированной хромодоменом (CHRD-M.EcoRII). Проведена трансформация животных клеток конструкциями, содержащими гены гетерологичных метилтрансфераз с CpHpG-сайтовой специфичностью (H = A, T или C). Получены

трансформированные клетки HEK293, экспрессирующие гены M.EcoRII и CHRD-M.EcoRII. Эти линии клеток отличались морфологическими особенностями и сниженной скоростью пролиферации по сравнению с контрольной линией клеток. Экспрессия генов M.EcoRII и CHRD-M.EcoRII в трансформированных клетках влияла на уровень метилирования генома в последовательностях CCWGG (W = A или T). В то же время, наличие хромодомена в составе молекулы метилтрансферазы не оказывало существенного влияния на уровень метилирования генома клеток. Таким образом, впервые продемонстрировано влияние экзогенного CpHpG-типа метилирования ДНК на морфолого-биохимический фенотип трансформированных клеток и снижение скорости их пролиферации. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-08-03362).*

ЭФФЕКТЫ ЭКСТРАКТОВ ЦЕКРОПИН P1-СИНТЕЗИРУЮЩИХ РАСТЕНИЙ КАЛАНХОЭ НА РОСТ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ

О.В. Дьяченко, С.В. Тарлачков, Н.С. Захарченко, Т.В. Шевчук, Я.И. Бурьянов
Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

В молекулярной физиологии растения *Mesembryanthemum crystallinum* являются важной моделью для исследования адаптации растений к абиотическим стрессам. Эти растения в условиях засоления и дефицита воды отличаются стресс-индуцибельным переключением C3–фотосинтеза на CAM–путь ассимиляции CO2 (Crassulacean acid metabolism). В то же время, эти растения являются трудным объектом для генетической трансформации из-за отсутствия разработанных методов регенерации трансформированных клеток до целых растений. В экспериментальной биологии для индукции дифференцировки и регенерации растений применяются растительные экстракты со специфической биологической активностью. Проведено исследование влияния экстракта из трансгенных растений каланхоэ перистого (*Kalanchoe pinnata L.*), экспрессирующих ген антимикробного пептида цекропина P1 (cecP1), на рост и дифференцировку каллусов растений *M. crystallinum*. Экстракты из трансгенных и нетрансгенных растений каланхоэ добавляли в среду для культивирования каллусов растений *M. crystallinum*. Показаны выраженные стимулирующие эффекты экстракта cecP1-растений каланхоэ на рост каллусов и индукцию органогенеза (образование корней и листьев) *M. crystallinum* по сравнению с экстрактом контрольных нетрансгенных растений каланхоэ. Ранее нами был проведен анализ метилирования промотора 35S, контролирующего экспрессию синтетического гена cecP1. Метилирование промотора 35S у cecP1-растений каланхоэ характеризуется низким уровнем, что свидетельствует об активной экспрессии трансгена. Дальнейшее снижение метилирования промотора 35S приводило к повышению экспрессии трансгена cecP1-растений K. pinnata и влияло на проявление ряда других биологических активностей растения. Такая повышенная биологическая активность обнаружена в полученных экстрактах cecP1-растений *K. pinnata* не только в экспериментах на растениях, но и на животных по его ранозаживляющим и иммуномодулирующим свойствам. Вероятно трансген cecP1 в растениях *K. pinnata* индуцирует синтез новых биоактивных веществ, учавствующих в процессах клеточной дифференцировки. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 15-08-03362, 16-04-00623).*

НОВАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ МИКРОБНАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ СИНТЕЗА АКРИЛОВЫХ МОНОМЕРОВ В БАКТЕРИЯХ RHODOCOCCUS НА ОСНОВЕ КОБАЛЬТ-ЗАВИСИМОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

К.В. Лавров, А.О. Шемякина, Е.Г. Гречишникова, Т.И. Калинина, А.Д. Новиков, А.С. Яненко
Государственный научно исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, Россия

Акриловые мономеры широко применяются для получения разнообразных полимеров технического назначения – загустителей, диспергаторов, флокулянтов, реагентов для нефтедобычи, абсорбентов и т.д. Биокаталитические способы синтеза мономеров являются реальной альтернативой традиционному органическому синтезу, поскольку обеспечивают высокую селективность по выходу целевого продукта, использование водных сред, нормального давления и температуры. Промышленное получение акриламида с помощью биокатализаторов – штаммов бактерий Rhodococcus – является впечатляющим примером того, как биотехнология может изменить традиционные химические производства. В настоящей работе изучены особенности уникальной системы кобальт-зависимой экспрессии генов в бактериях Rhodococcus, обеспечивающей высокий уровень накопления ферментов нитрилгидратазы, нитрилазы и амидазы, применяемых для синтеза акриловых мономеров.

В ходе работы впервые показано на количественном уровне, что кобальт усиливает в несколько раз транскрипционную активность промотора гена нитрилгидратазы. В результате секвенирования генома *Rhodococcus rhodochrous* M8 обнаружен новый ген металло-зависимого транскрипционного регулятора. Показано, что он участвует в кобальт-зависимой активации транскрипции с нитрилгидратазного промотора. Обнаружены и клонированы гены двух новых нитрилаз, и выяснено, что эти ферменты обладают разными субстратными специфичностями – к алифатическим и ароматическим нитрилам. Созданы экспрессионные кассеты и апробирована экспрессия в Rhodococcus двух ферментов – ациламидазы (для синтеза модифицированных акриламидов) и алифатической нитрилазы (для синтеза акриловой кислоты).

Изучение кобальт-зависимой системы экспрессии генов в Rhodococcus и выяснение причин высокой экспрессии позволит использовать преимущества клеток Rhodococcus в качестве биокатализаторов – их механическую прочность, термо- и осмотолерантность, устойчивость в широком диапазоне pH, устойчивость к действию органических растворителей. Результаты работы позволят разработать универсальную платформу для высокоэффективной наработки ферментов нитрилгидратазы, нитрилазы и амидазы для синтеза акриловых мономеров. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-00216).*

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСТРОГО АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОГО ОТРАВЛЕНИЯ *IN VIVO*

В.А. Паликов[1], Ю.А. Паликова[1], И.В. Смирнов[2], И.А. Дьяченко[1], А.Н. Мурашев[1]
[1]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Бутирилхолинэстераза (БуХЭ) обладает способностью стехиометрически связывать токсины, ингибирующие ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Это делает человеческую БуХЭ очень актуальным предметом для изучения в качестве биоловушки при отравлениях фосфорорганическими соединениями (ФОС). ФОС являются необратимыми ингибиторами холинэстераз. АХЭ

играет главную роль в холинергической системе, завершая действие ацетилхолина. Основной причиной острой токсичности ФОС является необратимое ингибирование АХЭ. В отличие от плазмы мышей, плазма крови человека не содержит карбоксилэстеразы которая является важным эндогенным ферментом, участвующем в детоксикации ФОС. В нашей биомодели в качестве ФОС был использован параоксон. Чтобы максимально снизить фоновую активность эндогенной карбоксилэстеразы у мышей линии Balb/c был использован ингибитор крезилбензодиоксафосфориноксид (CBDP) в дозе 1,5 мг/кг, который полностью подавлял действие данного фермента. Основной целью эксперимента было создание биомодели отравления на мышах Balb/c, при которой можно было бы отследить клинические признаки и найти минимальную летальную дозу. Подкожно был введен CBDP после чего, спустя 30 минут вводился параоксон в дозах 5,5; 6,0; 6,5 и 7 мг/кг в соответствие с групповой принадлежностью. Одышка является основным клиническим показателем при пероральном антихолинэстеразном отравление. Фиксировалось время начала и продолжительность одышки. Результаты. В дозах параоксона 5,5 и 6 мг/кг все животные выживают, а при увеличении дозы отравляющего вещества видна зависимость «доза – эффект». При дозе 6,5 мг/кг наблюдается 50% гибель животных, а при дозе 7 мг/кг 100% летальность. Продолжительность одышки у группы 5,5 мг/кг – составила ~1 мин. Одышка у группы, получавших параоксон в дозе 6 мг/кг, более продолжительна – составила ~4 мин. При увеличение дозы параоксона до 6,5 мг/кг одышка достигает 14 минут. Время начала одышки у мышей в дозе 5,5 мг/кг составляет 9 мин, в дозе 6 мг/кг время начала клинических проявлений составило в среднем около 7 мин, при дозе 6,5 мг/кг около 3 минут и в дозе 7 мг/кг 2 мин с момента введения параоксона. Вывод. Из результатов видно, что нам удалось подобрать оптимальные дозы параоксона для модели антихолинэстеразного отравления. Также не удалось найти минимальную летальную дозу (7 мг/кг).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ РОДА LACTOBACILLUS ИЗ ТРУТНЕВОГО МОЛОЧКА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

Т.В. Григорьева[1], О.Н. Мамыкина[2], В.В. Сахаров[3], А.Г. Кощаев[4], В.В. Радченко[5]
[1]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; [2]Гимназия № 491 «Марьино», Москва; [3]Российский национальный исследовательский медицинский университет РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва; [4]Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина, Краснодар; [5]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Пчёлы поставляют множество полезных продуктов для пищевой промышленности медицины. Продукты пчеловодства предоставляют широкие возможности для поиска видов рода Lactobacillus, традиционно применяемых в составе пробиотических препаратов. Молочнокислые бактерии продуцируют ряд биологически активных низкомолекулярных соединений белковой природы с антимикробными свойствами — бактериоцинов. Нами проведён метагеномный анализ трутневого молочка медоносной пчелы. Подготовку библиотек и последующий анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК проводили на платформе Illumina MiSeq. В результате исследования были получены данные о составе микробиоты и распределении наиболее представленных таксономических групп микроорганизмов. Разработана новая селективная питательная среда для культивирования лактобактерий. Получено более 100 чистых культур, отнесённых по данным таксономического типирования к 17 видам нескольких известным родов, в том числе Leuconostoc, Lactobacillus и группе Acetobacteraceae. Четыре вида рода Lactobacillus изучены в экспериментах по подавлению роста патогенных для медоносной пчелы штаммов бактерий. Кроме того, клонированы фрагменты кДНК, кодирующие 4 новых бактериоцина класса II, установлена их первичная структура. Выявлены 3 перспективные в отношении создания пробиотических препаратов вида лактобактерий, которые могут быть с успехом использованы в пчеловодстве.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ АЛЛЕРГЕНОВ АМБРОЗИИ ПОЛЫННОЛИСТНОЙ *AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA*

Т.В. Романова, Д.Н. Мельникова, Е.И. Финкина, И.В. Богданов, Т.В. Овчинникова
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

На сегодняшний день в среднем у 30–50% населения Земли наблюдаются аллергические заболевания различной степени тяжести, и число их стремительно растет. Разработка новых путей повышения надежности и безопасности диагностики и лечения аллергии предполагает получение и использование индивидуальных рекомбинантных аллергенов вместо суммарных экстрактов их природных источников. Целью данной работы являлась разработка биоинженерных подходов к созданию высокоэффективных продуцентов рекомбинантных аналогов клинически значимых аллергенов амброзии полыннолистной *Ambrosia artemisiifolia*, пыльца которой является одной из основных причин поллиноза в России. В качестве объектов исследования нами были выбраны аллерген амброзии Amb a 1, принадлежащий к классу пектатлиаз, и Amb a 6, относящийся к классу липид-транспортирующих белков. Amb a 1 и Amb a 6 являются мажорными аллергенами амброзии, к которым сенсибилизировано 95 и 21% пациентов с аллергией на пыльцу *Ambrosia artemisiifolia*, соответственно. Разработаны системы для гетерологичной экспрессии данных аллергенов в клетках *E. coli*. Рекомбинантные белки экспрессировались под контролем промотора T7 в клетках штамма BL-21(DE3), несущего ген T7 РНК-полимеразы. Варианты созданных экспрессирующих конструкций предусматривают получение аллергена Amb a 1 в форме гибридного белка с октагистидиновой последовательностью и аллергена Amb a 6 форме гибридного белка с октагистидиновой последовательностью и модифицированным тиоредоксином A. Данные системы позволили достичь высокого выхода целевых продуктов и были использованы для полупрепаративного выделения белков методами аффинной хроматографии и ОФ-ВЭЖХ. Разработанная методика выделения рекомбинантных аллергенов позволила получить белки, идентичные природным по молекулярной массе, аминокислотной последовательности и спектру кругового дихроизма. Проведены исследования структурных особенностей и иммунологических свойств полученных рекомбинантных белков. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

ТЕХНОЛОГИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ БИОЛИСТИЧЕСКОЙ ДОСТАВКИ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 В РАСТЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ С ЦЕЛЬЮ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

А.В. Хромов[1,2], А.В. Махотенко[1,2], Е.А. Снигирь[1], С.С. Макарова[1,2], Н.О. Калинина[1,2], В.В. Макаров[1,2], М.Э. Тальянский[1,3]
[1]ООО ДокаГен, Рогачево, Россия; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [3]Cell and Molecular Sciences, The James Hutton Institute, Dundee, UK

Нами разработана технология доставки в растения картофеля компонентов CRISPR/Cas9 для геномного редактирования с использованием наночастиц. Целью настоящей работы было создание и оптимизация системы для эффективного редактирования последовательностей ДНК, кодирующих гены коилина и фитоендесатуразы (PDS) Solanum tuberosum. На основе биоинформатических предсказаний были синтезированы пять гидовых РНК для гена коилина, из которых только одна была активна в системе *in vitro*. Из шести синтезированных гидовых РНК для разрезания гена PDS активными *in vitro* были пять. Для оптимизации последовательности гидовых РНК с целью эффективного разрезания гена коилина был осуществлен дизайн десяти новых гидовых РНК, несущих последовательные замены пар нуклеотидов на вырожденные. Обнаружено, что замена нуклеотидов с 12 по 16 в составе гидовых РНК на вырожденные сопровождается увеличением эффективности разрезания ДНК гена коилина *in vitro*. На следующем этапе мы функционализировали наночастицы золота РНП комплексом, содержащим Cas9 (ДНК эндонуклеазой, направляемой гидовой РНК) и полученные гидовые РНК. Собранные наноплатформы были введены в клетки апикальных меристем или пазушных почек растений картофеля с использованием биолистического бомбардмента. События геномного редактирования (выключение генов коилина и PDS) были подтверждены методом секвенирования последнего поколения (NGS) соответствующих генов и с помощью T7E1 анализа. *Настоящая работа поддержана Российским научным фондом (грант № 16-16-04019).*

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АРЕНИЦИНА-2

О.В. Фурс[1,2], Н.С. Захарченко[1], С.В. Пиголева[1], С.В. Баландин[2], Е.И. Финкина[2], Т.В. Овчинникова[2], Я.И. Бурьянов[1]
[1]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Перенос генов антимикробных пептидов в растения является одной из перспективных стратегий усиления их сопротивляемости различным микробным патогенам. Антимикробный пептид ареницин-2 (*ar2*), выделенный из морского червя *Arenicola marina*, действует на широкий спектр микроорганизмов. В настоящей работе ген *ar2* был встроен в вектор pSS и перенесен в растения табака (*Nicotiana tabacum*). Присутствие гена *ar2* в геноме растений подтверждено методом полимеразной цепной реакции. Экспрессия гена *ar2* в трансгенных растениях показана в тесте антимикробной активности экстрактов по отношению к бактериальным патогенам. Растения поколения F_0 и F_1 имели нормальный фенотип и сохраняли способность образовывать при самоопылении жизнеспособные семена. *Ar2*-растения обладали повышенной устойчивостью к бактериальному (*Erwinia carotovora*) и грибным фитопатогенам (*Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*). В трансгенных растениях наблюдалось изменение протекания окислительного стресса, вызванного заражением растений фитопатогенными бактериями. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-08-02050).*

КОНКУРС МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

САМОПРОИЗВОЛЬНАЯ АГРЕГАЦИЯ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦИКЛИЧЕСКИХ RGD-ПЕПТИДОВ ДЛЯ РЕПАРАЦИИ ТКАНЕЙ

Р.А. Акасов[1,2], С.В. Буров[3], Е.А. Марквичева[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]Институт молекулярной медицины, Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва; [3]Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

Тканевая инженерия – это область биомедицины, целью которой является восстановление поврежденных органов и тканей. Для получения биоматериала необходимо выделить клетки и наработать их необходимое количество *in vitro*. Однако известно, что при длительном культивировании *in vitro* клетки теряют свои тканеспецифические функции. Чтобы избежать этого, было предложено культивирование в трехмерных (3D) условиях, в частности в мультиклеточных сфероидах. Так, было показано, что при росте в сфероидах мезенхимальные стволовые клетки (МСК) сохраняют способность к направленной дифференцировке и находятся в условиях мягкой гипоксии, характерной для МСК *in vivo*. Недавно мы предложили использовать циклические RGD-пептиды для формирования сфероидов из опухолевых клеток для тестирования противораковых препаратов (Akasov et al., 2016). Целью настоящего исследования является разработка схожего подхода для получения сфероидов из первичных нормальных клеток под действием циклических RGD-пептидов. Сфероиды можно рассматривать в качестве «строительных блоков» для применения в тканевой инженерии. Для формирования сфероидов первичные МСК, полученные из жировой ткани человека, и первичные фибробласты, выделенные из кожи человека, сажали в 96-луночный планшет (10,000 клеток на лунку) и добавляли циклический RGD-пептид непосредственно к монослойной культуре в концентрации 1–100 мкМ. Было показано, что на 2–3 день МСК и фибробласты агрегировали с образованием сфероидов в интервале концентраций пептида 10–100 мкМ и 25–100 мкМ, соответственно. Было показано, что средние размеры сфероидов составляли 56±13 мкм для МСК и 50±10 мкм для фибробластов. Выживаемость клеток в сфероидах была подтверждена флуоресцентным тестом «живой-мертвый». Удаление пептида приводило к повторной агрегации клеток к поверхности планшета в течение 24 ч. Кроме того сфероиды были включены в коллагеновый гель (95% коллагена I), который соответствует условиям *in vivo*. Было обнаружено, что сфероиды заселяли гель в течение 3–5 дней. Таким образом, RGD-зависимую агрегацию клеток можно предложить как новый подход для использования в тканевой инженерии.

Литература

1. Akasov R, Zaytseva-Zotova D, Burov S, Leko M, Dontenwill M, Chiper M, Vandamme T, Markvicheva E. Int. J. Pharm. 2016. 506(1–2): 148–157.

БИОМАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ ПЕКТИНА И ХИТОЗАНА ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ СПАЙКООБРАЗОВАНИЯ

М.В. Коновалова[1], Е.В. Свирщевская[1], С.В. Попов[2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [2]Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар, Россия

Одной из актуальных проблем современной биотехнологии и медицины является создание биоматериалов для предотвращения спаек в брюшной полости после хирургических вмешательств. Целью данной работы являлось получение и исследование антиспаечной эффективности материалов на основе биосовместимых, биодеградируемых полисахаридов пектина и хитозана. В работе использовали хитозан из панциря крабов, на основе которого методами реацетилирования, дезацетилирования и химической деполимеризации были получены образцы, различающиеся по ММ и СД, и низкометилэтерифицированные пектины из различных источников: пектин яблочный (ПЯ) и пектин борщевика (ПБ), отличающиеся типом строения углеводной цепи. Биоматериалы на их основе были получены методом ионотропного гелеобразования пектина с ионами Ca^{2+} и формирования полиэлектролитного комплекса между противоположно заряженными молекулами пектина и хитозана. Исследованы механические свойства, биосовместимость и иммуногенность полученных биоматериалов. Показано, что материалы на основе ПБ являются более прочными и менее гигроскопичными по сравнению с материалами из ПЯ (прочность – 482 и 107 кПа, степень набухания – 11,5 и 5,6 г/г соответственно), их деградация *in vitro* и *in vivo* происходит медленнее. Установлено, что биоматериалы из ПЯ имеют низкую цитотоксичность в отношении фибробластов, а материалы из ПБ – среднюю (метаболическая активность клеток составила 60–80% и 50–70% соответственно). Все полученные материалы не вызывают гемолиза эритроцитов (менее 5%), в слабой степени адсорбируют белки сыворотки крови (менее 15%), вызывают низкую адгезию макрофагов к поверхности. Показано, что биоматериалы из ПЯ не активируют систему комплемента, то есть являются не иммуногенными. Антиспаечная эффективность разработанных материалов была исследована на модели спаечного процесса, вызванного механическим повреждением мезотелия слепой кишки и брюшной стенки у крыс. Было показано, что биоматериалы на основе ПЯ и хитозана ингибируют спайкообразование в брюшной полости крыс, а материалы на основе ПБ и хитозана стимулируют образование спаек. Эффект ингибирования спаечного процесса связан с большей гигроскопичностью и меньшей прочностью материалов на основе ПЯ. *Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям, Договор №7077ГУ/2015(0011717)*.

АНАЛИЗ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ КОНЪЮГАТА ФУРАНОАЛЛОКОЛХИЦИНОИДА С ХИТОЗАНОМ

А.А. Зубарева[1], М.В. Коновалова[2], Ю. А. Грачева[3], А.Ю. Федоров[3], Р.А. Полтавцева[4], Е.В. Свирщевская[2]
[1]Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [3]Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; [4]Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

Колхицин, получаемый из растения Colchicum autumnale, используется для лечения средиземноморской лихорадки, болезни Бехчета, острой подагры и других воспалительных заболеваний. Одним из новых направлений использования колхицина является его применение в малых дозах для терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Механизм действия низких доз колхицина не известен. Целью данной работы был анализ влияния колхицина на частоту сердечных сокращений *in vi*vo у крыс и *in vitro* кардиомиоцитов человека. Ранее нами было получено производное колхицина с функциональной карбоксильной группой – фураноаллоколхициноид АК (Voitovich Y.V. et al. J Med Chem. 2015). Для снижения терапевтической дозы и пролонгирования действия АК карбодиимидным методом получили конъюгат АК с природным полимером хитозаном с ММ 40 кДа (АК-Хит). Для получения отрицательно заряженной молекулы дополнительно модифицировали остаточные аминогруппы хитозана с помощью янтарного ангидрида. Активность АК в составе конъюгата оценивали методом МТТ на клетках линий HaCaT и HEK293. Показали, что 50% ингибирующие концентрации АК и АК-Хит составили 2 и 500 нМ. Эффект АК и АК-Хит на кардиомиоциты оценивали *in vitro* на бьющихся островках клеток с помощью подсчета числа ударов в минуту. Показали, что АК при концентрации 10 нМ и выше достоверно увеличивал частоту биения с нормализацией в течение нескольких часов. АК-Хит в эквивалентной концентрации не влиял на частоту сокращений. Для анализа эффекта *in vivo* АК или АК-Хит вводили крысам внутривенно в концентрации 0.5 мг/кг (по АК) и подсчитывали частоту сердечных сокращений (ЧСС). Показали, что АК в выбранной дозе через 10 мин снижает ЧСС на 15–20%, которая остается сниженной в течение 2 ч. Эффект АК-Хит был аналогичным (15–20% снижение ЧСС), но наступал позднее и держался до 10 ч. Повышение *in vitro* ЧСС кардиомиоцитов в культуре с АК может быть связано с прямым попаданием колхициноида и слишком высокой дозой. Таким образом, АК-Хит оказывает более мягкое и более длительное действие на сердечную мышцу, что может привести к лучшему клиническому эффекту. *Работа выполнена при поддержке РФФИ и Правительства Москвы, проект № 15-34-70042 «мол_а_мос».*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИЗОЦИМА КАК СТРУКТУРНОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ЧАСТИЦ ЯДРО-ОБОЛОЧКА НА ОСНОВЕ $CaCO_3$

И.В. Марченко, О.Д. Смирнова, И.В. Калашникова, Т.В. Букреева
НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Иммобилизация на микро- и наноносители решает множество проблем доставки лекарственных веществ. Это и пролонгированное действие, и локализация, и повышение биодоступности, и снижение токсической нагрузки, и возможности контролируемого высвобождения, а также создание принципиально новых форм лекарственных препаратов, более удобных для хранения и применения. Нами исследованы системы ядро-оболочка, полученные с помощью послойного нанесения полиэлектролитов на поверхность пористых сферических частиц ватерита ($CaCO_3$) диаметром 1–3 мкм. При этом в качестве поликатионного слоя был использован лизоцим. Лизоцим известен в качестве пищевой добавки Е1105, используемой как консервант, что обусловлено его антибактериальным эффектом относительно грамположительных бактерий. Лизоцим используют в медицине в качестве антисептического и бактериостатического агента. Также, его интегрируют в пищевые упаковочные материалы для продления срока годности пищевых продуктов. Полученные нами результаты показали, что лизоцим адсорбируется на поверхность ватерита из водного раствора в итоговом количестве 6–30 мг/г в течение часа инкубации при

25°C. Такие частицы ядро-оболочка обладают самостоятельными бактериостатическими свойствами. Для получения многослойной оболочки в качестве полианионов могут быть применены обычно используемые полимеры: декстран сульфат, пектин, карбоксиметилцеллюлоза и другие. Загрузка таких контейнеров биологически активными соединениями происходит быстрее в 3–5 раз по сравнению с немодифицированными частицами $CaCO_3$. Повышаются сорбционные возможности для фотоактивных веществ (родамина 6Ж, фталоцианинов, кумаринов) и водно-спиртовых растительных экстрактов. Соответственно, процесс высвобождения (десорбция) идёт в несколько раз лучше, с возможностью синергетических эффектов. За счет низкой иммуногенности такие капсулы пригодны для парентерального введения. Проведённые нами опыты по внутримышечному введению таких частиц лабораторным мышам показали отсутствие каких-либо токсических эффектов. *Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (Грант № 15-33-70032).*

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ОПУХОЛЬ-АДРЕСУЮЩИХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

А.А. Немудрая[1], А.А. Макарцова[1], О.А. Коваль[1,2], Н.В. Губанова[3], В.А. Рихтер[1], Е.В. Кулигина[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет; [3]ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Одним из подходов в терапии онкологических заболеваний является адресная доставка цитотоксических средств в опухоль. Адресная доставка позволяет снизить дозу препарата, необходимую для получения терапевтического эффекта, и минимизировать побочные эффекты от его применения. Разработка средств таргетной терапии возможна благодаря множественным генетическим и эпигенетическим изменениям, происходящим при онкотрансформации и приводящим к изменениям протеомного профиля раковой клетки. Этот поверхностный профиль является молекулярным адресом для доставки биомолекул с помощью адресующих лигандов. В качестве таких лигандов могут выступать короткие опухоль-адресующие пептиды, одним из эффективных способов получения которых является скрининг фаговых пептидных библиотек (ФПБ) на различных объектах. Одним из объектов для скрининга ФПБ была выбрана аденокарцинома молочной железы человека MDA-MB-231 (трижды-негативный тип). В результате комплексного скрининга библиотеки *in vitro* (на раковых клетках в культуре) и *in vivo* (на мышиной модели-ксенографтов) был отобран пептид T3 (YTYDPWLIFPAN). Пептид T3 обеспечивал связывание и интернализацию фаговых частиц клетками MDA-MB-231 в культуре и специфическое накопление их в опухолевой ткани MDA-MB-231 *in vivo*. На основе последовательности пептида T3 и проапоптотического белка лактаптина (RL2) была создана генетическая конструкция, позволяющие нарабатывать в клетках *E.coli* рекомбинантный слитый белок, названный нами T3-RL2. Цитотоксическая активность белка T3-RL2 в отношении клеток MDA-MB-231 превышала цитотоксическую активность RL2. В экспериментах по изучению противоопухолевой активности *in vivo* показано значительное увеличение ингибирующей активности белка T3-RL2 по сравнению с RL2 в отношении опухоли MDA-MB-231 (индексы ТРО составили 80% и 37%, соответственно). Другим объектом для скрининга ФПБ была выбрана мультиформная глиобластома человека U87-MG. В результате проведенного скрининга получен пептид, способный проникать из кровеносного русла через гематоэнцефалический барьер к структурам головного мозга и специфически накапливаться в опухолевых клетках. Полученный пептид будет использован для повышения эффективности бор-нейтронозахватной терапии при лечении злокачественных новообразований головного мозга человека.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ДОМАШНИХ И ДИКИХ ПЕРЕПЕЛОВ

Е.Р. Кириллова[1], К.В. Василян[2], М.В. Александрова[3], А.Г. Кощаев[4], В.В. Радченко[5]
[1]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; [2]Гимназия № 491 «Марьино», Москва; [3]ООО «ФАРМАПАРК», Москва; [4]Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина, Краснодар; [5]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Потребности рынка в разнообразной и качественной мясной продукции стимулируют развитие альтернативных областей животноводства, в частности, перепеловодства, популярность которого связана с ценными диетическими свойствами мяса и яиц. Одним из методов защиты поголовья от инфекций является применение пробиотических препаратов. В настоящее время повсеместно используются ветеринарные препараты на основе кисломолочных бактерий, как правило, не характерных для естественного микробиома вида. Лучшие результаты может дать применение в составе пробиотиков автохтонных штаммов, выделенных из дикого родственного организма — дикого перепела (*Coturnix coturnix*). Для эксперимента были отобраны 19 диких перепелов, 39 домашних (19 самок и 20 самцов) и 10 полудиких птиц. Бактериальную геномную ДНК выделяли модифицированным фенольным методом из образцов пяти основных отделов ЖКТ птиц (железистого желудка, мускульного желудка, подвздошной, слепой и толстой кишки). Подготовку библиотек и последующий анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК проводили на платформе Illumina MiSeq. В результате исследования были получены данные о составе микробиоты и распределении наиболее представленных таксономических групп микроорганизмов в каждом из пяти отделов ЖКТ. Отдельное внимание было уделено оценке соотношения полезных микроорганизмов рода Lactobacillus. В общей сложности идентифицировано 42 вида рода Lactobacillus. Получены чистые культуры 20 штаммов, отнесённых к 11 различным видам. Исследована степень подавления выделенными штаммами патогенных видов родов Escherichia и Salmonella. Отобраны 3 перспективные в отношении создания пробиотических препаратов вида лактобактерий, которые могут быть с успехом использованы при выращивании промышленных линий домашнего перепела (*Coturnix japonica*).

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ PANTOEA SP. 3.5.1 В ДРОЖЖИ *YARROWIA LIPOLYTICA*

Д.С. Трошагина, А.Е. Смирнова, А.Д. Сулейманова
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Мио-инозитол фосфаты привлекают внимание ученых с целью применения их в медицине. Однако, получают эти соединения лишь химическим путем, тогда как альтернативная экономически выгодная технология их ферментативного получения не развита. Целью работы явилась разработка эффективных систем экспрессии фитаз для специфического получения мио-инозитол фосфатов. Для экспрессии гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytic*a использовали

модифицированную последовательность гена фитазы штамма – agpP (AN KJ783401.1), к структурной области которой добавили С-концевой His-таг. Для корректной экспрессии бактериальной фитазы в дрожжах проводили оптимизацию кодонов нуклеотидной последовательности гена. В работе использовали дрожжевой вектор pINA1296, имеющий в своем составе дрожжевой сигнальный пептид, и используемый для экспрессии рекомбинантных белков. Провели амплификацию синтетического гена фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1. без собственного SP и рестрикцию плазмиды pUC57/ agpP для получения гена фитазы, содержащего собвстенный SP. Для клонирования гена фитазы использовали сайты рестрикции KpnI и SfiI. Рестрицированные последовательности вектора pINA1296 и гена лигировали. Полученные в результате лигирования конструкции pINA1296 agpP (с SP) и pINA1296 agpP (без SP) трансформировали в клетки *E.coli* DH5α. Отбор трансформантов проводили на среде LA с добавлением ампициллина. Наличие гена идентифицировали с помощью ПЦР-анализа трансформированных колоний *E.coli* DH5α и рестрикционного анализа плазмид. Результаты секвенирования вставки подтвердили полное соответствие гена agpP на плазмиде pINA1296 рекомбинантных штаммов синтетическому гену фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1. Полученные плазмиды рестрицировали по сайту NotI для получения линейных конструкций которыми трансформировали штамм *Y. lipolytica* Po1g. Трансформанты отбирали на среде без лейцина. Интеграцию гена бактериальной фитазы в геном дрожжей подтверждали генотипированием. Экспрессия гетерологичного белка изучается. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-60191.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УЛЬТРАВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СКРИНИНГА С ЦЕЛЬЮ ОТБОРА НОВЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ И АНТИБИОТИКОВ ИЗ КОМБИНАТОРНЫХ БИБЛИОТЕК И ПРИРОДНОГО БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

С.С. Терехов[1], И.В. Смирнов[1], А.В. Степанова[1], Д.В. Данилов[1], А.Г. Габибов[1], С. Альтман[2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [2]Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, Yale University, New Haven, USA

Создание новых лекарственных препаратов неотъемлемо связано с процессом скрининга лекарственных кандидатов и поиском новых молекулярных мишеней. Инновационные методы скрининга, в свою очередь, позволяют многократно повысить скорость отбора новых кандидатов. Наиболее многообещающие технологии связаны с разработкой методик ультравысокопроизводительного скрининга (uHTS), позволяющих отбирать искомый функционал из библиотек представительностью более 107 вариантов. Тем не менее, большинство методов uHTS, таких как мРНК, фаговый и клеточный дисплей, позволяют отбирать исключительно варианты, обеспечивающие высокоаффинное связывание с мишенью. В качестве альтернативы существующим методам, мы разработали простую и универсальную технологию uHTS широкого спектра активностей, не связанных с образованием высокоаффинных комплексов. Индивидуальные живые клетки подвергались инкапсуляции в каплях биосовместимой микрофлюидной двойной эмульсии (MDE) вместе с флуорогенными субстратами или репортерными линиями клеток. Каждая капля служила изолированным микробиореактором, в котором протекала соответствующая биохимическая реакция, приводившая к изменению флуоресценции капли, что, в свою очередь, позволяло отбирать наиболее активные варианты, инкапсулированные в каплях, с использованием флуоресцентно-активированного клеточного сортинга (FACS). Эффективность данной технологии позволила отобрать из комбинаторной библиотеки новые варианты фермента бутирилхолинэстеразы, обладающие искусственно созданной параоксоназной активностью. Кроме того, биосовместимость MDE позволила культивировать многочисленные виды микроорганизмов в каплях и расширить возможности данного метода для изучения межклеточных взаимодействий бактерий. Разработанная технология uHTS позволила отобрать среди бактерий микробиоты ротовой полости культивируемые штаммы, демонстрирующие высокоэффективное ингибирование роста широко распространенного патогена *Staphylococcus aureus*. Более того, использование 16S и полногеномного секвенирования отобранных капель, позволяет предсказать высокую ингибирующую активность некоторых медленнорастущих видов, требующих особые условия культивации. *Данная работа поддержана грантом № RFMEFI60716X0145 Министерства образования Российской Федерации.*

ДОСТАВКА ДНК В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ГИДРОФОБНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ХИТОЗАНА

Б.Ц. Шагдарова[1], В.А. Санков[2,3], Е.В. Свирщевская[3]
Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва;[3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В настоящее время в качестве систем для доставки генетического материала в клетки активно используют невирусные конструкции катионной природы на основе липосом. Липосомы обладают низкой иммуногенностью и достаточно большой емкостью, но обладают относительно высокой токсичностью и высокой ценой. Целью нашей работы являлось получение трансфекционных агентов на основе производных хитозана. Хитозан является природным поликатионом, имеет низкую стоимость и легко модифицируется, что позволяет получать производные с требуемыми свойствами. Методом кислотного гидролиза были получены образцы хитозана с молекулярными массами (ММ) 5, 20, 50 и 200 кДа. На их основе были синтезированы гексаноил хитозаны (ГХ) со степенью замещения (СЗ) 10, 15, 30%. В работе использовали репортерную плазмиду pRFP pmKate2, кодирующую дальне-красный флуоресцентный белок. Такие белки являются хорошими кандидатами для оценки прохождения плазмиды *in vivo*, поскольку их свечение не попадает в спектр аутофлуоресценции клеток млекопитающих. Показали, что трансфекция клеток HEK293 с помощью немодифицированного хитозана была неэффективна. Из гидрофобных производных только ГХ с ММ 20 кДа трансфицировал клетки с эффективностью до 50% по сравнению с коммерческим липидным агентом. Эффективность трансфекции при этом не зависела от СЗ гексаноильными группами. Однако трансфекция клеток ГХ 20кДа была нестабильной. Из 5 экспериментов только в 2 достигли высокой эффективности (15–30% трансфецированных клеток), в то время как трансфекция коммерческим агентом была эффективной в 100% случаев (30–60% трансфецированных клеток). Полученные данные показали, что требуется выявление параметров, влияющих на эффективность трансфекции клеток млекопитающих с помощью производных хитозана. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-34-80027).*

ОПТОПОРАЦИЯ КЛЕТОК НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ЗОЛОТЫХ НАНОЗВЕЗД: ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕДУРЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

Е.В. Ванжа, Т.Е. Пылаев, Н.Г. Хлебцов
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Одной из важных проблем современной биомедицины является создание эффективной, нетоксичной и высокопроизводительной технологии трансфекции клеток. Для решения этой задачи были разработаны такие методы, как трансдукция, химическая трансфекция на основе липидных реагентов и электропорация. Однако все они обладают значительными недостатками, связанными с возможностью встраивания рекомбинантной ДНК в геном клетки, зависимостью эффективности трансфекции от типа клеток, а также токсичностью. В последнее время активно изучается применение наноматериалов, в особенности наночастиц золота для трансфекции клеток с использованием лазера в качестве эффективной альтернативы ранее разработанным методам доставки молекул. Принцип метода состоит в усилении энергии лазерного излучения плазмонно-резонансными наночастицами, локализованными вблизи клеточных мембран, что приводит к кратковременному увеличению проницаемости последних для целевых молекул. Несмотря на высокую производительность и простоту, эта методика содержит стадию инкубирования наночастиц с клетками, которая может привести к нежелательным эффектам, связанным с неспецифической адсорбцией наночастиц, и как результат, уменьшению эффективности трансфекции. Настоящая работа направлена на разработку удобной, надежной и эффективной технологии оптопорации, основанной на использовании золотых нанозвезд, иммобилизованных в лунках культуральных планшетов в виде монослоя. Схема эксперимента состоит из нескольких этапов: иммобилизация золотых нанозвезд (ЗНЗ) на предварительно активированных поливинилпиридином лунках культуральных планшетов; выращивание в них животных клеток; кратковременное облучение непрерывным 800-нм лазером и дальнейшее культивирование клеток для детекции результатов оптопорации и их жизнеспособности. Оптимизация процедуры включала тщательный подбор всех параметров ЗНЗ (плотность монослоя, способ иммобилизации, размер частиц и т. д.), а также режимов облучения (мощность, длина волны, время, рабочая температура и т.д.). Йодид пропидия (PI) использовался в качестве модельного трансфицирующего агента для контроля доставки молекул в клетки линии HeLa. Оценку жизнеспособности клеток до и после лазерного облучения контролировали Alamar Blue- и MTT-тестами.

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ГМ-КСФ ЧЕЛОВЕКА

Т.И. Есина, Е.А. Волосникова, Я.С. Гогина, Л.Р. Лебедев, Е.Д. Даниленко
Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) является важным цитокином-регулятором миелопоэза и формирования клеток иммунной системы. Способность ГМ-КСФ стимулировать гранулоциты и макрофаги делает возможным его клиническое использование для снижения побочных эффектов при лучевой и химиотерапии, для защиты от инфекций.

Для наработки белка использовали рекомбинантный штамм *E. coli* SG20050/p280GM, полученный трансформацией штамма-реципиента плазмидой p280GM, содержащей синтетический ген ГМ-КСФ, детерминирующий конститутивный синтез полипептида со свойствами ГМ-КСФ человека (Гилева и др., 1997). Ген, кодирующий ГМ-КСФ, клонирован в плазмиду p280GM под триптофановым промотором (trp), поэтому в процессе биосинтеза рекомбинантного штамма *E. coli* SG20050/p280GM при достижении оптической плотности культуральной жидкости A_{550}=(1,25±0,25) о.е. с целью индукции промотора в среду вносили аналог триптофана – индолилуксусную кислоту в конечной концентрации 30–50 мкг/мл. По данным денситометрии, плазмида p280GM детерминировала синтез целевого продукта, составляющий не менее 15–20% от суммарного белка клетки.

Целевой белок синтезировался в клетках в виде нерастворимых телец включения. Для солюбилизации белка ГМ-КСФ из отмытых телец включения использовали раствор мочевины с концентрацией 6 моль/л и различными значениями pH. Показано, что оптимальным значением pH, при котором происходит максимальная экстракция целевого белка, является pH 8,0±0,3.

Для очистки белка использовали комбинацию двух хроматографий со значениями pH выше и ниже изоэлектрической точки белка, которую рассчитывали с помощью программы PROTEIN CALCULATOR v3.4 (pI=5,24). Затем проводили стадию ренатурации очищенного белка. В ходе работы был получен препарат ГМ-КСФ с выходом целевого белка более 60%, что составляет около 2–5 мг из 1 г клеточной биомассы.

Таким образом, можно заключить, что использованные подходы могут послужить основой для дальнейшей разработки технологии получения белка ГМ-КСФ высокой степени чистоты с целью его использования в качестве субстанции препарата для медицинского применения.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ НОВОГО КАРДИОМАРКЕРА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

О.О. Михеева[1], С.П. Домогацкий[2], Р.С. Есипов[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН Москва; [2]Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва, Россия

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности во всем мире. Идентификация биомаркеров, способных детектировать заболевание на ранних стадиях, является фундаментальной мерой для прогноза клинического состояния больного. Применение многих из существующих маркеров заболеваний сердца ограничено физическим и физиологическим состоянием пациента. В этой связи особенный интерес представляет растворимая форма стимулирующего фактора роста человека, экспрессирующегося геном 2 (sST2). Концентрация sST2 в крови повышается задолго до возникновения болезни и не зависит от физиологических показателей. Поэтому диагностика sST2 у больных хронической сердечной недостаточностью имеет клиническое и прогностическое значение. Ген IL1RL1 кодирует белок ST2, состоящий из растворимой формы (sST2) и трансмембранной формы (ST2L). Целью нашей работы было выделение и очистка рекомбинантного белка sST2 для дальнейшего производства антител, в том числе и моноклональных. Синтез гена был осуществлен химико-

ферментативным способом с использованием частично-перекрывающихся олигонуклеотидов. Синтезированный ген был клонирован в вектор pET16b+ по сайтам узнавания эндонуклеаз рестриктции NdeI и XhoI. В результате был создан экспрессионный вектор pERsST2, содержащий гибридный ген, в котором последовательность белка sST2 на N-конце слита с последовательностью из 10-ти гистидинов. Экспрессию гибридного гена проводили в штамме *E. coli* C3030. Содержание гибридного белка составило не менее 20% от общего клеточного белка. Выделение и очистку гибридного sST2 проводили с использованием металл-хелатной и гель-фильтрационной хроматографий. В результате был разработан метод выделения и очистки рекомбинантного sST2 для изготовления тест-набора на основе магнитометрического метода измерения концентрации в пробах крови.

БАКУЛОВИРУСНАЯ ТРАНС-КАПСИДАЦИЯ ГЕНОМНОЙ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С МУТАНТНЫМИ СТРУКТУРНЫМИ БЕЛКАМИ ВИРУСА В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СБОРКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ *IN VITRO*

А.А. Наумова[1], О.В. Орлова[1], В.Л. Друца[2], А.В.Иванов[1], П.М. Рубцов[1], С.Н. Кочетков[1], С.Н. Белжеларская[1]
[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; [2]Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Разработка экспериментальных систем, обеспечивающих полную репликацию вируса гепатита С (ВГС) и формирование инфекционных вирусных частиц, имеет большое значение для исследования патогенеза вируса и создания новых противовирусных препаратов. Согласно нашим данным о влиянии отдельных гликанов гликопротеинов ВГС1b на формирование вирусоподобных частиц в клетках эукариот, полученным в результате комбинации экспериментальных и расчетных подходов, установлено, что нарушение гликозилирования определенных сайтов белков оболочки вируса ведет к образованию дефектных вирусных частиц, возможно, неспособных инфицировать клетку мишень. Таким образом, гликаны гликопротеинов ВГС1b могут влиять на сборку вирусных частиц и их инфекционность. Формирование вириона ВГС в условиях эффективного производства инфекционного вируса в культуре клеток изучено недостаточно. Получить новые сведения о сборке инфекционных вирусных частиц позволит система транс-капсидирования РНК ВГС. В этой системе субгеномный репликон, состоящий из репликативной части генома и лишенный генов структурной части, упаковывается в капсид структурными белками, доставленными в клетки рекомбинантным бакуловирусом. Это позволяет получить инфекционные вирусоподобные частицы. Нами оптимизирована система упаковки субгеномного репликона штамма JFH1 ВГС 2a мутантными структурными белками штамма Con1 ВГС 1b *in trans*, в клетках Huh7 *in vitro*, с целью получения стабильной клеточной линии гепатомы человека с высоким уровнем репликации РНК и продуктивным формированием инфекционных вирусных частиц ВГС. Полученная линия будет использована для изучения влияния гликанов гликопротеинов вируса на формирование инфекционных вирусных частиц.

РАЗНОЗАРЯЖЕННЫЕ ЛИПОСОМЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ: РОЛЬ ЗАРЯДА В ЦЕЛЕВОЙ ДОСТАВКЕ

Е.В. Рябухина[1], А.А. Ярославов[2], А.В. Сыбачин[2], Е.В. Свирщевская[3]
[1]Факультет нефтегазохимии и полимерных материалов, Российский химико-технологический университет им. Менделеева, Москва; [2]Московский государственный университет им М.В. Ломоносова, Москва; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Липосомы представляют собой везикулы, состоящие из одной или нескольких фосфолипидных мембран, внутри липосом находится водное пространство. В водное пространство липосом могут быть включены водорастворимые препараты. Липосомы способны транспортировать лекарственное средство, снижать его общетоксическое действие, увеличивать терапевтический эффект. Целью данной работы было изучение транспорта *in vitro* и *in vivo* анионных и катионных липосом. Разнозаряженные Анионные (АЛ) и Катионные (КЛ) липосомы получали методом ультразвукового диспергирования, включая мембранные красители родамин В для КЛ и карбоксифлуорисцеин для АЛ. Заряд липосом оценивали методом лазерного микроэлектрофореза. Размер и целостность липосом в водно-солевых средах исследовали с помощью динамического светорассеяния. Токсичность определяли с помощью МТТ-теста. Транспорт липосом в клетках *in vitro* оценивали в динамике в 2D и 3D культурах клеток COLO-357 и HaCaT методом конфокальной микроскопии с использованием внутриклеточных трекеров органелл. Дополнительно токсичность липосом оценивали в тесте активации тромбоцитов. Связывание с компонентами крови АЛ и КЛ оценивали в цельной крови доноров с последующим лизисом эритроцитов. Биораспределение липосом оценивали *in vivo* на мышах линии A/Sn. Было показано методом МТТ, что КЛ токсичны для клеток, активируют тромбоциты, связываются со всеми форменными элементами крови, при внутривенном введении мышам длительно циркулируют в крови и выводятся через печень и почки. АЛ нетоксичны, не активируют тромбоциты, но связываются с форменными элементами крови аналогично КЛ. При внутривенном введении АЛ достоверно быстрее выводятся из крови, через печень и почки. Анализ транспорта липосом *in vitro* показал, что КЛ длительно ко-локализуются с мембранами клеток, собираются в агрегаты, частично сбрасываются вместе с фрагментами мембран. АЛ быстро проходят в клетки, минуя эндосомальный компартмент и накапливаются в лизосомах, где быстро подвергаются деградации. Таким образом, заряд липосом определяет транспорт и утилизацию липосом *in vitro* и *in vivo*.

НАКОПЛЕНИЕ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ В ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЦР-ВЕКТОРОВ

П.И. Селина[1], М.А. Карасева[2], М.П. Рощина[2], А.А. Комиссаров[2], Д.Р. Сафина[1,2]
[1]Московский технологический университет; [2] Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Разработка невирусных векторов, обеспечивающих эффективную экспрессию генов в эукариотических системах, является активно развивающейся областью, имеющей важное прикладное значение, в первую очередь для генетической терапии и вакцинации. При этом, перспективным представляется использование минимизированных векторов на основе ПЦР-фрагментов. Однако, в настоящее время, эффективность функционирования подобных экспрессионных конструкций количественно оценена недостаточно. Нами проведена сравнительная оценка экспрессионной эффективности различных генетических конструкций: кольцевого плазмидного вектора, лианеризованного плазмидного вектора и линейного вектора на основе ПЦР-амплификата. В качестве целевого гена использовали маркерный ген люциферазы светлячка Photinus pyralis под кон-

тролем цитомегаловирусного промотора. Для введения ДНК в клетки HEK293 был использован коммерческий полимерный катионный трансфицирующий агент TurboFect. Показано, в использованном диапазоне концентраций для всех проанализированных вариантов экспрессионных векторов наблюдается практически линейная зависимость уровня люциферазной активности в культуре от количества вектора, что свидетельствует об отсутствии истощения белоксинтезирующего аппарата клетки или систем транспорта векторных молекул в ядро. Также все экспрессионные конструкции обеспечивают накопление сопоставимых количеств маркерного белка. При использовании для получения конструкций разных количеств (25; 35) циклов в ПЦР, наблюдается понижение экспрессионной эффективности вектора примерно в 2 раза, что очевидно связано с накоплением мутаций в экспрессионной кассете. Полученные данные характеризуют перспективность медико-биологического использования векторов на основе ПЦР-фрагментов. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-04-05169.*

ПИЛЛАРАРЕНЫ КАК СРЕДСТВА ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

П.В. Скворцова[1,2], Д.Н. Шурпик[2], Е.А. Ермакова[1], И.И. Стойков[2], Ю.Ф. Зуев[1], Б.И. Хайрутдинов[1,2]
[1]Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН; [2]Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Разработка систем для эффективного переноса генетического материала является одним из наиболее перспективных научных направлений медицинской терапии и диагностики. Такие системы могут быть основаны на использовании супрамолекулярных платформ в качестве трансфекционных агентов. Пиллар[5]арены – класс новых макроциклических соединений, которые потенциально могут выступать как универсальные платформы для создания транспортных систем для доставки плазмидной ДНК в клетку, что может быть использовано для медико-биологического применения: получение рекомбинантных белков, генотерапии. В работе исследована способность 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-дека-[(N-(2’,2’,2’-триэтиламиноэтил)-карбамоилметокси]-пиллар[5]арен декайодида взаимодействовать с ДНК. В качестве модели ДНК была выбрана двухцепочечная палиндромная молекула декамера ДНК d(GCGATCGC)2 из банка данных Биологического магнитного резонанса (www.bmrb.wisc.edu). Выполнено полное соотнесение спектров ЯМР пиллар[5]арена и олигонуклеотида в буферном растворе с использованием двумерных гомо- и гетеро-ядерных спектров ЯМР: COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC. Образование комплекса пиллар[5]арена с олигонуклеотидом ДНК подтверждено методами ЯМР диффузометрии и двумерной NOESY спектроскопии. Показано, что связывание происходит преимущественно по малой бороздке ДНК. На основании экспериментальных данных с помощью метода молекулярного докинга получена трехмерная структура комплекса. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №17-03-00858а.*

ЭКСПРЕССИЯ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЦЕКРОПИНА Р1 В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ В УСЛОВИЯХ АНТИБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

С.В. Тарлачков, Т.В. Шевчук, Н.С. Захарченко, О.В. Дьяченко, Я.И. Бурьянов
Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

Исследованы трансгенные растения табака *(Nicotiana tobaccum*) и каланхоэ (*Kalanchoe pinnata*) экспрессирующие ген антимикробного пептида цекропина Р1 (cecP1) под контролем промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (35S) и селективный маркерный ген неомицинфосфотферазы II (nptII) под промотором гена нопалинсинтазы (nos). Методом qRT-PCR показано повышение экспрессии гена антимикробного пептида у табака, выращенного на среде с канамицином (25 мг/л) в 3 раза по сравнению с контролем. С помощью вестерн-блот-анализа было обнаружено более высокая интенсивность положительных сигналов цекропина в растениях каланхоэ, растущих на среде с канамицином. Проведенный с помощью денситометрии расчет показал, что в экстрактах Км+ каланхоэ количество цекропина Р1 оставляет 0,052±0,004% от общего растворимого белка, а в Км – растениях – 0,018±0,005%. Проведен сравнительный анализ метилирования промотора 35S гена cecP1 методом бисульфитной конверсии. Метилирование промотора 35S характеризуется низким уровнем, как у табака, так и у каланхоэ, что свидетельствует о его активном состоянии. При этом в условиях культивирования растений на среде с канамицином наблюдается дальнейшее снижение его метилирования и повышение синтеза цекропина Р1. Экспрессия гена цекропина Р1 в растениях способствует повышению их устойчивости к действию стрессовых факторов антибиотического характера и указывает на включение этого гетерологичного гена в интегральную систему стрессоустойчивости. Ранее авторами было показано участие гена цекропина Р1 в повышении устойчивости к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. В дальнейшем будет исследована природа сигнала, регулирующего синтез цекропина Р1, и молекулярных механизмах его передачи. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 16-04-00623, 15-08-03362).*

7-(1-МЕТИЛ-1Н-ПИРРОЛ-3-ИЛ)-4,6-ДИНИТРО-2,1,3-БЕНЗОКСАДИАЗОЛ 1-ОКСИД (4В)СНИЖАЕТ ЧАСТОТУ ИНДУЦИРОВАННЫХ ЦИПРОФЛОКСАЦИНОМ МУТАЦИЙ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У БАКТЕРИЙ

Е.Ю. Харченко, В.А. Чистяков, Е.В. Праздноваа, С.В. Курбатов, М.С. Мазанко
Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Применяемые антимикробные препараты нередко индуцируют мутации у микроорганизмов, вызывая появление форм, устойчивых к целому ряду антибиотиков. Показано, что основным генератором мутаций резистентности является система SOS- или склонной к ошибкам репарации. Сегодня ведется скрининг соединений – ингибиторов SOS-ответа, которые позволили бы предотвратить быстрое развитие бактериальной резистентности к антибиотикам. Однако ни один из этих классов соединений не проявил своей биологической активности *in vivo*, поскольку они не проникают через мембранный барьер. Ранее нами было обнаружено соединение7-(1-метил-1Н-пиррол-3-ил)-4,6-динитро-2,1,3-бензоксадиазол 1-оксид (4b) с высоким ДНК-протекторным эффектом, защищавшее ДНК от повреждений, вызванных мутагеном-окислителем диоксидином и способное генерироватьNO (II) *in vivo*. Экспериментальный подход заключается в использовании Lux-биосенсоров на основе *E. coli*, отвечающих на запуск SOS-пути усилением свечения, позволяя выявить соединения-ингибиторы. Показано, что 4b снижало частоту спонтанного мутагенеза. При совместном действии с ципрофлоксацином рост частоты мутантов был ниже, чем в случае действия одного ципрофлоксацина. Концентрация вещества 4b, вызывавшая стопроцентное подавление Rec-индукции, не блокировала полностью индуцированного ципрофлоксацином мутагенеза. По-видимому, SOS-путь является

главным, но не единственным механизмом индукции ципрофлоксацином мутаций антибиотикорезистентности. 4bможно рекомендовать использовать в качестве отправной точки для разработки лекарств, блокирующих мутагенез, ассоциированный с появлением антибиотикорезистентных бактерий. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ, проект № 14-13-00103.*

УЧАСТИЕ БЕЗ ДОКЛАДА

ИЗМЕРЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФИТИНА В ПЛОДАХ ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ ОРЕХА НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА

Ф.Р. Аль Хачами[1], О.А. Землянухина[1], В.Н. Вепринцев[2], В.Н. Калаев[1], Н.Н. Черкасова[3], В.А. Славский[4]
[1]Воронежский государственный университет; [2]Филиал «Рослесозащита» – ЦЗЛ Воронежской области, Воронеж; [3]Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова, Воронежская область; [4]Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, Воронеж, Россия

Фитин, являясь основным фосфорсодержащим компонентом клеток многих растений, играет значительную роль в процессах прорастания семян, ускоренного роста и накопления биомассы. Основными проблемами при определении содержания солей фитиновой кислоты является его труднодоступность в связи с плохой растворимостью как в спирте, так и водных растворах, а также большим содержанием жиров и белков в семенах. В работе предлагается модификация метода определения фитина, заключающаяся том, что на первом этапе происходит его очистка по методу выделения растительных ДНК, а именно, обработка солянокислой вытяжки (0.5 М HC1) смесью изоамилового спирта с хлороформом (1:24; v:v). После энергичного перемешивания смеси ее центрифугировали на центрифуге CM50 ELMI (Латвия) в течение 3 мин при 4200 g. Снятие спектра поглощения тиоцианата проводили на нанофотометре IMPLEN P 330 (Германия). Содержание фитина определяли в прозрачной надосадочной жидкости с использованием железо-тиоцианатного комплекса при длине волны 337 нм при колориметрировании на спектрофотометре UNICO 2800 (США) в кварцевых (обязательно предварительно откалиброванных и обсушенных) кюветах. В качестве стандарта при построении калибровочной кривой использовали водный раствор натриевой соли фитиновой кислоты (Sigma). Объектами исследования служили орехи урожая 2016 года четырех видов: орех черный (*Juglans nigra L.*); орех серый (*Juglans cinerea L.*); орех манчжурский (Juglans mandshurica Maxim.); орех сердцевидный (Juglans cordiformis Maxim.). Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ \"Stadia\". Было установлено, что минимальное количество фитина отмечается у ореха серого 14,75±0,32 мг/г с.м., далее следует орех черный 15,05±0,98 и манчжурский 16,13±0,23 мг/г с.м. (различия с орехом серым достоверны ($p<0.05$)), максимальные значения фитина отмечаются в эндосперме ореха сердцевидного 17,45±0,24 мг/г с.м. (различия с орехом манчжурским, черным и серым достоверны ($p<0.05$)). Модификация метода позволяет получать абсолютно прозрачные образцы, стабилизировать результирующую окраску до 10 мин, показывать минимальный разброс результатов за счет измерения поглощения при длине волны 337 нм, определять низкое содержание фитина в пробе (в диапазоне от 0,08 до 4 мг на 1 г сырой массы).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА УНИКАЛЬНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ИДИОТИПИЧЕСКИХ И АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ЭСТРАДИОЛУ

К.В. Арнст, А.В. Остапцева, А.Е. Студенников, А.Н. Глушков, В.А. Устинов
Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН; Институт экологии человека, Кемерово, Россия

Профилактика рака, предупреждение его возникновения и развития основаны на современных знаниях механизмов канцерогенеза. Эстрадиол (Е2) является наиболее активным природным эстрогеном в системе циркуляции как женщин, так и мужчин. Е2 играет центральную роль в развитии гормон-зависимого канцерогенеза, являясь эндогенным соединением, вызывающим малигнизацию. Антитела занимают центральную роль в иммунной защите организма. Они уже относительно давно стали применяться в терапии ряда заболеваний, благодаря их исключительным свойствам – высокой специфичности, наличию эффекторных функций, способности проникать в ткани и выводиться из организма с помощью естественных механизмов. Целью исследования было получение человеческих одноцепочечных антител к Е2: идиотипических (АТ1) и антиидиотипических (АТ2). Был проведен скрининг наивной фаговой библиотеки человека, в результате чего были отобраны 17 клонов с положительным ответом на на конъюгат Е2-БСА. После анализа аминокислотной последовательности, было выбрано 4 одноцепочечных АТ1. Все полученные антитела являлись уникальными и не имели аналогов в имеющихся базах данных. Все четыре антитела были экспрессированы и выделены из бактерий. Аффинность полученных антител к Е2 была измерена методом плазмонного резонанса. Максимальное связывание было обнаружено для АТ1 – 119. Оно было использовано для скрининга той же фаговой библиотеки для поиска АТ2 к Е2. После скрининга наивной фаговой библиотеки было отобрано и проанализировано ДНК 9 антител, одно из которых оказалось уникальным.

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ ДНК ЛЕГКИХ И ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ НА УРОВЕНЬ ПРОДУКЦИИ И ОДНОРОДНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Д.С. Балабашин[1], Т.К. Алиев[2], А.А. Панина[1], Д.А. Долгих[1,3], М.П. Кирпичников[1,3]
[1]Лаборатория инженерии белка, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; [2]Химический факультет и [3]Биологический факультет, МГУ им М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Получение стабильных линий клеток на основе линии CHO DG44 сопровождается селекцией с применением химических агентов и в культуре присутствуют только клетки, со вставками в геноме генов цепей антитела в оптимальном соотношении. Такое соотношение генов достигается благодаря концентрации химических селективных агентов и редко приводит к токсичности для конечной культуры. При транзиентной экспрессии антител в эукариотических клетках селекция не производится и соотношение генов цепей антитела может быть задано только пропорциональным внесением генетического материала в клетки при проведении трансфекции. Для целей выяснения оптимального соотношения плазмидных ДНК для транзиентной экспрессии плазмиды, содержащие по отдельности гены тяжёлой и лёгкой цепей антитела против гликопротеина вируса

Эбола в составе векторов pcDNA3.4-HC (7475 п.о.) и pcDNA3.4-LC (6734 п.о.) были внесены в соотношениях (w/w) от 4:1 до 1:4. Полученные антитела из кондиционированной среды выделяли с применением аффинной хроматографии на колонках GE со смолами Protein A Sepharose и KappaSelect. В результате проведенного электрофоретического и хроматографического анализов было показано, что избыток вектора pcDNA3.4-HC над pcDNA3.4-LC вызывает уменьшение жизнеспособности клеток в культуре и приводит к образованию нетипичных по молекулярной массе фрагментов антител. Избыток pcDNA3.4-LC над pcDNA3.4-HC, а также трансфекция эквимолярными количествами ДНК приводят к образованию избытка свободных лёгких цепей. При этом не наблюдается уменьшение жизнеспособности культуры клеток-продуцентов и не происходит образование нетипичных фрагментов антител. В результате проведенных экспериментов было выяснено, что оптимальным соотношением векторов pcDNA3.4-HC и pcDNA3.4-LC может являться соотношение от 1:1 до 1:2. Такое соотношение позволяет повысить уровень продукции и однородность целевых антител. При проведении трансфекции для получения стабильной линии использование оптимального соотношения плазмид может уменьшить время получения стабильной культуры продуцента.

ПОЛУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО-АКТИВНЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ И АДАПТИРОВАННЫХ К ХОЛОДУ ФЕРМЕНТОВ: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСПРЕССИИ И ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ

В.А. Голотин[1,2], И.Ю. Бакунина[1], О.Ю. Портнягина[1], Н.Ю. Ким[1], Н.С. Чопенко[2], В.А. Рассказов[1], О.Д. Новикова[1]
[1]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова РАН; [2]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

В настоящее время технологии рекомбинантных ДНК являются неотъемлемым инструментом фундаментальных и прикладных исследований. Возможности сверхэкспрессии целевых генов в клетках-суперпродуцентах позволяют получать целевой рекомбинантный белок в количествах, на несколько порядков превышающих содержание их природных аналогов в организме-источнике. В данной работе в клетках-продуцентах *E. coli*: были получены рекомбинантные адаптированные к холоду ферменты α-N-ацетилгалактозаминидаза и α-галактозидаза из морских бактерий *Arenibacter latericius* КММ 426Т и Pseudoalteromonas sp. КММ 701. В результате оптимизации условий экспрессии содержание рекомбинантных белков в сыром клеточном экстракте удалось увеличить вплоть до 200 мг из 1 л трансгенной бактериальной культуры. Для полученных α-N-ацетилгалактозаминидазы и α-галактозидазы была показана их способность к конвертации А и В-эритроцитов человека, соответственно. Одной из наиболее интересных возможностей генной инженерии является возможность получения функционально активных водорастворимых белков, в том числе мембранных белков в водорастворимой форме. Последнее позволяет проводить изучение мембранных белков без применения детергентов и денатурирующих агентов, которые значительно осложняют эксперименты, в которых объектами исследования служат клеточные культуры и/или живые клетки. С помощью белка-шаперона DsbC при оптимизации условий экспрессии и состава экспрессионной среды удалось получить функционально активный водорастворимый OmpF порин из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*, который используется в качестве антигена для дифференциальной диагностики псевдотуберкулеза. Показано, что очищенный препарат водорастворимого порина и полученный ранее его нерастворимый аналог обладают схожими иммуногенными свойствами и антигенной активностью. Подобие пространственных структур обоих рекомбинантных белков подтверждено методами оптической спектроскопии. *Работа выполнена при поддержке гранта №15-I-5-004 фундаментальных исследований по программе ДВО РАН «Дальний Восток».*

РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ЭКСПРЕССИИ И ОЧИСТКИ ОДНОДОМЕННОГО АНТИ-ERBB3 АНТИТЕЛА ИЗ ПЕРИПЛАЗМЫ И ЦИТОПЛАЗМЫ *E. COLI* ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

И.Е. Елисеев[1], Н.А. Беседина[1], А.Н. Юденко[1], А.Б. Улитин[2], В.М. Екимова[2], С.Р. Евдокимов[2], Ю.В. Путинцева[2], И.Н. Тертеров[1], А.А. Богданов[1], М.В. Дубина[1]
[1]Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет РАН;[2]ЗАО «Биокад», Санкт-Петербург, Россия

Моноклональные антитела к рецепторным тирозинкиназам ErbB1 и ErbB2 используются в терапии онкологических заболеваний уже более 10 лет. Однако все больше данных свидетельствуют о том, что третий член семейства, ErbB3, ответственен за развитие резистентности к ингибиторам ErbB2, что обуславливает необходимость разработки анти-ErbB3 антител. Направленная оптимизация свойств таких антител *in silico* требует определения структур комплексов антитело-ErbB3. В данной работе мы представляем разработанные нами системы для экспрессии и очистки ранее отобранного однодоменного антитела для последующих структурных исследований. Для экспрессии антитела в периплазме *E. coli* была создана конструкция на основе вектора pET22b, содержащая сигнальный пептид pelB и гистидиновый таг. Разработанная схема очистки, включающая этапы выделения периплазматической фракции, аффинной хроматографии на Ni-NTA, анионообменной хроматографии на колонке MonoQ и гель-фильтрации на колонке Superdex 75 позволила получить электрофоретически чистый белок с замкнутой дисульфидной связью и выходом 7 мг/л культуры. Для экспрессии антитела в цитоплазме *E. coli* нами был использован новый штамм Shuffle T7 Express. Были созданы генетические конструкции на основе векторов pSol, кодирующие гибридные белки, в которых для улучшения растворимости GST либо SUMO были соединены с антителом при помощи сайта TEV протеазы. После аффинной хроматографии антитело было отделено от GST либо SUMO при помощи TEV протеазы и далее очищено по приведенному выше протоколу. В результате было получено электрофоретически чистое антитело с замкнутой дисульфидной связью и выходом 12 мг/л культуры. Структура и стабильность полученных антител были проанализированы методами кругового дихроизма и дифференциальной сканирующей калориметрии. Структурные и термодинамические данные оказались идентичными для антител, полученных в обеих системах, и свидетельствуют о наличии характерного иммуноглобулинового фолда и высокой стабильности белков, что позволяет использовать их для исследования структуры и механизма связывания с ErbB3. *Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификатор: RFMEFI57716X0217; соглашение 14.577.21.0217).*

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССА БИОДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ПОЧВЫ

О.Ю. Заборская, Э.А. Крамм, А.Ю. Заборская
Московский политехнический университет, Москва, Россия

Нефть и нефтепродукты в современном мире используются в самых разных отраслях человеческой деятельности. Добыча нефти из недр является сложным процессом, включающим в себя добывающие, производственные и обслуживающие объекты. Наиболее подвержены загрязнениям в результате аварийных ситуаций территории и почвы, расположенные в непосредственной близости от предприятий, транспортных коммуникаций, трубопроводов. Многие загрязняющие вещества, в том числе нефтепродукты, претерпевают изменения при попадании в почву. В ходе жизнедеятельности почвенной микрофлоры осуществляется процесс разложения загрязнителей или биоремедиация. Для аэробных микроорганизмов одним из важнейших факторов, влияющих на процессы жизнедеятельности, является кислород. Процесс естественной аэрации почвы обусловлен особой пористой структурой самой почвы. Как правило, степень доступа кислорода зависит от глубины слоя почвы. Очевидно, что на поверхности почвы газообмен проходит активно, тогда как, в более глубоких слоях почвы он будет явно затруднен. Таким образом, для интенсификации процессов, которые происходят в ходе жизнедеятельности аэробных микроорганизмов, возможно применение принудительной аэрации почвы. Изучение процесса биоремедиации загрязненных почв проводилось с использованием биореактора открытого типа и аборигенной микрофлоры почв. На первой стадии изучения был поставлен ряд экспериментов с мешалками-аэраторами различных типов. На базе гребковой мешалки, показавшей себя наиболее эффективной, с учетом ее недостатков была сконструирована мешалка-аэратор сателлитного типа. На второй стадии изучения проводилась серия экспериментов по оценке проведения биодеградации углеводородов в почве при использовании сателлитной мешалки-аэратора, которая доказала эффективность новой конструкции. В ходе исследования был замечен и изучен ряд особенностей траекторий движения штырей новой мешалки в почве. Для эффективного проведения процесса биодеградации нефтепродукта в почве необходимо обеспечить наиболее полную аэрацию объема загрязненной почвы. При использовании биореатора открытого типа можно осуществить подбор режима, при котором минимальное время перемешивания обеспечит отсутствие потери эффективности потребления загрязнения без дополнительных энергозатрат.

ОСОБЕННОСТИ РОСТА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ ОКСИД ГЕРМАНИЯ

Д.О. Карякин[1], В.Ю. Кулабухов[1], Н.В. Мальцевская[2], Эрлих Германн[3] *[1]Московский политехнический университет, Москва;[2]ГБПОУ «Воробьевы горы», Москва; [3]Технический университет Горная академия Фрайберга, Фрайберг, Германия*

При получении чистого германия – при разработке скважин из бурого (германиеносных лигнитов) и каменного угля, происходит выделение большого количества углекислого газа, а также образование труднорастворимого осадка в водных растворах. [Казанцев Я.В. и др., 2016] Использование одноклеточных микроводорослей позволяет решить сразу две проблемы – поглощение углекислого газа и улавливание мельчайших частиц оксида германия [Масленко Ю.В., 2004]. Исследовано влияние диоксида германия, содержащегося в питательной среде на процесс роста фототрофных микроорганизмов *Chlorella vulgaris*. Проведен опыт на жидкой питательной среде Тамия, в которую добавляли оксид германия в различных концентрациях - варьировали от 0 до 5 г/л. Выявлена локализация диоксида германия в клетках микроводорослей. Полученные результаты могут быть использованы для сорбции GeO2 из загрязненных вод и ассимиляции углекислого газа. Итоговое содержание ионов германия определяли методом РФЭС. Динамику накопления биомассы микроводорослей определяли по оптической плотности с помощью спектрофотометра UNICAM 8625 UV/VIS, где было установлено, что у контрольных образцов (у контрольных образцов без диоксида германия наблюдается рост, в более чем в четыре раза превышающий у экспериментальных образцов с диоксидом германия). Основываясь на данных эксперимента, локализация оксида германия происходит, предположительно, в клеточной стенке микроводорослей. Также, анализ полученных результатов показал, что содержание германия в растворе питательной среды с биомассой микроводорослей не должно превышать 3% (в пересчете на чистый вес).

Литература

1. Al-Qunaibit M., Khalil M., Al-Wassil A. The effect of solvents on metal ion adsorption by the alga Chlorella vulgaris //Chemosphere. – 2005. – Т. 60. – №. 3. – С. 412-418.
2. Казанцев Я. В., Файбисович Е. С. ИЗВЛЕЧЕНИЕ ГЕРМАНИЯ ИЗ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ //Материаловедение и технологии материалов (ИЦМиМ). – 2016. – С. 16.
3. Масленко Ю. В., Мальченко А. К. Германий, как попутное сырье при добыче угля. Наукові праці ДонНТУ. Серія «Гірничо-геологічна». Випуск 81,– 2004. – с. 74 – 78.

ИЗУЧЕНИЕ РАЗДРАЖАЮЩИХ СВОЙСТВ НОВОЙ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ ДОБАВКИ

А.Г. Кощаев, В.А. Мищенко, В.В. Радченко, Ю.А. Лысенко
Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина, Краснодар, Россия

Мировой опыт показывает, что в решении проблем заболеваемости животных и птиц желудочно-кишечными инфекциями, вызванных дисбалансом полезной и условно-патогенных микроорганизмов в сторону последних, огромное значение имеет использование пробиотиков. В последнее время появляются новые отечественные пробиотические добавки и препараты, которые требуют детального изучения и внедрения в производство. В связи с этим, целью наших исследований явилось изучить раздражающие свойства новой жидкой пробиотической добавки. Объектом исследований являлась жидкая форма пробиотической добавки Трилактокор, состоящая из лактобактерий – *Lactobacillus agilis, Lactobacillus intermedius* и *Lactobacillus salivarius*, которые независимыми микробиологическим методом, методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени и метагеномными методами были выделены из слепых отростков желудочно-кишечного тракта перепела. Изучение кожно-резорбтивного действия и раздражающего свойства на слизистые оболочки глаз, а также влияние пробиотической добавки Трилактокор на слизистую ротовой полости осуществляли согласно ГОСТ Р ИСО 10993.10-99. Результаты накожных аппликаций показали, что в ходе опыта у лабораторных кроликов-альбиносов местного покраснения не выявлено, признаки повышенной чувствительности, припухлости, воспаления, образования эритемы и отека кожи – отсутствовали. При проведении конъюктивальной пробы кроликам-альбиносам установлено, что введение прбиотика вызывало незначительное покраснение слизистой оболочки, а также выделение слезных желез сразу после инсоляции. Однако, данное явление пропадало через 1–2 мин. При дальнейшем осмотре и наблюдении патология отсутствовала. Общее со-

стояние подопытных животных через 1; 24; 48 и 72 часа оставалось положительным. Изучение дополнительного раздражающего свойства пробиотической добавка Трилактокор на хомячках показало, что слизистая защечных мешков с двух сторон во всех опытных группах, не зависимо от дозы биопрепарата была без покраснений и чистой. Припухлости, отеки и эритемы – не зарегистрированы. Таким образом, проведенный комплекс исследований показал, что биопрепарат не проявляет раздражающего свойства.

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ, ВЫДЕЛЕНИЕ И СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКТОДОМЕНА IRR

А.А. Можаев, И.Е. Деев, А.Г. Петренко
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Инсулин рецептор-подобный рецептор (IRR) принадлежит к подсемейству инсулиновых рецепторов, в которое также входят инсулиновый рецептор (IR) и рецептор инсулин-подобного фактора роста (IGF-IR). Все три рецептора высокогомологичны и, предположительно, имеют близкие механизмы функционирования. Нашей лабораторией впервые было показано, что IRR, к которому до сих пор не найден пептидный лиганд, является единственным известным на сегодняшний день тирозинкиназным рецептором - сенсором внеклеточной щелочной среды. Конечной целью данной работы является определение трехмерной структуры внеклеточной части рецептора IRR (ectoIRR) в активном и неактивном состоянии. Анализ структуры ectoIRR представляет особый интерес для понимания фундаментальных основ механизма щелочной активации, а также для развития новых терапевтических подходов и созданию лекарств для лечения заболеваний, связанных с нарушением кислотно-щелочного равновесия. Для достижения поставленной цели нами был поэтапно решен ряд задач. В первую очередь подобраны условия экспрессии и внеклеточной продукции растворимой формы ectoIRR в клетках CHO K1. Нами был достигнут выход порядка 0,5–1,0 мг с литра культуральной жидкости. Дальнейшим этапом мы разработали схему очистки, позволившую выделять белок с чистотой более 95%. Очистку из культуральной жидкости проводили с помощью ионообменной хроматографии на сорбенте TOYOPEARL DEAE-650M с элюцией линейным градиентом. Следующим этапом стала повторная очистка гель-фильтрацией на Superdex 200. Степень чистоты выделенного белка оценивалась с помощью SDS-PAGE электрофореза и аналитической гель-фильтрацией, идентификация проводилась масс-спектрометрическим анализом MALDI-TOF и постановкой Western-blot анализа с антителами специфичными к нашему белку. Проведен анализ выделенного ectoIRR методами кругового дихроизма, электронной микроскопии с негативным контрастированием, малоуглового рентгеновского рассеяния. На основе полученных при малоугловом рентгеновском рассеянии данных предложена его пространственная модель. Показано, что конформация ectoIRR меняется при повышении pH среды от 7,4 до 9,0. *Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Проект: 14-50-00131).*

ХИМЕРНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ BST-ПОДОБНОЙ GSS-ПОЛИМЕРАЗЫ С УЛУЧШЕННОЙ ПРОЦЕССИВНОСТЬЮ И УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ИНГИБИТОРАМ

И.П. Оскорбин, Е.А. Белоусова, У.А. Боярских, А.И. Закабунин, Е.А. Храпов, М.Л. Филипенко
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

В настоящее время актуальным трендом в медицинской диагностике является разработка практических методов для диагностики у постели больного и исследовательских методов, таких как полногеномная амплификация (ПГА). Эти методики основаны на использовании специфических ДНК-полимераз, обладающих цепь-вытесняющей активностью, высокой процессивностью, точностью и устойчивостью к ингибиторам (компонентам анализируемых образцов либо реагентам для очистки). Нами был создан ряд химерных белков на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I Geobacillus sp. 777 и ДНК-связывающих белков: ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы Pyrococcus abyssi или Sto7d Sulfolobus tokodaii, аналога Sso7d. Химерные ДНК-полимеразы DBD-Gss и Gss-Sto продемонстрировали одинаковый с исходной Gss-полимеразой уровень термостабильности, терминально-трансферазной активности и точности. Процессивность химерных ферментов возросла до трех раз, в результате чего количество продуктов ПГА возросло в четыре раза. Кроме того, присоединение ДНК-связывающих белков повысило устойчивость химерных ДНК-полимераз в LAMP к действию распространенных примесей в образцах ДНК: мочевине, цельной крови, гепарину, NaCl. Таким образом, химерные ДНК-полимеразы могут стать полезным инструментом как для диагностики у постели больного, так и для ПГА за счет возросшей процессивнсоти и устойчивости к ингибиторам.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАТНОГО АЛЛЕРГЕНА БЕРЕЗЫ Bet v 1 И РАЗРАБОТКА ИММУНО-ПЦР АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА Е

В.Д. Пивоваров, М.А. Симонова, Д.Ю. Рязанцев, М.А. Костромина, Р.С. Есипов, С.К. Завриев
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Использование рекомбинантных аллергенов облегчает процесс серодиагностики. Мы экспрессировали и выделили рекомбинантный белок Bet v 1, с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) показали его способность связываться со специфическими иммуноглобулинами класса Е (IgE), а также разработали новый метод детекции специфического IgE – иммуноПЦР анализ (иПЦР). Кодирующий Bet v 1 ген был получен методом обратной транскрипции мРНК из пыльцы *Betula pendula* и клонирован в вектор для экспрессии в *E.coli*. Белок Bet v 1 накапливался в телах включения, и его содержание относительно клеточных белков составляло не менее 31%. После солюбилизации тел включения и ренатурации проводили очистку Bet v 1 с помощью металл-аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Чистота полученного белка составляла не менее 98% согласно электрофорезу. ИФА подтвердил способность Bet v 1 связываться со специфическими IgE. Использовали сыворотки крови, в которых ранее с помощью методов клинической диагностики были обнаружены специфические IgE на аллергены березы, а также сыворотки без этих специфических IgE. Bet v 1 использовался в качестве сорбируемого твердую фазу антигена. ИФА сывороток против Bet v 1 позволил корректно определить положительные и отрицательные на специфические IgE к аллергенам березы сыворотки. Следовательно, полученный рекомбинантный белок Bet v 1 может быть использован для серодиагностики специфических IgE. Был разработан анализ специфических к Bet v 1 IgE на базе иПЦР. Формат метода соответствовал ИФА с применением биотинилированных анти-IgE антител. В качестве детектирующей мет-

ки использовался комплекс биотинилированной ДНК и стрептавидина. Обнаружение связавшейся ДНК-метки проводилось методом количественной ПЦР в реальном времени. Разработанный метод позволил корректно определить положительные и отрицательные по специфическим IgE сыворотки. Чувствительность метода иПЦР была сравнима с чувствительностью ИФА, но числовые данные, полученные иПЦР, в отличии от ИФА, демонстрировали линейную зависимость, что потенциально позволяет проводить количественную оценку специфического IgE с использованием только одного разведения сыворотки, а не серии разведений, как в ИФА. *Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16 14-00136) и стипендии Президента РФ СП-4413.2015.4*

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИИ

Е.Б. Рукавцова, В.В. Алексеева, С.В. Тарлачков, Н.С. Захарченко, Я.И. Бурьянов
Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

Нами проводится разработка нового поколения безопасных безмаркерных трансгенных растений для фармакологии. Созданы генетические конструкции для получения растений, синтезирующих поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и резвератрол. Для экспрессии в растениях генов поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и стильбенсинтазы винограда (STS) использованы промоторы различной силы. В качестве объектов исследования выбраны томаты, картофель, а также модельные растения табака. Последовательность гена HBsAg была модифицирована с учетом частоты встречаемости кодонов в растениях. Для повышения синтеза антигена получены растения с геном HBsAg под контролем промотора CaMV 35S с четырьмя энхансерами. Экспрессия гена HBsAg в листьях таких растений возросла не менее, чем в 2–10 раз по сравнению с экспрессией под контролем других промоторов. Синтез HBs-антигена составил до 0,1% от общего растворимого белка, что достаточно для получения вакцины против гепатита В. Получено несколько линий трансгенных растений табака с геном стильбенсинтазы винограда STS. Экспрессия гена STS в трансгенных растениях показана с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Обнаружено влияние повышенной экспрессии гена STS на морфологию цветков и репродуктивные свойства растений. Проводятся эксперименты по отбору трансгенных растений томата с геном стильбенсинтазы. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 16-08-00511*.

ПОЛУЧЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО АНТИИДИОТИПИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ

А.Е. Студенников, В.В. Морозова, Н.В. Тикунова, А.Н .Глушков, В.А. Устинов
Институт экологии человека ФИЦ угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия

В сыворотке крови людей (здоровых и больных раком легкого) присутствуют как идиотипические (АТ1), так и антиидиотипические антитела (АТ2) к бенозо[а]пирену (БП). Эти АТ1 и АТ2 могут быть маркерами экспозиции к химическим канцерогенам у рабочих химической и углеперерабатывающей промышленностей. После иммунизации мышей конъюгатом БСА-БП в сыворотке крови животных появляются АТ1 к БП и соответствующие АТ2. Было показано на модельных животных замедление роста опухолей индуцированных БП после иммунизации моноклональными мышиными АТ2. Предложено использовать АТ2 в иммунотерапии и иммунопрофилактики рака. Цель данной работы-получение и характеристика АТ2 для изучения иммунного ответа к БП и создание количественного метода иммунологического анализа. Для этого была проскринирована фаговая наивная библиотека здоровых людей с помощью мышиного одноцепочечного АТ1, специфичного к БП. А4, АТ2 к БП, было выбрано для дальнейшей работы. Антитело было экспресированны в бактериях и выделено двумя разными методами. В иммуноферментном анализе А4 узнавало не только мышиное одноцепочечное АТ1, но и человеческое одноцепочечное АТ1 к БП. Конкурентный иммуноферментный анализ показал, что А4 связывает активные центры обоих АТ1. Были рассчитаны константы связывания между А4 и АТ1 к БП на ProteOn. Таким образом, мы получили и охарактеризовали новое АТ2 к БП. *Работа поддержана финансированием гранта РНФ № 16-15-00034 “Разработка тест-системы для доклинической диагностики онкологических рисков у рабочих предприятий угольного цикла”.*

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ В ДРОЖЖАХ *PICHIA PASTORIS*

Д.С. Трошагина, А.Д. Сулейманова, М.Р. Шарипова *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Проблема недостатка усвояемого фосфора в кормах животных является актуальной и обусловлена тем, что в кормовом зерне значительная часть фосфора присутствует в виде нерастворимых фитатов. Микробные фитазы способны расщеплять фитаты с освобождением фосфатов и могут быть использованы в качестве добавок в корма животных. Для продукции рекомбинантных белков широко используются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*, которые обеспечивают более высокий выход целевого белка и более эффективную его секрецию, в сравне-нии с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*. Цель работы – клонирование и экспрессия гена бактериальной фитазы Pantoea sp. 3.5.1 для секреции в дрожжах *Pichia pastoris*. В работе использовали последовательность гена гистидиновой кислой фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 – agpP (AN KJ783401.1). Для корректной экспрессии в дрожжах проводили кодон-оптимизацию гена. Для клонирования гена использовали интегративные дрожжевые вектора pPINK-HC (высококопийный) и pPINK-LC (низкокопийный) и последовательность сигнального пептида гена α-амилазы Aspergillus niger. На основе дрожжевых векторов получили четыре генетические конструкции, содержащие оптимизированный ген фитазы *Pantoea* sp.3.5.1 (agpP) под контролем индуцибельного промотора AOX1 и сигнального пептида α-амилазы. Проводили трансформацию дрожжей Pichia pastoris полученными конструкциями. Для этого выбрали беспротеазный штамм (ade2, pep4, prb1), у которого делетированы гены секретируемых протеиназ и который является ade2 ауксотрофом и не способен расти при отсутствии аденина в среде. Интеграция в геном дрожжей экспрессионных векторов позволяет ему расти на среде без аденина. Получено восемь рекомбинантных штаммов *P. pastoris*, в геном которых интегрирован ген бактериальной фитазы agpP. Результаты вестерн-блоттинга и анализа фитазной активности показали, что бактериальная фитаза AgpP экспрессируется и секретируется в культуральную жидкость рекомбинантными дрожжами *P. pastoris*. Таким образом, нами получены рекомбинантные штаммы *Pichia pastoris*, в геном которых интегрирован ген бактериальной фитазы. Показано, что рекомбинантная фитаза экспрессируется и секретируется в культуральную среду рекомбинантными дрожжами. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 16-14-00114.*

ПОЛУЧЕНИЕ МУЛЬТИФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ДЛЯ ПРЕПАРАТИВНОГО СИНТЕЗА 2'-ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ ИЗ СООТВЕТСТВУЮЩИХ МОНОФОСФАТОВ

С.А. Феофанов[1], Л.В. Копорова[1], О.С. Феофанова[2]
[1]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино; [2]ООО «Инновационные биотехнологии», Москва, Россия

Разработан способ получения мультиферментного комплекса, содержащего дНМФ-киназу (ЕС 2.7.4.13) фага Т5, НДФ-киназу (ЕС 2.7.4.6) из *E. coli* и полифосфаткиназу (ЕС 2.7.4.1) *Ps. aeruginosa*, перспективного для использования в технологии синтеза 2'-дезоксирибонуклеозид-5'- трифосфатов. Ранее нами был сконструирован штамм-продуцент дНМФ-киназы фага Т5, а еще ранее выделен и изучен сам фермент. Фермент обладал широкой субстратной специфичностью по отношению к акцепторам фосфата, поэтому был перспективен для использования его в процессе фосфорилирования 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфатов до соответствующих дифосфатов. Также ранее нами был сконструирован штамм-суперпродуцент НДФ-киназы из *E.coli* и отработан способ очистки фермента. НДФ-киназа *E. coli* также является ферментом, неспецифическим по отношению к акцептору фосфата, и поэтому является, на наш взгляд, перспективным в технологии фосфорилирования любого 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-дифосфата до соответствующего трифосфата. В качестве системы регенерации АТФ нами был выбран фермент полифосфаткиназа из *Ps. aeruginosa*, предоставленный нам ООО «Инновационные биотехнологии» (Москва). Этот фермент позволяет синтезировать АТФ из АДФ с использованием дешевого неорганического полифосфата, поэтому является, на наш взгляд, весьма перспективным для использования в технологически целях. Нами были изучены его каталитические свойства: $K_м$ (АДФ)=240×10^{-6} М, $K_м$ (P_n)=$3{,}4\times10^{-6}$ М, V_{max} =$5{,}0\times10^{-4}$ М.

Объединив указанные три ферментных препарата, мы получили мультиферментный комплекс для использования в синтезе 2'-дезоксирибонуклеозид-5'- трифосфатов из соответствующих монофосфатов. Комплекс обладал следующими удельными активностями: по дНМФ-киназе – 155 мкмоль/мин × мг белка, по НДФ-киназе – 60 мкмоль/мин × мг белка, по полифосфаткиназе – 75 мкмоль/мин × мг белка. Использование мультиферментного комплекса в синтезе 2'-дезоксирибонуклеозид-5'- трифосфатов показало его перспективность для технологических целей. В первых экспериментах удалось достичь глубины синтеза: для дАТФ – 90%, для дГТФ – 90%, для дЦТФ – 82%, для ТТФ – 85%.

В дальнейшем мы планируем иммобилизовать вышеназванный мультиферментный комплекс на нерастворимый носитель и создать на его основе реактор для синтеза высокочистых 2'-дезоксирибонуклеозид-5'- трифосфатов.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Avalle B. 8
Blackburn G.M. 3
Bregestovski P. 13
Britanova O.V. 10
Chaaya N. 8
Chizhov I. 80
Chudakov D.M. 10
Ciechanover A. 3
Egorov E.S. 10
Franke D. 107
Friboulet A. 8
Gabibov A. 3
Gencel Jelica 90
Hackenberg C. 102
Hajizadeh N.R. 107
Hakanpää J. 102
Izraelson M. 10
Jeffries C.M. 107
Jin Yi 3
Kasackaya S. 10
Knowles T.P.J. 93
Kussayeva A. 51
Maalouf R. 8
Masson P. 6
Matovina M. 51
Mertens H.D.T. 107
Milón Pohl 90
Nakonechnaya N. 10
Nicke A. 14
Padiolleau-Lefèvre S. 8
Panjkovich A. 107
Rauter A.P. 7
Reshetnyak A. 9
Safro M. 15
Schaffitzel Ch. 43
Semyanov A. 5
Shugay M. 10
Soreq H. 13
Sykulev Y. 7
Tuukkanen A. 107
Wardega P. 18

А

Абакумова Т.О. 64
Абакушина Е.В. 81
Абатурова С.Б. 38
Абдукаримов А. 15
Абдурахмонов И.Ю. 15
Авдеева Л.В. 47
Аветисян А.В. 151
Агапкина Ю.Ю. 139
Агапова Ю.К. 111, 129
Агаркова Е.Ю. 31
Ажикина Т.Л. 39, 48
Азаркина Р.А. 11, 17
Азев В.Н. 88, 89, 156, 157
Азизова Г.И. 83
Акасов Р.А. 172
Акпаров В.Х. 100
Аксенова Е.И. 24, 27
Акулич К.А. 28, 64
Александрова М.В. 174
Александрова С.С. 81
Алексеев А.А. 73
Алексеева А.С. 134
Алексеева В.В. 183
Алексеева И.В. 68
Алексеева О.М. 104
Алексеенко И.В. 153
Алемасова Е.Э. 79
Алешина Г.М. 63, 148
Алиев Т.К. 168, 179
Алкалаева Е.З. 43
Аллилуев А.П. 122
Алтухов Д.А. 111
Алхамед М. 64
Аль Хачами Ф.Р. 179
Альтман С. 175
Амарантов С.В. 116
Ананян А.А. 137
Анашкин В.А. 111, 143
Анашкина А.А. 40, 71
Андреев Д.Е. 28, 64
Андреев Я.А. 45, 50, 160
Андреева Л.А. 26, 147, 158
Андреева Т.В. 52
Андрианова А.Г. 129, 131
Аниканов Н.А. 19
Анисенко А.Н. 45
Анисимов Д.С. 162
Анисимова А.С. 64, 71
Антипов А.Н. 117
Антоненко Ю.Н. 77, 86
Антонов С.А. 64, 156
Антсон А.А. 38
Ануфриева К.С. 40
Арапиди Г.П. 20, 40
Арефьева А.С. 166
Армеев Г.А. 95
Арнст К.В. 179
Арсеньев А.С. 7, 44, 98, 104, 105
Арсеньева Е.Л. 156
Артамонов А.Ю. 148
Артемьев И.В. 96, 108
Артюхов В.Г. 164
Архипова С.Ф. 96
Арчаков А.И. 19, 168
Астахова Т.М. 61
Атабекова А.К. 53
Атрошенко Д.Л. 120, 126
Афанасьева А.С. 61
Афонин А.М. 33
Ачигешева П.Ю. 163

Б

Белен С. 38
Бабаков В.Н. 85
Бабенко В.В. 19
Бабкина И.И. 37
Бадретдинов А.Я. 96
Бадуев Б.К. 33
Баженов Д.О. 22
Байбакова В.В. 28
Байгильдина А.А. 130
Байдакова Л.К. 89
Бакирова Д.Р. 114
Бакунина И.Ю. 180
Бакшеева В.Е. 66
Балабан Н.П. 54
Балабан П.М. 14
Балабашин Д.С. 179
Балаев В.В. 104, 109
Балакирева А.В. 155
Баландин С.В. 68, 148, 172
Баласанянц С.М. 65, 150
Балахнин С.М. 163
Балдин С.М. 121
Балеева Н.С. 79
Балке Г.У. 16
Балобанов В.А. 93
Баранов М.С. 79
Баранова Д.С. 34
Баранова С.В. 47
Барановский А.В. 141
Баратова Л.А. 102
Бартули Ю.С. 67
Баскова И.П. 19
Батенева А.В. 160
Батищев О.В. 102
Бахолдина С.И. 127
Бахтюков А.А. 44
Бачева А.В. 129, 138
Баюнова Л.В. 81
Бедулина Д.С. 33
Безпрозванный И.Б. 70, 113
Безсуднова Е.Ю. 94, 116, 134
Бекасова О.Д. 101
Беклемишев А.Б. 169
Белецкий А. 8
Белжеларская С.Н. 38, 177
Беликов Н.Е. 80
Белова А.М 19
Белогуров А.А. 10, 152
Белозерова О.А. 90
Белозерский М.А. 124, 140
Белоусова Е.А. 182
Белошистов Р.Е. 123
Белый Т.С. 135
Белых А.Е. 147, 160
Беневоленский С.В. 140
Беркут А.А. 15, 110
Берлов М.Н. 77, 148, 149
Бертелли Е. 100
Бертран Д. 106
Беседина Н.А. 180
Беспятых Ю.А. 27
Бессолицына Е.К. 126, 142
Билова Т.Е. 16
Биркемайер К. 16
Блинова Е.А. 82
Блэкберн Д.М. 132
Бобик Т.В. 23, 130, 138
Бобкова Н.В. 65, 150, 151
Бобров К.С. 136
Бобровский П.А. 19
Бобынцев И.И. 147, 160
Бовин Н.В. 105
Богатырева Н.С. 96
Богачева Е.Н. 102
Богачук А.П. 88, 156, 157
Богданов А. 95
Богданов А.А. 76, 154, 180
Богданов И.В. 49, 171
Богданов Н.Б. 40
Богданова А. 40
Богомольная Л.М. 31
Божанова Н.Г. 5
Бойко А.А. 48
Бойко А.А. 112
Бойко К.М. 94, 103, 110, 116, 134, 138
Болдырев И.А. 134
Болдырева Е.Ф. 88
Болосов И.А. 68
Болховитина Е.Л. 77
Большакова А.В. 70
Большакова О.И. 151
Бондарева В.М. 81
Бондаренко К.С. 77
Бонч-Осмоловская Е.А. 95
Бончук А.Н. 7, 103, 110
Борвинская Е.В. 33
Борзова В.А. 60
Борнусова А.А. 65
Борщевский В.И. 126
Босманс Ф. 110
Бочаров Э.В. 7, 98, 105, 111
Бочарова О.В. 7, 98, 105
Бочкова М.С. 48
Бош А. 144
Боярских У.А. 182
Брагин П.Е. 98
Бречко Ю.В. 136
Бржозовский А.Г. 28
Бродский И.Б. 50
Бубляев Р.А. 103
Бубякина В.В. 85, 86
Бугрова А.Е. 22, 28, 30, 112
Букреева Т.В. 173
Булатов Э.Р. 141
Булко Т.В. 168
Бунева В.Н. 62, 123
Бунеева О.А. 21, 26, 78
Буравлева Е.В. 55
Буракова Е.А. 155, 162
Буриев З.Т 15
Бурлин А.И. 46
Бурнышева К.М. 71
Буров А.А. 30
Буров С.В. 172
Бурыгин Г.Л. 39
Бурьянов Я.И. 169, 170, 172, 178, 183
Бутвиловская В.И. 166
Бутенко И. 8
Бутенко И.О. 17, 19, 20

Бутов И.А. 169
Быстрицкая Е.П. 127
Быченко О.С. 39
Бычков М.Л. 14, 106, 161
Бычкова А.В. 112
Бычкова В.Е. 93
Бюльдт Г.Д. 73

В

Вавилов Н.В. 112
Валиуллина А.Х. 141
Ванжа Е.В. 176
Ванюшин Б.Ф. 35
Варакса Т.С. 22
Варижук А.М. 41
Вартапетян А.Б. 123
Варфоломеев С.Д. 80
Василевская А.В. 126
Василевский А.А. 10, 14, 15, 110
Васильев В.Б. 47, 109, 118, 144
Васильева А.Д. 112
Васильева Е.В. 157
Васильева И.А. 80, 85, 86
Васильева Н.А. 14
Васильева С.В. 162, 163
Василькова Д. 8
Васильцова М.В. 125
Василян К.В. 174
Васкан И.С. 105
Вахитова Ю.В. 58
Вахренев Р.Г. 92
Вашурина Н.С. 66
Вейко В.П. 117
Великодворская Г.А. 119
Веньяминова А.Г. 67
Вепринцев В.Н. 179
Веремеенко Е.Г. 32
Вержбицкая Т.Ю. 158
Веселова Д.А. 19
Веселовский А.В. 19, 122
Виноградов А.Д. 142, 143
Виноградов Д.В. 19
Виноградова Д.С 90, 91
Вихнина М.В. 16, 54
Владимиров В.И. 66
Владимиров Ю.А. 43
Власенко А.Ю. 47
Власкина А.В. 111, 129
Власов В. 8
Власова И.И. 125
Власова Н.С. 144
Власова О.Л. 70, 136
Внуков В.В. 137
Водовозова Е.Л. 134
Воеводин В.В. 88
Воейков В.Л. 55
Волков В.В. 101,106
Волков В.В. 106
Волкова Т.Д. 65, 150
Волосникова Е.А. 160, 176
Волох О.И. 95
Волошин С.А. 166
Волынский П.Е. 7, 98, 105
Волынцева А.Д. 87
Вольпина О.М. 65, 150, 151
Воробьева Н.Н. 143
Воронина О.Л. 24, 27
Воротникова Е.А. 124
Воскресенская О.Г. 56
Вульфиус Е.А. 115
Высоцкий Е.С. 18
Вышкворкина Ю.М. 164
Вьюнова Т.В. 158

Г

Габдулхаков А.Г. 104, 109
Габдулхаков А.Г. 109
Габибов А.Г. 12, 23, 108, 129, 132, 138, 152, 175
Гаврилов И.В. 158
Гаврилов С.Н. 95
Гаджиев А.Г. 117
Гайдукевич И.В. 137
Гайнетдинов И.В. 39
Галзитская О.В. 93, 96
Галиуллина Р.А. 123
Гамалей С.Г. 165
Гапизов С.Ш. 33, 88, 91
Гараева Е.А. 75, 113
Гаранина Е.Е. 141
Гарафутдинов Р.Р. 121
Гарбуз Д.Г. 61
Гарбузинский С.А. 96
Гарковенко А.В. 55
Гашникова Н.М. 139
Гвалдин Д.Ю. 137
Гвоздев Р.И. 47
Герасимова М.А. 107
Гедзун В.Р. 67
Гельфанд М.С. 19
Георгиев А.А. 37
Георгиев П.Г. 7, 103, 110
Герасимова Н.С. 94, 95
Германн Э. 181
Герфурт У.М. 16
Гилевич С.Н. 136
Гилеп А.А. 21, 22, 29, 92, 107, 119, 126, 127, 135, 137, 141
Гильмиярова Ф.Н. 75
Гинцбург А.Л. 24
Гинцбург А.Л. 27
Гладилина Ю.А. 81
Гладких И.Н. 32
Глазунова О.А. 141
Глушанкова Л.Н. 43
Глушков А.Н. 179, 183
Глыбин А.В. 55
Глякина А.В. 93
Гнеденко О.В. 78
Говорун В. 8
Говорун В.М. 4, 11, 17, 20, 40
Гогина Я.С. 176
Годовалов А.П. 112
Головин А.В. 132, 139
Головко А.О. 102
Голотин В.А. 180
Голубицкая Е.А. 78
Голубович В.П. 56
Голухова Е.З. 122
Гомзикова М.О. 141
Гончарук С.А. 7, 44, 98
Гопаненко А.В. 42, 67
Горбачева Л.Р. 36, 37
Горбунов Н.П. 118
Горбунова Е.Ю. 88, 89
Гордеева Е.А. 122
Горделий В.И. 73
Горина С.С. 125, 126, 142
Горленко В.А. 129, 131
Горностаев Н.Г. 37
Горобец М.Г. 112
Гороховец Н.В. 139, 155
Горшков В.Ю. 39
Горяйнова О.С. 46
Горячева Е.А. 96, 108
Готтих М.Б. 45, 139
Грабовец И.П. 22, 127, 135, 137
Грайфер Д.М. 67
Графская Е.Н. 19
Грачёва Ю.А. 33, 163, 173
Грефенштейн М.А. 156
Гречихина М.В. 48, 52
Гречишникова Е.Г. 170
Гречкин А.Н. 125, 126, 142
Гривенников И.А. 64, 71, 156
Гривенникова В.Г. 143
Григорьева Т.В. 171
Грин И.Р. 163
Гринева Е.Н. 40
Гринчук Т.М. 148
Гришин Е.В. 14
Гришина Л.В. 165
Гришина Т.В. 16, 51
Громова Е.С. 139
Грошева А.С. 67
Грудинина Н.А. 118
Грядунов Д.А. 166
Губаев Р.Ф. 39
Губанова Н.В. 174
Гудашева Т.А. 35, 150, 151, 158
Гужова И.В. 18, 37, 153
Гулевич А.Ю. 166
Гуреева Т.А. 57, 70, 128
Гурская Н.Г. 5, 168
Гусев А.А. 125
Гусев Н.Б. 38
Гусякова О.А. 75

Д

Давлетгильдеева А.Т. 68
Давыдов Д.М. 74
Давыдова Л.А. 39
Дадашова А.Р. 83
Дадаян А.К. 157
Дадинова Л.А. 102, 109, 111
Даниленко Е.Д 160, 165, 176
Данилов Д.В. 175
Данилов С.М. 122
Дарьин Д.В. 44
Дворцов И.А. 119
Дебабов В.Г. 166
Деев И. 41
Деев И.Е. 24, 100, 112, 182
Деев С.М. 4, 46, 54, 59, 63, 70, 102
Деева О.А. 158
Дейгин В.И. 87, 90
Дементьева Е.И. 166
Демидюк И.В. 119, 127, 140, 159
Демина О.В. 80
Денисова А.Е. 161, 164
Дербикова К.С. 49
Дергоусова Н.И. 58, 95
Дергунов А.Д. 75, 113
Дергунова Л.В. 161, 164
Деркач К.В. 44, 81, 164
Джеффрис С.М. 102
Джонстон С.А. 162
Дзреян В.А. 137
Дзюбинская Е.В. 65
Диброва Д.В. 94
Димитриев В.К. 19
Диченко Я.В. 111
Дмитренок П.С. 32
Дмитриев С.Е. 28, 64, 71
Дмитриева В.Г. 161, 164
Добровольский А.Б. 46
Добролюбова Ю.О. 46, 56
Довидченко Н.В. 93
Догонадзе М.З. 27
Долгих Д.А. 14, 73, 88, 91, 106, 161, 179
Долотов О.В. 71
Домогацкий С.П. 176
Донцова О. 8
Донцова О.А. 72, 75, 91, 95, 102, 115, 134, 154
Дормешкин Д.О. 22, 92
Дорохов Ю.Л. 51
Друца В.Л. 177
Дубина М.В. 149, 180
Дубинный М.А. 90, 114
Дубовцева Е.С. 129, 131
Дубровский Я.А. 85
Дубынин В.А. 67
Дунаевский Я.Е. 124, 140
Дьяченко И.А. 160, 170
Дьяченко О.В. 169, 170, 178

Е

Евгеньев М.Б. 61
Евдокимов С.Р. 180
Евсютина Д.В. 17
Егоров В.В. 47
Егорова Е.А. 155
Екимова В.М. 180
Елизаров И.М. 95
Елисеев Б.Д. 43
Елисеев И.Е. 149, 180
Елисеева И.А. 93
Емельянова А.А. 49, 159
Еремеев Н.Л. 120
Ермаков Е.А. 123
Ермакова Е.А. 178
Ермолаева В.В. 164
Еронина Т.Б. 53, 59

Ерохина С.А. 57
Ерохина Т.Н. 45, 112
Ерохов П.А. 37, 38
Ершов П.В. 21, 78, 119, 126
Ершова Н.М. 51
Есина Т.И. 176
Есипов Р.С. 161, 166, 167, 176, 182
Есюнина Д.М. 73
Ефимов А.В. 100
Ефимов С.В. 72, 102
Ефимова С.С. 60
Ефременко А.В. 161
Ефременко Е.Н. 124
Ефремов М.А. 52
Ефремов Р.Г. 7, 15, 98
Ефремова А.С. 60, 120

Ж

Жарков Д.О. 67
Жарков С.В. 158
Жаркова М.С. 148
Жарова Т.В. 142
Жданов Д.Д. 81
Жданова А.А. 32
Жевленев Е.С. 100
Жемков В.А. 113
Женило С. 41
Жернаков А.И. 33
Животовский Б.Д. 76, 137
Жигалова Н. 41
Жигис Л.С. 122
Жмак М.Н. 56, 115
Жуков В.А. 33
Журавлев В.Ю. 27
Журавлев Е.С. 40

З

Заборская А.Ю. 181
Заборская О.Ю. 181
Завалишина Л.Э. 128
Завриев С.К. 182
Завьялов А.А. 69
Зазыкина А.Д. 49
Зайнуллина Л.Ф. 58
Зайцев И.С. 133
Зайцев С.Ю. 50, 133
Закабунин А.И. 182
Залевский А.О. 139
Замараев А.В. 137
Заморина С.А. 48
Замятнин А.А. (мл.) 139, 155
Замятнин А.А. 17, 24, 27
Зарубина С.А. 89, 126
Зарудная Е.Н. 43, 50, 52, 83
Захарова Е.Т. 47
Захарова И.А. 74
Захарова И.О. 81, 164
Захарова Н.В. 22, 28
Захарченко Н.С. 170, 172, 178, 183
Захрямина А.Е. 162
Зацепин Т.С. 64, 102, 132, 134
Зацепина О.Г. 38, 61
Зверева М. 8
Зверева М.Э. 102
Зверлов В.В. 119
Згода В.Г. 17, 19, 21, 26, 27, 78
Зейфман Ю.С. 134
Зелепукин И.В. 46
Землянухина О.А. 179
Зенин В.А. 89
Зенкова М. 8
Зерний Е.Ю. 66, 139, 155
Зиновкин Р.А. 151
Зинченко А.А. 122
Зинченко Д.В. 66
Злобинов А.В. 88
Золотарев Н.А. 7
Золотарев Ю.А. 156, 157
Золотов Н.Н. 130
Зорина И.И. 81
Зубарева А.А. 173
Зуев Ю.Ф. 114, 178
Зуева Е.П. 165
Зыкова А.М. 156
Зырянова Д.П. 139

И

Иванков Д.Н. 96
Иванов А.В. 177
Иванов А.С. 21, 78, 119, 126, 127, 141
Иванов В.Т. 11, 17, 20
Иванов И.А. 13, 50, 56, 106, 115
Иванова К.А. 161, 164
Иванова Т.И. 46
Иванчик А.В. 25
Иванчина Н.В. 127
Ивлев В.В. 139
Игнатов А.Н. 82
Игонина О.Н. 133
Идиятуллин Б.З. 114
Иллариошкин С.Н. 156
Ильина А.М. 155
Ильина Е.Н. 27, 168
Ильина Т.М. 142
Индейкина М.И. 22, 28, 30, 112
Иноземцева Л.С. 71
Ионов О.В. 30
Ипатова О.М. 155
Исагулянц М.Г. 139
Исаева М.П. 127
Ишкова З.М. 143
Йили А. 25

К

Кабилов М.З. 67
Кабилов М.Р. 42, 67
Каверин Н.Н. 64
Казначеева Е.В. 43, 76
Казьмина Н.А. 92
Какурина Г.В. 69, 128
Калаев В.Н. 64, 179
Калаева Е.А. 64
Калашников А.А. 68
Калашникова И.В. 173
Калашникова М.Б. 159
Каледин В.И. 165
Калиберда Е.Н. 122, 130, 138
Калина Р.С. 32
Калинина Е.В. 50
Калинина Н.О. 61, 117, 172
Калинина Т.И. 170
Калугина А.П. 48
Калужский Л.А. 21, 78, 119, 127, 141
Каменский А.А. 56
Каменский П.А. 49
Камынина А.В. 65, 150
Каневский Л.М. 81
Канцерова Н.П. 132, 135, 143
Капица И.Г. 21
Каплун Д. 41
Кара Д.А. 60
Карасев Д.А. 19, 122
Карасева М.А. 159, 177
Карасева М.А. 177
Каргаполова К.Ю. 39
Каргов И.С. 89
Кареева А.В. 143
Карлинский Д.М. 129, 131
Карлова М.Г. 109
Карпов В.Л. 40, 61
Карпова Г.Г. 42, 67
Карпова О.В. 117
Карпунина Т.И. 112
Карузина Н.Е. 107
Карцев В.Г. 95
Карякин Д.О. 181
Касацкий П. 90, 95
Касацкий П.С. 91
Касьянов А.С. 19
Каталевский Е.Е. 167
Качалова Г.С. 103
Кашеверов И.Е. 13, 50, 56, 115
Кереселидзе Дж.А. 91
Кечко О.И. 68
Ким А. 16
Ким М.В. 113
Ким Н.Ю. 180
Ким Ю.А. 104
Кинг Л. 110
Кириленко Д.А. 73
Кириллова Е.Р. 174
Киров И.В. 11, 17
Кирпичников М.П. 14, 73, 87, 94, 106, 109, 110, 161, 168, 179
Кирсанова О.В. 139
Киселева Е.П. 47
Кислицын Ю.А. 109
Кихней А.Г. 107
Кича А.А. 127
Клабенкова К.В. 155
Кладова О.А. 69, 79
Клейменов С.Ю. 60, 89
Клейменов С.Ю. 89
Климонтова М.В. 49
Клочков В.В. 72
Клюкова М.С. 33
Клячко Е.В. 140
Клячко Н.Л. 135
Кнауэр Н.Ю. 82
Княжанская Е.С. 45
Князев А.Н. 11
Кобыльская Т.В. 82
Кобылянский А.Г. 64, 156
Кобылянский А.Г. 64
Ковалев Г.И. 156, 157
Ковалевский А.А. 22
Коваленко Г.А. 169
Коваленко Е.А. 165
Коваленко Е.И. 48, 57, 81
Коваль В.В. 99
Коваль О.А. 78, 174
Коваль О.В. 153
Ковальчук С.И. 19, 77
Козаева Е.С. 133
Козик В.С. 157
Козин С.А. 35, 94
Козлов В.А. 82, 165
Козлов С.А. 14, 45
Козлова Д.И. 74
Козловская Э.П. 32
Колегова Е.С. 69, 128
Колесанова Е.Ф. 155
Колесников Д.О. 43
Колесниченко А.В. 92
Колосов П.М. 43
Колосова Е.А. 162
Колотьева Н.А. 75
Колчина Н.В. 61
Колясникова К.Н. 151
Комарова Е.С. 95, 154
Комарова Т.В. 51
Комиссаров А.А. 159, 177
Конарев П.В. 101, 106, 107
Кондакова И.В. 69, 128
Кондратьева С.А. 39
Коневега А.Л. 90, 91, 95
Коновалова М.В. 173
Кононихин А.С. 22, 28, 30, 102, 112
Константинова И.Д. 167
Копеина Г.С. 76, 137
Копейкин П.М. 148
Копорова Л.В. 184
Копоть А.С. 32
Копылов А.Т. 21, 26
Копылов К.Е. 88
Корбан С.А. 113, 136
Кореневский А.В. 22, 32
Корженевский Д.А. 111, 129, 138
Корнилов Д.А. 19
Коробкина О.В. 129
Коровина А.Н. 70
Короев Д.О. 65, 150, 151
Королев С.П. 45
Королева В.А. 164
Королькова Ю.В. 45
Корчагина Е.Ю. 105

Кост Н.В. 154, 157
Кост О.А. 122
Костевич В.А. 47, 109, 118, 125, 144
Костин Н.Н. 23
Костров С.В. 119, 127, 159
Костромина М.А. 161, 166, 182
Костромицкий Д.Н. 69
Кострюкова Е.С. 19
Костюкевич Ю.И. 102
Кот Э.Ф. 44
Котельникова О.В. 122
Котелянский В.Э. 132
Котлов Н.Ю. 30
Котова Е.А. 77
Котова Е.Ю. 94
Кочетков С.Н. 147, 177
Кочнева А.А. 33
Кочнева Г.В. 153
Кощаев А.Г. 171, 174, 181
Кравчук О.И. 37, 38
Крамм Э.А. 181
Краморенко Н.В. 26
Красикова Ю.С. 41
Красковская Н.А. 36, 70
Красова Ю.В. 39
Криворотов Д.В. 85
Кромина К.А. 82
Кропанева М.Д. 48
Кротенко Н.М. 123
Круглова Н.А. 21
Кручинин А.Г. 31
Крылов В.В. 135, 143
Крюкова А.Е. 106
Крюкова Е.А. 13, 50, 52, 88, 91, 106
Крюкова М.В. 138
Крюкова О.В. 122
Крячков В.А. 129, 138
Ксенофонтова О.Б. 87
Кубарева Е.А. 42
Кублицкий В.С. 90
Кугаевская Е.В. 57, 70, 128
Куджаев А.М. 129, 131
Кудрявцев Д.С. 13, 50, 56, 115
Кудряева А.А. 10
Кудряшова К.С. 87, 94
Кудряшова К.С. 94
Кузиков А.В. 168
Кузичкина Е.О. 59
Кузнецов А.С. 98
Кузнецов В.А. 85
Кузнецов Н.А. 68, 69, 79, 103
Кузнецова А.А. 69
Кузнецова Н.В. 139, 155
Кузнецова С.С. 92
Кузьменко А.В. 49
Кузьменков А.И. 14
Кузьмин Д. 110
Кузьмин Д.В. 49, 159
Кузьмина Е.Г. 81
Кузьмичев П.К. 105
Куканова Е.О. 36
Кулабухов В.Ю. 181
Кулаева О.А. 33
Кулигина Е.В. 78, 153, 174
Куликова А.А. 38
Кулльманн Д. 110
Кульбацкий Д.С. 106, 109, 110, 114, 161
Кульбачинский А.В. 73
Кульминская А.А. 113, 136
Кунда М.С. 24, 27
Куприянов Д.А. 154
Куранова И.П. 100
Курбатов С.В. 178
Курганов Б.И. 53, 59, 60, 101
Курдюмов А.С. 19
Курилова С.А. 133, 143
Кусова А.М. 114
Куханова М.К. 70
Кырова Е.И. 82
Кырчанова О.В. 7

Л

Лаврик И.Н. 76, 137
Лаврик О.И. 41, 75, 79, 80, 119, 144
Лавров А.И. 37
Лавров К.В. 170
Лагарькова М.А. 40, 156
Ладыгина В.Г. 17
Лазарев А.Ф. 162
Лазарев В.Н. 19
Лазарев В.Ф. 18, 37, 153
Лазарева Е.А. 45, 53
Лактионов П.П. 42
Лакунина В.А. 40, 71
Ламзин В.С. 102
Ларина И.М. 28, 168
Ларионова М.Д. 18
Лашков А.А. 104, 109
Лащук О.О. 107
Лебедев А. 102
Лебедев Д.С. 52, 106
Лебедев Л.Р. 160, 165, 176
Лебедева И.С. 154
Лебедева О.С. 40, 64, 156
Левагина Г.М. 165
Левашов А.В. 120
Левашов П.А. 120
Левин П.П. 80
Левицкий С.А. 49
Лемескина И.С. 140
Леонова Л.Е. 51
Леончик Е.В. 32
Лесовой Д.М. 7, 98
Лильина А.В. 58
Лимборская С.А. 146, 161, 164
Линькова Н.С. 36, 61, 85
Липкин В.М. 55, 66, 88, 156, 157
Литвинов Д.Ю. 75, 113
Литвинова Е. 41
Лихоносова А.Ф. 15
Лобанов А.В. 74
Логашина Ю.А. 45
Локтюшов Е.В. 106
Ломзов А.А. 99
Лузгина Н.Г. 34
Лукаш В.А. 158
Лукашева Е.М. 16
Лукин А.Ю. 80
Лукина М.В. 99
Лукьянов К.А. 5, 168
Лукьянова Т.А. 148
Лунина Н.А. 119, 159
Лутфуллин М.Т. 23
Луценко Г.В. 52
Лушпа В.А. 44
Лущик А.Я. 107
Лысенко Л.А. 132, 135, 143
Лысенко Ю.А. 181
Люкманова Е.Н. 14, 104, 106, 109, 110, 114, 161
Люпина Ю.В. 37, 38
Лягин И.В. 124

М

Мазанко М.С. 178
Мазур А. 41
Мазуров А.В. 46
Майнскова М.А. 136
Макаров А.А. 35, 40, 68, 71, 94, 152
Макаров В.А. 139, 155
Макаров В.В. 61, 117, 172
Макаров Г.И. 130
Макаров Д.А. 166
Макарова А.М. 83
Макарова С.С. 61, 172
Макарова Я.В. 52
Макарцова А.А. 153, 174
Макеева Д.С. 71
Макеева И.Ю. 144
Максименко О.Г. 7, 110
Максимова Е.М. 90, 91
Максимова М.А. 121
Малев В.В. 60
Малыгин А.А. 42, 67
Малышевская К.К. 168
Мальцев Е.В. 52
Мальцевская Н.В. 181
Малюченко Н.В. 94
Малявко А. 8
Малявко А.Н. 102
Маляр Н.Л. 73
Мамаев А.Л. 169
Мамаева А.С. 11, 20
Мамедова Ф.И. 83
Мамонтова Т.В. 16
Мамыкина О.Н. 171
Манникко Р. 110
Манолов А.И. 19
Манувера В.А. 19, 117
Мануилова Е.С. 156
Манцызов А. 8
Манцызов А.Б. 72, 94, 102
Маргулис Б.А. 18, 37, 153
Марданова А.М. 23
Марквичева Е.А. 172
Марков Д.Д. 71
Маркова Н. 97
Маркова С.В. 18
Маркосян К.А. 60
Мартынов А.Г. 124
Мартынов В.И. 24, 108
Марченко И.В. 173
Марченко Н.Ю. 97
Марченков В.В. 97
Марьясина С.С. 72
Масамрех Р.А. 168
Маслова О.В. 124
Матолыгина Д.А. 120
Матора Л.Ю. 39
Матюшкина Д.С. 17, 19, 20
Махлис Т.А. 124
Махотенко А.В. 172
Мацкевич В.А. 125
Машко С.В. 169
Медведев А.Е. 21, 26, 78, 119, 127
Медведев Р.Я. 60
Медведев С.С. 54
Медведева Е.В. 161, 164
Медведева М.В. 72
Медвинская Н.И. 150
Мезенцев Ю.В. 21, 78, 119
Мелентьев В.С. 67
Мелихова Т.Д. 122
Мельник Б.С. 107
Мельникова А.К. 72
Мельникова Д.Н. 49, 171
Мельникова М.В. 92
Мельничук А.В. 46
Мехмуд Т. 54
Мешкова Т.Д. 21
Мещанинов В.Н. 158
Мещанинова М.И. 67
Мизгина Т.О. 29
Микучадзе Г. 91
Милютина Н.П. 137
Милютина Ю.П. 32
Минеев К.С. 7, 15, 44, 98
Мирошников А.И. 166, 167
Мирошников К.А. 135
Митрофанов А.А. 162
Митрофанов С.И. 30
Митькевич В.А. 40, 68, 71, 94, 152
Михайлов В.С. 37, 38
Михайлова А.Г. 129, 131
Михайлова В.В. 53
Михайлова Е.Р. 18
Михайлова Т.В. 43
Михайлопуло И.А. 167
Михалева И.И. 84
Михальчик Е.В. 125
Михантьева Е.А. 141
Михеева О.О. 166, 176
Мишин А.С. 5
Мишкин Д.В. 135
Мищенко В.А. 181
Могила В.А. 7
Модестова Ю. 121
Можаев А.А. 24, 100, 112, 182
Мокрова Д.В. 114
Мокрушина Ю.А. 12, 108, 132
Молотковский Ю.Г. 134

Молчанов М.В. 88, 89
Молчанова В.И. 29, 116
Молчанова В.И. 29
Монастырная М.М. 32
Монахова М.В. 42
Моор Н.А. 80
Мордкович Н.Н. 117
Моренкова А.Ю. 82
Морозов А.В. 61
Морозов С.Г. 74
Морозов С.Ю. 45, 53
Морозова В.В. 183
Мочалов К.Е. 114
Мошарова И.В. 45
Мулюкова Р.В. 58
Муминова К. 30
Муминова К.Т. 28
Муравьева А.В. 48, 57
Муравьева Т.И. 166
Мурашев А.Н. 74, 84, 156, 160, 161, 170
Мустаева Л.Г. 88, 89
Мухтарова Л.Ш. 125, 126, 142
Мушкарина Т.Ю. 81
Мышкин М.Ю. 104, 110, 114
Мясоедов Н.Ф. 120, 146, 147, 154, 156, 157, 158, 161, 164

Н

Наволоцкая Е.В. 44
Нагаев И.Ю. 26, 157
Надеждин К.Д. 7, 44, 98, 105
Надельсон И.Р. 144
Надолинская Н.И. 40
Надольник Л.И. 25
Назаров А.С. 148
Назаров Г.В. 82
Назимов И.В. 25, 103
Нарайкина Ю. 8
Нарыжный С.Н. 136
Науменко К.Н. 79
Наумова А.А. 177
Наход К.В. 34
Невинский Г.А. 47, 56, 62, 123
Недорубова И.А. 120
Некрасов П.В. 65, 150, 151
Некрасова О.В. 14, 87
Некрасова Ю.Н. 24
Немова Н.Н. 132, 135, 143
Немудрая А.А. 153, 174
Немцева Е.В. 107
Неробкова Л.Н. 21
Нестерова И.В. 65, 150
Нестерчук М.В. 132
Никитин М.П. 46, 63
Никитин П.И. 46, 63
Николаев Е.Н. 22, 28, 30, 102, 112
Николаева А.Ю. 94, 103, 110, 116, 134, 138
Нисканен С.А. 37
Новиков А.Д. 170
Новиков М.С. 70
Новикова Е.В. 44
Новикова О.Д. 86, 180
Новикова Т.М. 46
Новичкова М.Д. 50
Новосадова Е.В. 64, 156
Новоселецкий В.Н. 87
Новотоцкая-Власова К.А. 138
Новрузов Э. 117
Нокель Е.А. 122
Носарева О.Л. 62, 84

О

Овчинников Л.П. 150
Овчинникова Е.Д. 120
Овчинникова М.В. 129, 131
Овчинникова Т.В. 49, 68, 77, 148, 149, 159, 171, 172
Огиенко А.Д. 73
Оджомоко Л.О. 115
Окорокова Н.А. 117
Олейников В.А. 99, 105, 114, 133
Ольшанникова С.С. 164
Оноприенко Л.В. 84
Опарин П.Б. 15
Опперт Б. 124
Орецкая Т.С. 42
Орлов Д.С. 148
Орлов Ю.А. 73
Орлова О.В. 38, 177
Орса А.Н. 24
Осипов Е.М. 58, 95
Осипов Н.Н. 167
Оскорбин И.П. 182
Осмаков Д.И. 90
Остапцева А.В. 179
Остерман И.А. 76, 91, 95, 154
Островская Р.У. 146
Остроумова О.С. 60
Охрименко И.С. 73
Ощепкова Ю. 25

П

Павлюков М.С. 40
Пазина Т.Ю. 148
Паликов В.А. 160, 170
Паликова Ю.А. 160, 170
Панасенко О.М. 47, 144
Паникратова Я.Р. 154
Панин Н.К. 121
Панина А.А. 179
Панкратенко А.В. 53
Пантелеев П.В 49, 68, 159,
Пантелеев С.В. 130, 138
Пантюх К.С. 83
Парамонов А.С. 104, 106, 110
Паршин П.Д. 89
Паршукова Д.А. 123
Пастре Д. 144
Пастушкова Л.Х. 28
Пахомов А.А. 24, 108
Пашкина Е.А. 165
Пашкова М.А. 17
Пеньёр С. 14
Перепеченова Н.А. 74
Перк А.А. 85, 86
Перминова Л.В. 169
Пермяков Е.А. 99
Пермяков С.Е. 66, 99
Перфилов М.М. 5
Петренко А.Г. 24, 39, 100, 112, 182
Петрова А.С. 163
Петрова О. 8
Петрова О.А. 72, 102, 115
Петровская Л.Е. 73, 80, 88, 91, 138
Петрушанко И.Ю. 40, 68, 71
Петухов М.В. 107, 109
Петухов М.Г. 61
Петушкова А.И. 139, 155
Петушкова Н.А. 34
Пивоваров В.Д. 182
Пиголева С.В. 172
Пипия С.О. 108
Плетнев В.З. 96, 108
Плетнева Н.В. 96, 108
Плотников А.А. 137
Побегуц О. 8
Побегуц О.В. 17, 19, 20
Поверенная Е.В. 34
Подгорный О.В. 19
Подкорытова К.С. 33
Подлесных С.В. 162
Позднев В.Ф. 130
Позмогова Г.Е. 41
Покровская М.В. 81
Полесскова Е.В. 91
Поликанов Ю.С. 95
Полина Н.Ф. 19
Полтавцева Р.А. 173
Польшаков В. 8
Польшаков В.И. 72, 94, 102
Поляков К.М. 117
Полякова Е.А. 133, 169
Полянский А.А. 7, 98
Пометун А.А. 89
Пономарев А.Г. 85, 86
Пономарева Н.В. 48
Попов А.В. 74
Попов В.О. 5, 58, 94, 95, 103, 116, 134
Попов И.А. 22, 28, 30, 102
Попов П.А. 73
Попов С.В. 173
Попова Н.А. 88, 165
Попова Н.Н. 88
Попугайло А.Г. 51
Портнягина О.Ю. 180
Постика Н.Е. 7
Потехин С.А. 97
Потехина В.И. 75
Празднова Е.В. 178
Прасолов В.С. 40
Приказчикова Т.Е. 64
Принц В.В. 62
Прозоровский В.Н. 155
Прокопенко Ю.А. 122
Прокофьев И.И. 104, 109
Прохорова Д.В. 162
Прохорчук Е. 41
Прошкина Г.М. 54
Прудченко И.А. 84
Птушенко В.В. 20
Пузина Т.И. 144
Пупов Д.В. 73
Пустоварова М.А. 139
Путинцева Ю.В. 180
Пучкова Л.В. 73
Пылаев Т.Е. 176
Пышная И.А. 78
Пышный Д. 8
Пятакова Н.В. 26
Пятков К.И. 68

Р

Равин Н. 8
Равчеева А.Б. 169
Радилов А.С. 85
Радченко В.В. 171, 174, 181
Раев М.Б. 48
Разгуляева О.А. 122
Ракитина Д.В. 19
Ракитина Т.В. 55, 58, 94, 111, 116, 129, 134
Рассказов В.А. 180
Реунов А.В. 127
Речкунова Н.И. 41
Ржевский Д.И. 156
Ривкина Е.М. 138
Ризванов А.А. 141
Рихтер В.А. 40, 78, 153, 174
Роговская Н.Ю. 85
Родина Е. 8
Родина Е.В. 102, 115, 133, 143
Розенкранц А.А. 153
Розенфельд М.А. 112
Роман С.Г. 59
Романов Р.С. 133
Романова И.В. 81, 164
Романова Т.В. 171
Романовская Е.В. 51, 54
Ромодин Л.А. 43, 50
Ротанова Т.В. 129, 131
Рощина М.П. 159, 177
Рубина А.Ю. 166
Рубцов П.М. 177
Рубцов П.М. 40
Рубцова М. 8
Рубцова М.П. 75
Рудакова Н.Л. 54
Руденская Г.Н. 23
Рукавцова Е.Б. 183
Рукин И.В. 83
Румш Л.Д. 122, 130, 138
Румшиская А.Д. 154
Русанов А.Л. 34
Рыжов Ю.Р. 44
Рыжова Н.Н. 24, 27
Рындин А.Ю. 30
Рябухина Е.В. 177
Рязанов М.А. 162

Рязанцев Д.Ю. 52, 182
Рязанцева К.А. 31
Рязанцева М.А. 76

С

Сабиров М.С. 7, 110
Сабирова А.Р. 54
Савватеева Е.Н. 166
Савватеева Л.В. 139, 155
Савельев А.Н. 73
Савельев Н.В. 75
Савельев С.П. 167
Савин С.С. 89, 120, 126
Савина А.А. 133
Савосина П.И. 122
Савушкин Е.В. 75, 113
Сазыкина С.М. 164
Салихов Ш.И. 15, 25
Салль Т.С. 61, 85
Самохин А.Н. 65, 150, 151
Сампедро Кастаньеда М. 110
Самыгина В.Р. 109
Санина Н.М. 39
Санков В.А. 175
Санькова Т.П. 73
Сапего Н.Ю. 133
Саплинов Е.Ю. 58
Сапожников А.М. 48, 65, 77, 116
Саранцева С.В. 66, 151
Сарычева Н.Ю. 67
Сафина Д.Р. 140, 159, 177
Сафиуллина К.Э. 148
Сафонова Т.Н. 117
Сахабутдинова А.Р. 121
Сахаров В.В. 171
Свергун Д.И. 101, 107, 109
Сверчинский Д.В. 37, 153
Свешников П.Г. 168
Свирид А.В. 21, 29, 126
Свиридов О.В. 55
Свирщевская Е.В. 33, 88, 91, 163, 173, 175, 177
Седых С.Е. 62
Сеит-Неби А.С. 38
Селиванова О.М. 93
Селина П.И. 177
Сельков С.А. 22, 32
Семенов А.Н. 24, 27
Семенов В.А. 32
Семикин В.А. 82
Семисотнов Г.В. 97
Семке А.В. 123
Сенин И.И. 66
Сеничкин В.В. 76
Сентябрева Д.А. 158
Сенько Д.А. 13, 50
Сенько О.В. 124
Сервули Е.А. 77
Сергеев А.В. 139
Сергеева В.А. 28, 30
Сергеева О.В. 64, 134
Сергиев П.В. 91, 95, 134, 154
Середенин С.Б. 35, 150, 151, 158
Середина А.В. 20
Серова О.В. 24, 100, 112, 131
Серченя Т.С. 55
Сигида Е.Н. 39
Сиголаева Л.В. 168
Сидорин Е.В. 127
Сидорова М.В. 37
Сидякин А.А. 74
Сизиков А.Э. 82
Сизова С.В. 114
Сильников В.Н. 163
Симакова О.В. 165
Симонова В.В. 156
Симонова М.А. 182
Симонян Р.А. 151
Симонян Т.Р. 124
Сингатулина А.Ш. 144
Синицин П.Г. 28
Синянский Л.Е. 123
Ситницкий А.Э. 114
Скворцова П.В. 178
Скворцова Ю.В. 39
Скляров Л.Ю. 25
Скобелева К.В. 76
Скопин А.Ю. 43
Скороходова А.Ю. 166
Скрипников А.Ю. 55
Славский В.А. 179
Сластникова Т.А. 153
Слободина А.Д. 151
Случанко Н.Н. 38, 58, 59
Смирнов И.В. 12, 23, 108, 132, 170, 175
Смирнов К.В. 98
Смирнов С.А. 120
Смирнова А.Е. 174
Смирнова Е.В. 55
Смирнова Е.О. 125, 142
Смирнова Л.П. 123
Смирнова О.Д. 173
Смолдовская О.В. 166
Смоликова Г.Н. 54
Смольская С.В. 111, 126, 135
Смоляков А.В. 27
Снигирь Е.А. 172
Соболев А.С. 153
Соболев Б.Н. 19, 122
Соболева А.В. 54
Соболева С.Е. 56
Соколенко Н.И. 124
Соколов А. 41
Соколов А.В. 47, 109, 118, 125, 144, 149
Соколов Д.И. 22, 32
Соколов Н.Н. 81
Соколов О.Ю. 154, 157
Соколова О.С. 38, 95, 109
Соллертинская Т.Н. 147
Соловьев А.Г. 45, 53
Соловьев Д.В. 80
Соловьева А.Г. 145
Соловьева Д.О. 105
Соловьева Д.О. 133
Соловьева Н.И. 57, 70, 128
Соловьева Т.Ф. 127
Солопова О.Н. 168
Солстад Р.Г. 45
Сон Л.В. 56
Сормачева Е.Д. 30
Сорокина А.В. 31
Сороколетова О.И. 147, 160
Сорокоумов В.Н. 164
Сотников Д.В. 58
Спасская Д.С. 40
Спелков А.А. 81
Спиридонова В.А. 46
Спирин П.В. 40
Спирова Е.Н. 115
Спирова Е.Н. 13, 50
Ставчанский В.В. 161, 164
Старикова Э.А. 47
Старков В.Г. 106
Стародубова Е.С. 139
Стародубцева Н.Л. 28, 30
Стаханова А.А. 56
Стенкова А.М. 127
Стенсвог К. 45
Степаненко В.Н. 166
Степанов А.В. 152
Степанов А.И. 168
Степанов Г.А. 40
Степанов Н.А. 124
Степанова А.В. 12, 132, 175
Степовая Е.А. 62, 84
Стеханова Т.Н. 116
Стеценко Д. 8
Стеценко Д.А. 155, 162, 163
Стойков И.И. 178
Стойнова Н.В. 133, 169
Столбоушкина Е.А. 71
Стоник В.А. 141, 154
Сторожева З.И. 156
Стрелков С.В. 38
Стрельцова М.А. 57, 81
Струкова С.М. 36, 37
Струшкевич Н.В. 21, 126, 127
Студенников А.Е. 179
Студенников А.Е. 183
Студитский В.М. 94, 95
Суворина М.Ю. 93
Сударкина О.Ю. 161, 164
Судницына М.В. 38
Сулейманова А.Д. 174, 183
Султанов Д.Ч. 94
Сулутьян А.Э. 82
Сумбатян Н.В. 76
Суплатов Д.А. 88, 121
Супрун Е.В. 168
Сурин А.К. 88, 93
Суслова Е.А. 59
Суслова М.А. 76
Суханова М.В. 144
Сухарева М.С. 148
Сухих Г.Т. 28, 30
Сушко Т.А. 21, 126, 137
Сыбачин А.В. 177
Сысоева Г.М. 165

Т

Табакмахер В.М. 13, 14, 50
Таланова А.В. 92
Таллерова А.В. 150
Талызина А.А. 131
Тальянский М.Э. 172
Тарантул В.З. 156
Тарлачков С.В. 169, 170, 178, 183
Татаринова Т.Д. 85, 86
Ташлицкий В.Н. 129, 138
Телегин Г.Б. 156
Теренин И.М. 28, 64
Терехов С.С. 12, 175
Терещенков А.Г. 76
Терещенкова В.Ф. 124, 140
Тертеров И.Н. 149, 180
Тикунова Н.В. 183
Тиллиб С.В. 46
Тимганова В.П. 48
Тимофеев В.И. 100, 111, 129
Тимошенко О.С. 57, 70, 128
Тимченко Е.В. 75
Тимченко П.Е. 75
Титаева Е.В. 46
Титгат Я. 14
Тихомирова В.Е. 122
Тихонов А.А. 166
Тихонова А.О. 54, 145
Тихонова Т.В. 58, 95
Тихонович И.А. 33
Тишков В.И. 89, 120, 126
Тойменцева А.А. 34, 145
Толстыко Е.А. 53
Томсен М. 14
Топоркова Я.Ю. 125, 126, 142
Тор М.Г. 110
Торкова А.А. 31
Тотменин А.В. 139
Травкина М. 25
Третьякова Д.С. 134
Троицкая О.С. 153
Трофимова С.В. 85
Трошагина Д.С. 174, 183
Троянова Н.И. 48, 116
Трусова С.В. 123
Трушкин Н.А. 141
Тугаева К.В. 58
Тумилович А.М. 126, 137
Тупикин А.Е. 42, 67
Турдикулова Ш. 25
Турчина А.И. 93
Туховская Е.А. 161
Тютяева В.В. 40

У

Угарова Н.Н. 121
Уикс С.Д. 38
Уилсон Э. 110
Уласов А.В. 153
Улитин А.Б. 180
Умнякова Е.С. 77, 149
Урбан А.С. 20, 105
Усанов С.А. 21, 25, 92, 111, 119, 126, 127, 137, 141

Устинов В.А. 179, 183
Уткин Ю.Н. 13, 52, 56, 106, 115, 134

Ф
Фарафонова Т.Е. 19
Фатеев И.В. 167
Фатыхова В.С. 142
Федорина А.С. 77
Федоров А.Н. 89
Федоров А.Ю. 33, 163, 173
Федорова Г.А. 33
Федорова Н.В. 102
Федорова О.С. 68, 69, 79, 103
Федорова Т.В. 31, 141
Федорченко К.Ю. 30
Федорчук В.В 126
Федотова А.А. 7
Федотова Е.Ю. 48
Федченко В.И. 26
Фейзханова Г.У. 166
Феофанов А.В. 7, 14, 87, 94, 161
Феофанов С.А. 184
Феофанова О.С. 184
Фесенко И.А. 11, 17, 20
Филатенкова Т.А. 63, 148
Филатов А.В. 21
Филатова М.П. 65, 150
Филимонов Д.А. 122
Филипенко М.Л. 182
Филиппенков И.Б. 161, 164
Филиппова И.Ю. 124, 140
Филиппова М.А. 166
Фильштейн А.П. 116
Финкельштейн А.В. 96
Финкина Е.И. 49, 171, 172
Фирсов А.М. 77
Фисунов Г.Ю. 17
Флоринская А.В. 21, 78, 119
Фокин В.Ф. 48
Фокина А.А. 155, 162
Франкевич В.Е. 28, 30
Фридман Н.В. 85
Фридхофф П. 42
Фролов А.А. 16, 54
Фролова Н.В. 16
Фуджии М. 155
Фуллер В. 40
Фурс О.В. 172

Х
Хабибуллина Н.Ф. 95
Хавинсон В.Х. 35, 36, 61, 158
Хадиева Г.Ф. 23
Хайрутдинов Б.И. 125, 178
Халиуллин И.Г. 100
Хамон Л. 144
Хан Е.О. 46
Ханги П. 40
Ханна М.Г. 110
Харлампиева Д.Д. 19
Харченко Е.Ю. 178
Хасанова Д.В. 58
Хаспеков Л.Г. 156
Хауг Т. 45
Хиляс И.В. 23, 31
Хлебцов Н.Г. 176
Ходжаева З.С. 30
Ходжаева С. 28
Ходонов А.А. 80
Холявка М.Г. 164
Хоменко В.А. 127
Храмцов П.В. 48
Храпов Е.А. 182
Хромов А.В. 172

Ц
Цаллагов С.И. 58
Царев А.В. 106
Цветков В.Б. 41
Центалович М.Ю. 31
Центалович Ю.П. 30
Цетлин В.И. 9, 52, 106, 115
Цимоха А.С. 20
Цой В. 25

Ч
Чачина Н.А. 100
Чеботарева Н.А. 38, 53, 59
Челобанов Б.П. 155, 162, 163
Черкасова Н.Н. 179
Черник И.С. 38
Черников В.П. 134
Черников О.В. 29, 116
Черницкий А.Е. 64
Чернов Г.Ю. 141
Чернов Н.Н. 50
Черновецкий М.А. 127, 141
Чеснокова Е.А. 43
Чжао М. 80
Чижов И.В. 73
Чикаловец И.В. 29, 116
Чинак О.А. 78
Чистов А.А. 92
Чистюлин Д.К. 86
Чистяков А.А. 105
Чистяков В.А. 178
Чичкова Н.В. 123
Чопенко Н.С. 180
Чугунов А.О. 13, 14, 15, 50
Чугунова А.А. 134
Чулина И.А. 88
Чумасова О.А. 82
Чупин В.В. 80
Чурсанова Е.Н. 77
Чухонцева К.Н. 127, 140

Ш
Шагдарова Б.Ц. 175
Шадрина О.А. 45
Шайтан А.К. 95, 96
Шайхутдинова Э.Р. 161
Шалыгин А.В. 43
Шамакина И.Ю. 67
Шамова О.В. 148, 149
Шантроха А.В. 82
Шапиро М.А. 25, 29, 32
Шаповал А.И. 162
Шарапова Н.Е. 24, 27
Шарапова О.А. 89
Шарипова М.Р. 23, 31, 34, 54, 145, 183
Шарова Н.П. 37
Шарова Т.С. 44
Шаронов Г.В. 7, 98, 161
Шатский И.Н. 28, 64, 71
Шафигуллина Л.Т. 31
Шахристова Е.В. 62, 84
Шашова Е.Е. 128
Шаяхметова Д.М. 24
Шварцман А.Л. 66, 151
Швядас В. 100
Швядас В.К. 88, 121
Шевцов М. 126
Шевченко В.П. 26
Шевченко К.В. 26, 158
Шевченко М.А. 77, 116
Шевчук Т.В. 169, 170, 178
Шеломенцева Т.Н. 164
Шелухина И.В. 12, 13, 50, 52, 56, 115
Шемякина А.О. 170
Шендер В.О. 40
Шенкарёв З.О. 104, 106, 109, 110, 114, 161
Шерин П.С. 30
Шерматов Ш.Э. 15
Шернюков А.В. 78
Шешукова Е.В. 51
Шилов Е.С. 62
Шилова О.Н. 59
Шиляев Н.Г. 16
Шингарова Л.Н. 88, 91, 104
Шипунова В.О. 46, 63
Широков Д.А. 19
Широчина И.В. 55
Шитиков Е.А. 27
Шкель Т.В. 126, 127, 141
Шлихт А.Г. 26
Шмальц Г. Г. 163
Шмыгарев В.И. 87
Шнайдер П.В. 40
Шнейдер М.М. 135
Шныров В.Л. 39
Шорникова А.Ю. 22
Шорохов М.В. 147
Шпаков А.О. 44, 81, 164
Шрам С.И. 26, 60, 120, 157
Шрамова Е.И. 54
Штейн-Марголина В.А. 101
Штиль А.А. 163
Штыкова Э.В. 102, 111
Шувалов А.В. 43
Шувалова П.К. 66
Шулепко М.А. 14, 106, 161
Шульга А.А. 102
Шульгин С.В. 82
Шумский А.Н. 80
Шумянцева В.В. 168
Шурпик Д.Н. 178

Щ
Щагина Л.В. 60
Щербаков Д.Н. 162
Щербин Д.Г. 55
Щербицкая А.Д. 22, 32
Щёрдж С. 110

Э
Элпидина Е.Н. 124, 140
Энейская Е.В. 136
Эфендиев А.М. 117

Ю
Юденко А.Н. 180
Юнусова Н.В. 128
Юрина Л.В. 112
Юркова М.С. 89

Я
Яблоков Е.О. 21, 78, 119
Ягольник Е.А. 104
Якимов С.А. 87, 91
Яковлев Д.А. 79
Якушева А.О. 162
Ямпольский И.В. 11
Яненко А.С. 170
Янкелевич И.А. 63
Янцевич А.В. 25, 32
Яркова М.А. 158
Ярославов А.А. 177
Яценко К.А. 71
Яцкин О.Н. 87

© Коллектив авторов, 2017.

9 785906 988331

МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ «XII ЧТЕНИЯ ПАМЯТИ АКАДЕМИКА ЮРИЯ АНАТОЛЬЕВИЧА ОВЧИННИКОВА» И VIII РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ» (МОСКВА, ИБХ РАН, 18–22 СЕНТЯБРЯ 2017)

Содержание

Актовые лекции	3
Пленарные лекции	3
Пленарные доклады	9
Ионные каналы и рецепторы нервной системы: структура, физиология и болезни	13
Биоинженерия растений	15
Поиск и выделение новых природных пептидов и белков. Пептидомика. Протеомика	17
Биологические функции и механизмы действия пептидов и белков	35
Пептидный синтез. Белковая инженерия	87
Физико-химические методы исследования структуры пептидов и белков. Взаимосвязь «структура – функция»	93
Химия и биология ферментов	119
Инновационные лекарственные средства на основе пептидов и белков	146
Биотехнология	166
Авторский указатель	185

Издательство «Перо»
109052, Москва, Нижегородская ул., д. 29-33, стр. 15, ком. 536
Тел.: (495) 973-7228, (495) 665-3436
Подписано в печать 10.08.2017. Формат 60×90/8.
Печать офсетная. Усл. печ. 24 л. Тираж 1000 экз. Заказ 529.