СПЕЦВЫПУСК том 2 | 2019

ActaNaturae

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

II ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ

VI СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ
VI СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ
IX РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

НАУЧНЫЕ ТРУДЫ

Под редакцией
Р.И. Сепиашвили, В.А. Ткачука, А.Г. Габибова,
А.И. Григорьева, В.Т. Иванова, М.А. Островского

Сочи – Дагомыс, Россия
1–6 октября 2019

УДК 57
ББК 28я43
В87

Под редакцией Р.И. Сепиашвили, В.А. Ткачука, А.Г. Габибова, А.И. Григорьева, В.Т. Иванова, М.А. Островского

В87 **II ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ**
♦VI СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ
♦ VI СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ
♦ IX РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»
(Сочи, Дагомыс, 1–6 октября 2019).
НАУЧНЫЕ ТРУДЫ. Том 2. – М.: Издательство «Перо», 2019. – с.299

ISBN 978-5-00150-519-8 (Общ.)
ISBN 978-5-00150-521-1 (Т.2.)

Содержание

Сборник научных трудов включает материалы актовых и пленарных лекций, симпозиальных докладов, выступлений на заседаниях круглых столов и стендовых докладов, представленных на VI Съезде физиологов СНГ, VI Съезде биохимиков России и IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды», которые прошли в рамках II Объединенного научного форума в Сочи–Дагомысе, 1–6 октября 2019 года. Тематика представленных докладов охватывает актуальные разделы физиологии, биоорганической химии, биотехнологии, молекулярной биологии и смежных дисциплин.

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

ISBN 978-5-00150-519-8 (Общ.)
ISBN 978-5-00150-521-1 (Т.2.)

УДК 57
ББК 28я43

9 785001 505211

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

ОНКОТЕРАНОСТИКА НА ОСНОВЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР

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

Точная диагностика злокачественных новообразований и адресное воздействие на них должны обеспечивать высокую селективность противоопухолевой терапии. Этим задачам отвечает новая медицинская стратегия – онкотераностика (**тера**пия+диаг**ностика**), которая объединяет диагностику заболевания и персонифицированное лечение пациента с улучшенной эффективностью и безопасностью. Тераностический агент должен одновременно обеспечивать: 1) **направленную доставку** к молекулярной мишени, 2) **визуализацию** патологического очага и его прижизненный имиджинг в процессе лечения, 3) **эффективное и селективное воздействие** на молекулярную мишень.

Значительная мутационная изменчивость опухолевых клеток, в том числе в ходе лечения, может приводить к изменению молекулярного профиля опухоли и возникновению лекарственной резистентности. Поэтому крайне важной и актуальной задачей является введение в арсенал современной онкологии широкого набора соединений с **разным механизмом воздействия** на раковые клетки. Ориентируясь на эти цели, был создан мультифункциональный агент, способный адресно доставлять в раковые клетки токсические агенты различной природы - радионуклиды и биологический токсин [1]. Был получен гибридный надмолекулярный комплекс, включающий антистоксовые нанофосфоры (НАФ), допированные радиоактивным изотопом иттрием-90, и фрагмент псевдомонадного экзотоксина А, снабженного искусственным адресным полипептидом DARPin, специфичным к опухолевому рецептору HER2. На мышах с привитой аденокарциномой молочной железы человека показаны высокая эффективность комбинированной терапии полученным комплексом и высокая контрастность изображения *in vitro* и *in vivo*. Показано, что **синергический эффект** одновременного применения радионуклида и адресного токсина с результирующим значением IC50 = 0.0024 мкг/мл в **2200 раз сильнее**, чем при их раздельном применении.

Будут также представлены результаты ряда других работ по онкотераностике, проведенных в лаборатории авторов [2-12].

Работа поддержана грантами РФФИ КОМФИ № 17-00-00121(создание соединений) и РНФ 19-14-00112 (испытания in vitro и in vivo).

1. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodeneev V.A., Petrov R.V., Zvyagin A.V., Alferov Z.I., Deyev S.M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115(39). P. 9690-9695.
2. Kabashin A.V., Kravets V.G., Wu F., Imaizumi S., Shipunova V.O., Deyev S.M., Grigorenko A.N. *Advanced Functional Materials*, 2019, 1902692.
3. Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Shipunova V.O., Babenyshev A.V., Balalaeva I.V., Nikitin P.I., Deyev S.M., Nikitin M.P. *Nanoscale.* 2019. 11 (4), 1636-1646.
4. Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Petersen E.V., Deyev S.M., Cherkasov V.R., Nikitin P.I., Nikitin M.P. *Nanotechnology*. 2019. 30 (10) 105101.
5. Shipunova V.O., Kotelnikova P.A., Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Novikov I.A., Schulga A.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. *J. Magnetism and Magnetic Materials*. 2019; 469: 450-455.
6. Sokolova E.A., Vodeneev V.A., Deyev S.M., Balalaeva I.V.. *Drug Discov Today.* 2019. 24 (1), 99-111.
7. Shipunova V.O., Kotelnikova P.A., Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Schulga A.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. *Data Brief.* 2018; 21: 1659–1663.
8. Vorobyeva A., Bragina O., Altai M., Mitran B., Orlova A., Shulga A., Proshkina G., Chernov V., Tolmachev V., Deyev S. *Contrast Media Mol. Imaging*. 2018, 6930425
9. Shipunova V.O., Zelepukin I.V., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Care A., Sunna A., Kisele Zvyagin A.V., Deyev S.M. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10(20). P. 17437-17447.
10. Shilova O.N., Shilov E.S., Lieber A., Deyev S.M. *J. Contr. Rel*. 2018. V. 286. P. 125-136.
11. Sokolova E.A., Vodeneev V.V., Deyev S.M., Balalaeva I.V. *Drug Discovery Today*. 2018. pii: S1359-6446(18)30168-5.
12. Proshkina G.M., Shramova E.I., Shilova O.N., Ryabova A.V., Deyev S.M. *J. Photochem. Photobiol B.* 2018. V. 188. P. 107-115.

HYDROGEN BONDING – THE DOMINANT FACTOR IN ENZYME PHOSPHORYL TRANSFER

G. Michael Blackburn, Yi Jin, Robert Molt
University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK; University of Cardiff, Cardiff CF10 3AT, UK, and Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA

Enzyme chemists have for too long focused attention on the role of water as an oxygen nucleophile – because it features in a vast range of hydrolytic processes in biology. As a result, we have overlooked a fundamental feature of terrestrial activity: The surface of our Earth is dominated by water, whose liquid phase is governed by the commitment of a water molecule to donate two hydrogen bonds to other oxygens and to receive two hydrogen bonds from other waters! We forget that most phosphates are highly water-soluble – because they are strongly solvated by H-bonds, not by oxygen coordination! ATP and GTP constitute one of the great paradoxes in biochemistry: their hydrolysis is a strongly exothermic process, yet they are precociously stable in water. Yusain Bolt stores creatine phosphate in his muscles, yet it energises him to clock 9.58 seconds for the 100 meters.

The resolution of these issues lies in the role of hydrogen bonds for phosphoryl transfer reactions in life.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ НЕ ИССЛЕДОВАННЫХ РАНЕЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

П.В. Сергиев[1,2]
[1]МГУ имени М.В. Ломоносова; [2]Сколтех, Москва, Россия

Исследование функции неизученных ранее генов это одна из самых интересных задач функциональной геномики. Кажется удивительным, что из примерно двадцати тысяч генов человека и других млекопитающих несколько тысяч остаются совершенно не исследованными. В настоящее время, с упрощением технологий геномного редактирования, очевидна необходи-

мость и возможность скорейшего изучения «белых пятен» генома. В докладе будут представлены результаты работы, посвященной трем не изученным ранее белкам митохондрий млекопитающих. В изучении генов с неизвестной ранее функцией необходимо опираться на биоинформатические предсказания, основанные на функциональной роли ортологов и паралогов изучаемых генов. Подобный подход помог в исследовании белков METTL15 и TRMT2B, участвующих в работе белок-синтезирующего аппарата митохондрий, специализированной системы трансляции мРНК, закодированных в геноме этих органелл. Данные белки иллюстрируют изменение системы модификации белок-синтезирующего аппарата при эволюции эукариотических организмов. Значительное число генов в геномах эукариот кодируют небольшие пептиды, являющиеся своеобразной «темной материей» генома из-за сложностей их выявления. Несколько подходов позволяют обнаружить короткие рамки считывания, кодирующие функциональные пептиды, и отличить их от случайных нуклеотидных последовательностей, выглядящих как небольшие рамки считывания. Ген Mtln, функция которого также будет освещена в докладе, кодирует небольшой митохондриальный пептид. Его ген был ранее ошибочно аннотирован, как ген длинной некодирующей РНК. С помощью геномного редактирования клеточных линий млекопитающих и создания мышей с направленно измененным геномом, оказалось возможным исследовать функциональную роль пептида Mtln. В ходе работы выявлены функциональные партнеры этого пептида. Оказалось, что этот пептид важен для поддержания баланса липидов в клетке и необходим для функционирования комплекса I дыхательной цепи митохондрий. Приведенные примеры могут служить иллюстрацией методического арсенала функциональной геномики, сочетания компьютерного анализа, геномного редактирования, методов исследования интерактома и более специализированных подходов в исследовании функции генов млекопитающих.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ – МИШЕНИ БЕТА-ЛАКТАМОВ: ЭВОЛЮЦИЯ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ

А.М. Егоров, М.Ю. Рубцова
МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, Москва, Россия

Мишенью бета-лактамных антибиотиков в бактериальной клетке являются пенициллинсвязывающие белки (ПСБ) и бета-лактамазы (БЛ). ПСБ образуют суперсемейство ферментов, катализирующих различные процессы синтеза пептидогликана – основного компонента клеточной стенки бактерий. Под влиянием природных антибиотиков происходили мутации в ПСБ, что стало основной причиной резистентности грамположительных бактерий. Одновременно ПСБ явились предшественниками суперсемейства БЛ, которые гидролизуют бета-лактамы и этим обуславливают резистентность грамотрицательных бактерий.

Эволюционная связь БЛ и ПСБ состоит в сохранении консервативной структуры ядра белковой глобулы, на которой расположен активный центр. Общность двух семейств ферментов при взаимодействии с молекулой бета-лактама состоит в ацилировании каталитического серина. В процессе эволюции этих ферментов происходили изменения в области активного центра: исчезли некоторые структурные элементы и появились новые. У ПСБ это привело к ингибированию образования ацил-ферментного комплекса и уменьшению сродства к антибиотикам. У БЛ появился новый мобильный структурный элемент - омега-петля на входе в активный центр. Она включает консервативный заряженный остаток E166, который играет ключевую роль в 2-х тактном каталитическом цикле ацилирования/деацилирования серина активного центра. В результате БЛ способны эффективно разрушать молекулу антибиотика. Современные бета-лактамные антибиотики представляют самую большую группу фармацевтических антибактериальных препаратов, включающую 4 класс соединений природного происхождения и химически синтезированных (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы). Глобальный рост потребления антибиотиков явился причиной нового этапа эволюции бактерий; одновременно произошло увеличение суперсемейств бактериальных ферментов, реализующих различные механизмы резистентности; появление пан-резистентных бактерий и экспоненциальный рост распространенности устойчивых патогенных бактерий во всем мире. Таким образом, под влиянием масштабного применения антибиотиков и факторов эволюции резистентность возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам стала глобальной проблемой биологии, медицины и сельского хозяйства.

Работа выполнялась при поддержке РНФ (Проект № 15-14-00014-П).

MOLECULAR MECHANISMS OF SUBSTRATES RECOGNITION BY REGULATORY PROTEASOME SUBPARTICLES

A.A. Belogurov Jr.[1,2]
[1]Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science;
[2]M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Initial discovery of the ATP-dependent ubiquitination system involved in the protein breakdown was consistently complemented with further observation of large (2.5 MDa) multicatalytic proteinase complex called “proteasome”. Ubiquitin-proteasome system (UPS) is directly affecting metabolism of more than half of the intracellular proteins. Totally, UPS consists of approximately 1,000 proteins and many of them are extremely critical for cell functioning and survival. Absolute majority of substrates are recognized by proteasome only being conjugated with ubiquitin (Ub) molecule, representing universal degradation signal operated by ubiquitination system. Initial dogma stated that proteins might be hydrolyzed by proteasome only being conjugated with several, no less than four, molecules of Ub connected to each other. Our emerging knowledge now reads that multiple conjugation with ubiquitin monomers, monoubiquitination or even signals other than Ub may be sufficient for proteasome to engage its substrate. Ub-independent proteasome targeting is currently rationalized by existence of two types of direct proteasome signals (DPS) – specific amino acid sequence or posttranslational modification that are recognized by proteasome regulatory subunits. Historically, the first one was shown to be existed in ornithine decarboxylase (ODC), whereas acetylation of core histones was recently reported as second type of DPS. Despite almost 40 years that passed from the initial discovery of a UPS, current data are evidently insufficient for creation of comprehensible theory covering distinct mechanisms, governing substrates to proteasome. Here we claim *in vivo* determination of several fundamental characteristics of UPS including Ub half-life, average number of Ub per substrate molecule and profiling stability of differentially linked polyubiquitin chains utilizing Ub fluorescence tracking. Taking together our data suggest that Ub is reused by cellular machinery dozens of times and only every fourth

engagement of polyubiquitinated substrate by proteasome leads to the loss of the one Ub moiety. Complementary, we report novel type of Ub-independent degradation signals, representing charge-mediated DPS. These determinants, initially discovered in multiple sclerosis (MS) autoantigen, myelin basic protein (MBP), and further artificially reconstructed in Basic Elementary Autonomous Degrons (BEADs), are most efficiently engaged by REGα or REGγ-capped proteasomes in ATP-independent manner. Involvement of IFNγ-inducible proteasome REGα regulatory subparticles in the process of MBP destruction may have important physiological meaning in terms of MS development. Observed experimental evidences suggest that immunoproteasomes equipped by REGα/β heptamers became deadly machines coordinating autoimmune attack on the myelin sheaths *ab intra*. Taken together, our findings suggest novel modalities of proteasome-substrate interrelations. *Study was supported by Russian Science Foundation project 19-14-00262.*

3D ГЕНОМИКА

С.В. Разин
Институт биологии гена РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Результаты работ, выполненных в течение последних 15 лет, существенно расширили наши представления о роли 3D организации генома в реализации его функциональной активности. Было продемонстрировано, что на уровне пространственной организации геном разделяется на структурно-функциональные блоки, ограничивающие сферу работы энхансеров. Стало ясно, что пространственная реконфигурация протяженного сегмента генома может быть механизмом, обеспечивающим активацию, либо репрессию различных генов. Соответственно, изменения 3D организации генома часто являются причиной возникновения различных, в том числе онкологических заболеваний. Все эти наблюдения способствовали возникновению нового научного направления – 3D геномики. В лекции рассматриваются наиболее важные открытия в области 3D геномики, в том числе сделанные в лаборатории автора, и обсуждаются дальнейшие пути развития этого научного направления. Среди собственных результатов автора особое внимание уделяется демонстрации пластичности 3D организации генома, выявленной посредством проведения Hi-C анализа на индивидуальных клетках. Также обсуждается возможность подавления роста раковых клеток посредством агентов, модифицирующих 3D организацию генома.

КАЛИЕВАЯ ЭНЕРГЕТИКА МИТОХОНДРИЙ

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

Митохондрии являются ключевым звеном в продукции и транспорте энергии. Устоявшаяся парадигма сводится к тому, что вся энергопродукция в митохондриях реализуется исключительно за счет запасания протонного градиента на внутренней митохондриальной мембране с последующим прохождением протона через АТРсинтазный комплекс, то есть комплекс V (кV), сопряженного с синтезом АТР. За постулирование, доказательство и расшифровку механизмов митохондриальной протонной биоэнергетики было получено две Нобелевской премии в 1978 и 1997 г. Однако, надо отметить, что АТРсинтаза использует протоны матрикса митохондрий, где pH в районе 8–8,5, то есть концентрация протона в активном центре кV меньше 10^{-8} М. В то же время концентрация в матриксе ионов K^+ больше 10^{-1} М, то есть превышает концентрацию H^+ более чем в 10 миллионов раз. Такое превышение ставит вопрос о реальности использования транспорта K^+ для синтеза АТР в митохондриальной АТР-синтазе, используя мембранный потенциал, создаваемый переносом протона. Такая возможность была доказана, причем на трех уровнях: 1) на протеолипосомах со встроенным кV, 2) на изолированных митохондриях, инкубированных в K^+ или сахарозной среде и 3) на изолированных кардиомиоцитах. На протеолипосомах с кV удалось не только обнаружить транспорт ионов K^+, но и обеспечить синтез АТР исключительно за счет градиента K^+, причем оба процесса тормозились ингибиторами АТР синтазы. Показано, что в митохондриях при работе кV синтез АТР сопряжен с переносом одного протона на 2,7 иона K^+. Перенос в матрикс осмотически активной частицы (K^+) сопряжен со входом воды (что вызывает небольшое набухание митохондрий) и последующей активацией дыхания, таким образом увеличивая валовый синтез АТР. Тем самым транспорт K^+ через кV не только сам по себе обеспечивает синтез АТР, но и приводит к дополнительному синтезу АТР за счет вызванной набуханием активации дыхания. Такой сопряженный процесс в митохондриях можно вызвать добавлением активаторов АТР-зависимого K^+ канала (напр. диазоксида), что говорит о том, что кV может рассматриваться как митохондриальный АТР-зависимый K^+ канал, поиск материальной основы которого идет долгие годы. *Поддержано грантом РНФ 19-14- 00173.*

МЕТАГЕНОМИКА: ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ БЕЗ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Н.В. Равин
Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Традиционная микробиология, построенная на исследовании чистых культур, дала представление о разнообразии микроорганизмов, осуществляемых ими биохимических процессах, и роли в биосфере. С развитием молекулярных методов исследования микроорганизмов стало очевидно, что их истинное разнообразие на порядки превосходит число культивируемых видов, а более 99% микроорганизмов из природных экосистем не удается культивировать в лабораторных условиях. Так, из примерно 100 известных таксонов высшего уровня (филумов) прокариот около половины не имеют культивируемых представителей. Геномный анализ позволяет предсказать свойства организма даже без его культивирования, а для «некультивируемых» микроорганизмов он является основным инструментом изучения. При этом используется два основных подхода. Метагеномика предполагает секвенирование коллективного генома (метагенома) микробного сообщества. Его анализ методами биоинформатики позволяет охарактеризовать состав и генетический потенциал микробного сообщества и выделить из метагенома геномы отдельных микроорганизмов. Второй подход – выделение из природного объекта единичных клеток микроорганизмов и расшифровка их индивидуальных геномов. Объектами проведенных нами метагеномных исследований были подземные термальные воды Западно-Сибирского региона, залегающие на глубине 2-3 км в породах мелового периода. Среди

обнаруженных в них микроорганизмов менее половины относились к известным видам, а остальные представляли «некультивируемые» группы. Анализ метагеномов позволил получить около 50 геномов микроорганизмов, среди которых были представители «некультивируемых» филумов Aminicenantes, Microgenometes, Armatimonadetes, Riflebacteria и BRC1. Из метагенома и геномов единичных клеток получен полный геном бактерии *Desulforudis audaxviator*, которая ранее была обнаружена на глубине 2.8 км в золотодобывающей шахте в Южной Африке. Эти экосистемы были изолированы на протяжении десятков-сотен миллионов лет. Сравнение геномов двух штаммов выявило их исключительно высокое сходство (менее 800 точечных полиморфизмов в геноме длиной 2.2 млн. нт. и почти идентичные CRISPR локусы), что указывает на низкую скорость эволюции геномов микроорганизмов подземной биосферы. *Работы коллектива были поддержаны грантами РНФ 14-14-01016 и 19-14-00245.*

ГИДРОГЕЛЕВЫЕ БИОЧИПЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ НАСТОЯЩЕГО И БУДУЩЕГО

Д.А. Грядунов, Е.И. Дементьева, О.В. Смолдовская, В.И. Бутвиловская, Г.У. Фейзханова, С.А. Волошин, Е.Н. Савватеева, М.А. Филиппова, А.Ю Рубина, О.В. Антонова, Б.Л. Шаскольский, Д.В. Зименков, А.С. Заседателев
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Стремительное развитие персонализированной медицины диктует необходимость создания методов молекулярной диагностики, обеспечивающих индивидуальный анализ множества генов, белков и клеточных секреций каждого пациента. Эффективной основой для реализации таких методов явилась созданная в ИМБ РАН технология гидрогелевых биочипов. За многолетний период в ИМБ РАН выстроена универсальная методология многопараметрического анализа белковых и ДНК-маркеров при статистических и клинических исследованиях больших серий биологических образцов различной природы. Созданные тест-системы на основе биочипов охватывают широкий спектр приложений – от идентификации молекулярных детерминант лекарственной устойчивости микроорганизмов и вирусов, выявления мишеней в геноме человека, ассоциированных с риском и развитием злокачественных опухолей и эффективностью терапии, до мультиплексного иммуноанализа белковых маркеров в сыворотке крови пациента. Так, с использованием гидрогелевого биочипа впервые установлены профили аллерген-специфических иммуноглобулинов различных классов при бронхиальной астме, аллергическом рините и атопическом дерматите. Разработаны биочипы с иммобилизованными опухоль-ассоциированными гликанами, позволяющие достоверно определять паттерны гликолизирования у пациентов в зависимости от локализации опухоли и степени ее дифференцировки. Перспективным направлением развития белковых биочипов представляется исследование маркеров системных воспалительных реакций для дифференциальной диагностики ревматологических, эндокринных заболеваний и других нарушений в работе иммунной системы. Применительно к анализу нуклеиновых кислот, иммобилизация любых типов биомолекул в гидрогеле и возможность проведения в нем ферментативных реакций открывает перспективы в создании биосенсоров нового поколения. Гидрогелевые элементы станут платформой для иммобилизации геномных редакторов – нуклеаз совместно с направляющими и детектирующими молекулами ДНК/РНК, что позволит создать высокочувствительные биосенсоры, применение которых будет возможно в полевых условиях. Такие комплексные автономные системы на платформе гидрогелевых биочипов позволят получать результаты быстрее, информативнее и точнее, чем в настоящее время, и будут играть ключевую роль в персонализированной медицине будущего.

КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА – ОПОРА ЦАРСТВА РАСТЕНИЙ

Т.А. Горшкова
Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Любая клетка растения, на любой стадии её развития окружена жесткой клеточной стенкой. Большинство различий между клетками растений и животных в отношении роста, формообразования, питания, развития, репродукции, передачи сигнала и защитных механизмов связаны именно с наличием клеточной стенки. Долго существовавшее восприятие клеточной стенки как статичной структуры, своеобразного мертвого деревянного ящика, в котором живет протоплазма, сменилось осознанием её динамичности и многофункциональности. Ключевыми компонентами клеточной стенки служат полисахариды. Высшие растения – безусловные чемпионы по сложности и разнообразию полисахаридных структур. Принципы организации их биосинтеза, соотнесения структуры, свойств и функций, реализации гигантской информационной ёмкости существенно отличаются от других биополимеров. Формирование любой ткани, любая стадия развития клетки растения сопряжены с наличием особых полимеров клеточной стенки. Использование ряда подходов (изучение ткане- и стадияспецифичных полисахаридов, анализ динамики изменения структуры в ходе развития определенного процесса, транскриптомные исследования и т.д.), позволило сформировать представление, что функциональная специфичность полисахаридов клеточной стенки основана на их способности к образованию гомо- и гетерологичных надмолекулярных комплексов. Причем эти комплексы «живые», поскольку могут подвергаться модификациям, которые существенно меняют свойства всей клеточной системы, например, способности клетки увеличиваться в размере, формировать контрактильные свойства или служить источником сигналов. Такие модификации осуществляются в условиях клеточной стенки, т.е. за пределами плазмалеммы, где нет не только процессов транскрипции, трансляции, образования макроэргов и т.д., но нет и механизма синтеза полисахаридов. Характерно, что локализованные в клеточной стенке ферменты, модифицирующие полисахариды, кодируются исключительно большими мультигенными семействами. За счет разнообразия полисахаридных структур и их *in muro* модификации, клеточная стенка тонко подстраивается под конкретные условия существования клетки, выполняет множество функций и служит регулятором ключевых процессов в организме растения. *Работа по тематике выполняется при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00361)*

ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Устные доклады

РЕПАРАЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ КЛЕТОЧНОГО ГЕНОМА, ВОЗНИКАЮЩИХ ПРИ ИНТЕГРАЦИИ ДНК ВИЧ-1

М.Б. Готтих, А.Н. Анисенко, Е.С. Княжанская
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Важной проблемой при лечении ВИЧ-инфекции является возникновение лекарственно устойчивых форм вируса, что делает актуальной разработку новых подходов к ингибированию ВИЧ-1, способных свести к минимуму появление резистентных штаммов. Решение этой проблемы невозможно без детального понимания механизмов всех стадий репликации вируса и выявления новых мишеней для антиретровирусной терапии. Наименее изученным этапом репликации ВИЧ-1 является репарация повреждений, возникающих в геноме клетки при интеграции в нее кДНК вируса. Без постинтеграционной репарации генома репликация вируса невозможна. Считается, что такая репарация осуществляется клеточными белками, однако точно неизвестно, какие именно клеточные белки вовлечены в этот процесс. Мы исследовали участие в постинтеграционной репарации компонентов комплекса ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK): белков Ku70, Ku80 и каталитической субъединицы DNA-PK cs. Для оценки эффективности репарации мы разработали специальный вариант количественной ПЦР. Оказалось, что понижение уровня любого из компонентов DNA-PK в клетках HEK293T существенно снижает эффективность репарации. Важно, что ингибирование фосфорилирующей активности DNA-PK также снижает степень репарации, причем в разных клеточных линиях. Комплекс DNA-PK запускает репарацию двуцепочечных разрывов ДНК по пути негомологичного соединения концов (NHEJ) за счет взаимодействия гетеродимера Ku70/Ku80 с концом ДНК в месте разрыва. Однако при интеграции не возникает двуцепочечных разрывов, поэтому было неясно, как DNA-PK может участвовать в постинтеграционной репарации. Нам удалось показать, что репарация начинается с привлечения комплекса DNA-PK к месту повреждения генома за счет прямого взаимодействия белка Ku70 с интегразой ВИЧ-1, осуществляющей процесс интеграции ДНК. Таким образом, нам впервые удалось доказать участие DNA-PK в процессе постинтеграционной репарации клеточного генома и показать, что для инициации этого процесса необходимо формирование комплекса белка Ku70 с интегразой ВИЧ-1. Следовательно, этот комплекс может рассматриваться как новая мишень для разработки ингибиторов репликации ВИЧ-1.

Работа поддержана грантами РНФ (№ 17-14-01107 – изучение роли DNA-PK в репарации) и РФФИ (№ 18-29-08012).

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ УЗНАВАНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ АПУРИНОВОЙ/АПИРИМИДИНОВОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ ЧЕЛОВЕКА APE1

А.А. Кузнецова[1], А.Г. Матвеева[2,3], А. Д. Милов[2], Ю.Н. Воробьев[1], С. А. Дзюба[2,3], О.С. Федорова[1,3], Н.А. Кузнецов[1,3]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Институт химической кинетики и горения СО РАН; [3]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза человека APE1 является одним из участников системы эксцизионной репарации оснований ДНК. Считается, что основной биологической функцией APE1 является гидролиз фосфодиэфирной связи с 5′-стороны от AP-сайтов, в результате которого образуется 5′-дезоксирибофосфат и 3′-OH группа. Однако было показано, что фермент способен узнавать в качестве субстратов не только AP-сайты, но и некоторые поврежденные нуклеотиды, например 5,6-дигидроуридин, альфа-аномер аденозина, 1,N6-этеноаденозин и другие. Кроме того, фермент APE1 обладает 3′-фосфодиэстеразной, 3′-5′-экзонуклеазной, 3′-фосфатазной и эндорибонуклеазной активностями. Несмотря на интенсивное изучение функциональных особенностей фермента APE1 в настоящее время остается неизвестно, каким образом активный центр фермента способен узнавать значительно отличающиеся по своей природе и структуре поврежденные 2′-дезоксирибонуклеотиды и неповрежденные рибонуклеотиды. В рамках данной работы для определения механизма широкой субстратной специфичности APE1 использовали метод двойного электрон-электронного резонанса, который позволяет рассчитать расстояние между двумя спиновыми метками в составе модельных ДНК-дуплексов. Анализ конформационных превращений фермент-субстратных комплексов в процессе узнавания поврежденного нуклеотида также был проведен в режиме реального времени с помощью метода остановленного потока. Полученные данные свидетельствуют о том, что образование фермент-субстратного комплекса приводит к заметному изгибу дуплекса ДНК и угол изгиба зависит от типа поврежденного нуклеотида. С помощью молекулярно-динамического моделирования было показано, что в фермент-субстратном комплексе поврежденный нуклеотид, вывернутый из спирали ДНК, располагается в полости фермента, образованной остатками Asn174, Asn212, Asn229, Ala230, Phe266 и Trp280. При этом данные аминокислотные остатки не образуют специфических контактов с поврежденными нуклеотидами. Таким образом, можно заключить, что способность поврежденного нуклеотида выворачиваться из двойной спирали и располагаться в данной полости фермента в ответ на образование неспецифических контактов в ДНК-связывающем центре, может быть ключевым фактором, обеспечивающим субстратную специфичность APE1.

Работа поддержана грантом РНФ № 18-14-00135.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

Е. Прохорчук, А. Артемов, А. Старшин, А. Мазур, С. Женило
ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии, Москва, Россия

Мутация в гене VHL является наиболее частым драйверным событием при раке почки. В работе было исследовано, как мутация VHL влияет на эпигенетические модификации генома, в частности, на метилирование ДНК. В клетки линии Caki-1 с диким типом гена VHL, была внесена мутация VHL при помощи CRISPR-Cas9.Были получены три клона с отредактирован-

ным геном VHL. Экспрессия гена VHL была восстановлена в этих клональных линиях при помощи введения экзогенной конструкции с диким типом данного гена (три независимых реплики). Показано, что мутация в VHL ведет к глобальному гиперметилированию генома, что было подтверждено данными RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing), полногеномного бисульфитного секвенирования и данными масс-спектрометрии. При этом метилирование уменьшается при восстановлении экспрессии дикого типа VHL, то есть наблюдаемый эффект удаётся обратить, хотя и не полностью.

Данные бисульфитного NGS секвенирования позволяют не только определить средний для ткани уровень метилирования в индивидуальных позициях CpG, но и понять клональную структуру исследуемого образца. Так как каждый рид содеждит информацию о метилировании цитозинов в одной молекуле ДНК, то появляется возможность фазировать метилотипы (по аналогии с фазированием гаплотипов при генотипировании), что предполагает обнаружение субпопуляций с разным метилотипом.

Применив данный подход к дикому типу клеточной линии Caki-1, трём клонам с отредактированным геном VHL и к трём клонам с восстановленной VHL экспрессией, мы показали, что в отредактированных клонах значимо увеличивается доля CpG сайтов, покрытых конкордантными (то есть полностью метилированными или полностью неметилированными) ридами, что свидетельствует о меньшем клональном разнообразии в отредактированных клонах по сравнению клеточными линиями дикого типа и с восстановленной экспрессией гена VHL.

Были найдены позиции CpG, в которых доля конкордантных ридов значимо увеличивается в VHL-мутанте, что может свидетельствовать о регуляторной роли данных позиций для субпопуляции клеток мутантных клонов. Были найдены гены, ассоциированные с данными позициями и мотивы сайтов связывания транскрипционных факторов, в которых данные позиции обогащены. *Работа была поддержана средствами РНФ по соглашению 19-14-00347.*

DNA-PROTEIN INTERACTIONS – NEW OPPORTUNITIES FOR STRUCTURAL RESEARCH

O.S. Sokolova[1], A.V. Moiseenko[1], N. Loiko[2,3], Ya. Danilova[1], K. Tereshkina[2], N.V. Malyuchenko[1], A.V. Feofanov[1], Yu.F. Krupyansky[2], V.M. Studitsky[1,4]
[1]Moscow MV Lomonosov State University, Moscow, Russia; [2]NNSemenov Instutute of Chemical Physics. RAS, Moscow, Russia; [3]Federal Center "Biotechnology" RAS, Moscow, Russia; [4]Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA

Styrene-maleic acid (SMA) copolymers are used to extract lipid-encased membrane proteins from lipid bilayers in a detergent-free manner, yielding SMA lipid particles (SMALPs). Recently, the use of polymer nanodiscs for protein purification became a hot topic. So far, the characterizations in SMALPs were reported for small membrane proteins, including bacterial KcsA, ARC-B transporter and the human KCNE1 transmembrane subunit, expressed in E. coli. Information on the use of SMALPs for purification of large eukaryotic channels is limited to the human GPCR and eukaryotic ABC transporters, purified from isolated membrane fractions. Here, we report, for the first time, the application of SMALPs to the solubilization of full-length human Kv channels: pore forming α-subunits hKCNQ1 and hKCNH5, as well as the complex of the α-subunit hKCNQ1 with its auxiliary subunit hKCNE1. The importance of the studied channels is justified by the fact that hKCNQ1 belongs to cardiac voltage-dependent potassium channels, while hKCNH5 is found in the central nervous system. We used transient transfection of the COS-1 cells to overexpress the Kv channels and compared the effectiveness of their solubilization by SMA and detergent. We demonstrated that the SMA copolymer was more efficient at solubilization of the human KCNQ1 channels than CHAPS. The advantage of using SMALP is that the solubilized membrane proteins can be easily concentrated on Microcon concentrators without aggregation. A DLS experiment demonstrated that nanodiscs have the overall size of 15 nm, while negative stain electron microscopy revealed a four-fold symmetry within channel-containing SMALPs, which indicates that purified hKCNH5 and hKCNQ1 channels, as well as the hKCNE1-hKCNQ1 fusion construct, retained their structural integrity as tetramers. *The purification of ion channels by a SMA copolymer and their investigations were financially supported by the RFBR (Project #18-504-12045 to K.V.S.); DLS experiments were supported by the German Research Foundation (DFG) (Project #STE640/15 to H.-J.S.). Experiments on the purification of hKCNH5 ion channel were supported by the RSF young investigators grant (Project #18-74-00087 to G.S.G.).*

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ РЕПАРАЦИИ ДНК С ИНТАКТНЫМИ И ГИДРОЛИЗОВАННЫМИ АР-САЙТАМИ

С.Н. Ходырева, Е.С. Ильина, М.М. Кутузов, Е.А. Белоусова, О.И. Лаврик
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Апуриновые/апиримидиновые сайты (АР-сайты) – наиболее распространенные повреждения ДНК. АР-сайты мутагенны и цитотоксичны, в особенности, в составе кластерных повреждений из-за возможности образования двухцепочечных разрывов при репарации АР-сайтов. Ациклическая альдегидная форма дезоксирибозы АР-сайтов способна взаимодействовать с первичными аминогруппами белков, образуя основание Шиффа. Наряду с интактными АР-сайтами, продукты их расщепления посредством β-элиминирования и гидролиза, содержащие 3'-PUA и 5'-dRP фрагменты соответственно, также способны образовывать промежуточные обратимые соединения с белками. Эти интермедиаты могут быть превращены в необратимые сшивки белок-ДНК, что позволяет использовать ДНК с такими повреждениями в качестве зондов для поиска и идентификации узнающих их белков. При поиске в клеточных экстрактах белков, взаимодействующих с кластерными АР-сайтами, расположенными в обеих цепях ДНК, обнаружено, что одной из мишеней является апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1). Показано, что в это взаимодействие вовлечены остатки лизинов в неупорядоченной N-концевой области фермента. Несмотря на формирование аддуктов, опосредованных основанием Шиффа, что является необходимой предпосылкой для расщепления АР-сайтов по механизму β-элиминирования, APE1 не проявляет значимой АР-лиазной активности. Выход сшивок APE1 с АР-ДНК коррелирует с количеством фермента в экстрактах, оцененным иммуно-блоттингом, что позволяет использовать эти ДНК-зонды для сравнительного анализа содержания APE1 в клеточных экстрактах. С использованием набора ДНК-зондов с

5′-дезоксирибозофосфатными остатками в различных позициях ДНК показано, что несколько белков репарации (PARP1, PARP2, ДНК-полимераза β, Ku-антиген и APE1) способны образовывать основания Шиффа с 5′-dRP группами, расположенными не только в разрывах цепи, но в других типах повреждений, в частности, на концах двухцепочечных разрывов. Специфичность взаимодействия белков с этими ДНК определяется расположением 5′-dRP остатка в структуре ДНК. Предполагается возможная роль этих белков в удалении 5′-dRP групп, которые блокируют последующие стадии различных путей репарации ДНК. *Работа поддержана РФФИ, проект 17-00-00097.*

ДНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ И БЕЛКИ-АРГОНАВТЫ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ

А.В. Кузьменко[1], Д.А. Юдин[1,2], Е.В. Кропочева[1], Л.А. Лисицкая[1], А.В. Олина[1], А.Д. Огиенко[1,2], А.Г. Кудинова[1], М.А. Петрова[1], С.С. Рязанский[1], Д.М. Есюнина[1], А.А. Аравин[1,3], А.В. Кульбачинский[1,2]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Division of Biology and Biological Engineering, California Institute of Technology, Pasadena, США

Белки-аргонавты – древнее семейство белков, которые способны узнавать определенные последовательности нуклеиновых кислот за счет комплементарных «гидовых» молекул РНК или ДНК. Белки-аргонавты эукариотических организмов играют ключевую роль в процессах РНК-интерференции, узнавая и расщепляя мРНК-мишени. Прокариотические белки-аргонавты гораздо более разнообразны и об их функциях известно очень мало. Немногочисленные исследования этих белков показали, что, в отличие от аргонавтов эукариот, их мишенью обычно является ДНК. Некоторые из них являются нуклеазами и способны расщеплять ДНК in vitro. В то же время, природные мишени этих белков и механизмы процессинга нуклеиновых кислот с их участием остаются неизвестны. Мы исследовали механизмы узнавания и процессинга ДНК бактериальными белками-аргонавтами разных групп in vivo. Показано, что при экспрессии в клетках Escherichia coli белки-аргонавты оказываются связаны с короткими ДНК, причем наблюдается обогащение плазмидными и геномными последовательностями, имеющими чужеродное происхождение. Показано, что узнавание определенных геномных мишеней белками-аргонавтами зависит от процессов репликации и репарации ДНК, а также особенностей экспрессии генов-мишеней. Обнаружено новое явление ДНК-интерференции – процессинг определенных участков геномной ДНК белками-аргонавтами за счет гидовых ДНК плазмидного происхождения. Таким образом, белки-аргонавты способны подавлять активность чужеродной ДНК в клетках бактерий и регулировать процессы горизонтального переноса генов. Уникальные свойства этих белков позволяют в перспективе использовать их в качестве инструмента для редактирования геномов. *Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской федерации 14.W03.31.0007 и гранта РФФИ № 18-29-07086.*

МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* КАК РЕГУЛЯТОРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ «ПАТОГЕН–ХОЗЯИН»

А.С. Григоров[1], Е.Г. Салина[2], О.С. Быченко[1], Ю.В. Скворцова[1], К.Б. Майоров[3], А.С. Апт[3], А.С. Капрельянц[2], Т.Л. Ажикина[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]ФИЦ Биотехнологии РАН; [3]ЦНИИ туберкулеза, Москва, Россия

Жизненный цикл микобактерии в инфицированном организме проходит через несколько стадий, спектр проявлений инфекции зависит как от особенностей иммунного ответа хозяина на патоген, так и от способности микобактерий противостоять этому ответу. Многовековая ко-эволюция *M. tuberculosis* и его хозяина позволила патогену выработать набор стратегий, позволяющих эффективно бороться с системами защиты организма хозяина. Малые некодирующие РНК регулируют ключевые этапы жизнедеятельности бактерий. В частности, малые РНК внутриклеточных патогенных бактерий могут не только адаптировать бактериальный транскриптом под меняющиеся условия, но также взаимодействовать с транскриптомом инфицированного организма, вмешиваясь тем самым в процессы антибактериальной защиты. Несмотря на то, что малые РНК *M. tuberculosis* были описаны уже почти 10 лет назад, функции и механизмы их действия до сих пор изучены плохо. Мы исследуем высококонсервативные малые РНК MTS1338 и MTS0997. Экспрессия этих малых РНК повышается при переходе в стационарную фазу роста, в состоянии дормантности, также в мышиных моделях инфекции при формировании адаптивного иммунного ответа. Сравнительный полнотранскриптомный анализ штаммов, оверэкспрессирующих эти малые РНК, а также делеционных штаммов, выявил существенные функциональные различия: MTS1338 активирует ряд молекулярных механизмов, необходимых для выживания внутри макрофага, в частности, метаболизм азота у микобактерий, катаболизм аргинина; защищает от окислительного стресса. MTS0997 вносит вклад в адаптацию микобактерий через активацию синтеза альтернативных рибосомных белков, входящих в Zur-регулон. Исследования, проведенные на клеточных линиях макрофагов и мышиных моделях инфекции, продемонстрировали роль этих малых РНК в модулировании иммунного ответа организма хозяина, проявляющуюся в замедлении созревания фаголизосом и изменении спектра экспрессии цитокинов. Полученные данные могут быть использованы для модификации иммунного ответа на инфекцию путем модулирования экспрессии малых РНК MTS1338 и MTS0997. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 18-15-00332.*

КАК БЕЛКИ-АРГОНАВТЫ БАКТЕРИЙ УЗНАЮТ ГЕНЫ-МИШЕНИ?

Д.М. Есюнина[1,2], Л.А. Лисицкая[1], М.А. Нинова[2], А.А. Аравин[1,2], А.В. Кульбачинский[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия; [2]Division of Biology and Biological Engineering California Institute of Technology Pasadena, США

Белки-Аргонавты, играющие ключевую роль в РНК-интерференции у эукариот, закодированы также в геномах многих бактерий. У эукариот данные белки связывают короткие гидовые РНК и влияют на дальнейшую судьбу комплементарных РНК-мишеней за счет их разрезания, ингибирования трансляции и/или привлечения дополнительных регуляторных факторов.

У бактерий в настоящее время таких систем РНК-интерференции не обнаружено. Значительная часть белков-Аргонавтов бактерий лишена активного центра, при этом они зачастую закодированы в одном опероне с нуклеазами; функции и механизмы действия этого класса белков остаются практически неизученными. В данной работе мы исследовали каталитически неактивный белок-Аргонавт бактерии Rhodobacter sphaeroides (RsAgo), который использует РНК-гиды для взаимодействия с ДНК-мишенями. Детальный анализ РНК и ДНК, связанных с RsAgo в клетках бактерий, показал, что этот белок способен узнавать чужеродные гены (транспозоны, профаги) в составе геномной ДНК даже при его экспрессии в гетерологической системе E. coli. Для того, чтобы выяснить молекулярный механизм распознавания свой-чужой белком-Аргонавтом, мы создали репортерные плазмиды, в которых можно независимо регулировать уровень репликации, транскрипции и трансляции генов-мишеней. В качестве таких генов были использованы гены люциферазы, а также выявленные хромосомные мишени RsAgo с различным уровнем оптимизации кодонов. В этой системе был проведен анализ влияния процессов репликации, транскрипции и трансляции на биогенез коротких РНК и ДНК, связанных с RsAgo, и на эффективность узнавания соответствующих генов этим белком при его экспрессии в клетках E. coli в различных условиях. В экспериментах in vitro были детально изучены параметры взаимодействий RsAgo с однонитевыми и двунитевыми ДНК-мишенями. Полученные данные показывают, что RsAgo способен использовать процессированные фрагменты клеточных РНК-транскриптов в качестве гидов для предпочтительного узнавания ДНК генов с неоптимальным уровнем экспрессии, что потенциально может приводить к подавлению транскрипции и сайленсингу чужеродной ДНК. *Работа выполнена при поддержке гранта 14.W03.31.0007 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.*

РОЛЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ КОНСЕНСУСНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В YB-1-ОПОСРЕДОВАННОЙ УПАКОВКЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МРНК И ИХ ПЕРЕНОСЕ В ЭКЗОСОМЫ

А.А. Малыгин[1,2], А.В. Гопаненко[1], О.А. Косинова[1], Д.Д. Яньшина[1], А.Е. Тупикин[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

Многофункциональный белок YB-1 участвует во многих ДНК/РНК-зависимых клеточных процессах, включая репарацию ДНК, транскрипцию, сплайсинг пре-мРНК, упаковку мРНК, а также регуляцию стабильности и трансляции мРНК. Мы показали, что YB-1 является единственным белком цитоплазматического экстракта клеток HEK293, который способен специфически взаимодействовать с короткими несовершенными РНК-шпильками, содержащими мотивы, часто встречающиеся в мРНК, обнаруживаемых в экзосомах. При анализе 3'-нетранслируемых областей (3'-НТО) мРНК найдены вырожденные консенсусные последовательности, формирующие такие шпильки, которые могли бы являться первичными сайтами связывания YB-1 на 3'-НТО клеточных мРНК. Чтобы идентифицировать участки клеточных мРНК, взаимодействующие с YB-1, мы получили культуру клеток HEK293, продуцирующих FLAG-меченый YB-1 (FLAG-YB-1), и применили к ним метод PAR-CLIP, основанный на аффинном сшивании *in vivo* в присутствии фотоактивируемого аналога нуклеозида (например, 4-тиоуридина) с последующей иммунопреципитацией сшивок целевого белка с РНК. Анализ данных высокопроизводительного секвенирования кДНК-библиотек, полученных на основе сшитых с FLAG-YB-1 фрагментов мРНК, показал, что основными партнерами этого белка являются мРНК генов, принимающих участие в клеточном ответе на стресс. Набор партнёров YB-1 включал в основном такие мРНК, уровень трансляции у которых был низким при их относительно высоком общем содержании в клетке, то есть преимущественно упакованные мРНК. Около половины этих мРНК содержали консенсусные последовательности, расположенные в основном в их 3'-НТО, а сайты сшивки FLAG-YB-1 находились вблизи этих последовательностей. Из них только те мРНК, которые имеют наиболее высокое соотношение между клеточным уровнем и эффективностью трансляции, были обнаружены в составе суммарной экзосомальной РНК от клеток HEK293 при анализе соответствующих данных, полученных с помощью RNA-seq. Наши результаты дают новую информацию о взаимодействии YB-1 с цитоплазматическими мРНК, проливающую свет на структурные элементы мРНК, обеспечивающие их упаковку и перенос в экзосомы. *Работа поддержана грантом РФФИ 18-04-00074 и частично Проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210022-4 и Проектом 5-100 Минобрнауки РФ.*

НОВОЕ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТЕЛОМЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

М.П. Рубцова[1,2], Д.П. Василькова[1], М.А. Мошарева[1], О. Баранов[2], С.В. Юртаева[1], Е. Пятова[1], А. Холькина[1], И.О. Бутенко[3], О. Букато[3], В.М. Говорун[3], О.А. Донцова[1,2]
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Сколковский институт науки и технологий; [3]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Теломераза – ключевой компонент системы поддержания длины теломер. Теломераза состоит из теломеразной обратной транскриптазы и теломеразной РНК и обеспечивает удлинение 3'-концевых участков линейных хромосом эукариот. Процессинг теломеразной РНК человека (hTR) конкурирует с деградацией первичного транскрипта при помощи экзосомы, что позволяет контролировать ее содержание в клетке постоянным. Недавно обнаружено, что первичный транскрипт транспортируется в цитоплазму, где выступает в качестве матрицы для синтеза белка, участвующего в ответе клетки на стрессовые воздействия. В настоящей работе исследована взаимосвязь биогенеза и функции теломеразной РНК. Новые аспекты регуляции функционирования компонентов теломеразного комплекса будут представлены. *Настоящая работа выполняется при поддержке РФФИ [18-29-07031 МК]; РНФ [19-14-00065]; Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова [ПНР 5.13].*

ИЗМЕНЕНИЯ В ТРАНСКРИПТОМЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С CRISPR/Cas9-НАПРАВЛЕННЫМ НОКАУТОМ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ C/D-БОКС-РНК

Ю.А. Филиппова[1], А.М. Матвеева[1,2], Е.С. Журавлев[1], Е.А. Балахонова[1], К.С. Ануфриева[3], Р. Шах Махмуд[4], С.Ю. Маланин[4], Т.В. Григорьева[4], Д.В. Семенов[1], В.А. Рихтер[1], В.В. Власов[1], Г.А. Степанов[1,2]

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

Малые ядрышковые C/D-бокс-РНК (мяоРНК) участвуют в пост-транскрипционном созревании рибосомных РНК и направляют сайт-специфичное 2'-O-метилирование нуклеотидов РНК-мишеней. Геномный нокаут C/D-бокс-мяоРНК с внесением точечных изменений в последовательности интрона гена-хозяина может служить эффективным методом в исследовании механизмов действия отдельных представителей малых ядрышковых РНК, не затрагивая функциональности других генов и их белковых продуктов. В качестве объекта исследований было выбраны C/D-бокс-мяоРНК, закодированные в интронах гена длинной некодирующей РНК Gas5. Благодаря наличию последовательностей PAM вблизи функциональных элементов удалось сконструировать протоспейсеры и направить разрывы в последовательности SNORD74, SNORD75, SNORD77 и SNORD80 с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. Дальнейший анализ не только подтвердил мутации в выбранных участках гена GAS5, но и выявил изменения в уровне мяоРНК-мишеней. Транскриптом клеточных линий, полученных на основе фибробластов 293FT, исследовали с применением методов массового параллельного секвенирования – были проведены этапы стандартного RNA-Seq-анализа polyA фракции и коротких форм РНК, включая мяРНК, микроРНК и мяоРНК. Результаты анализа подтвердили селективность действия системы редактирования в отношении выбранных малых ядрышковых РНК. Анализ структуры РНК гена-хозяина выявил частичные изменения в структуре зрелой формы Gas5, что раскрывает дополнительные регуляторные функции генов мяоРНК для связывания факторов, контролирующих транскрипцию и сплайсинг транскрипта-предшественника. Таким образом, была продемонстрирована возможность получения жизнеспособных клеточных линий с нокаутом малых ядрышковых РНК. Полученные клеточные линии могут быть использованы для исследования роли индивидуальных мяоРНК в регуляции экспрессии генов в клетках человека. Стратегия направленного нокаута C/D-бокс-РНК будет востребована для решения фундаментальных вопросом, в частности, поиска новых неканонических РНК-мишеней малых ядрышковых РНК, создания моделей для изучения явления гетерогенности рибосом и картирования функционально значимых сайтов модификации рибосомных РНК.

Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-29-07073.

ПОИСК НУКЛЕОТИДНЫХ МОТИВОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ПРОЦЕСС ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Л.В. Болдырева[1], Е.С. Омелина[1], А.Е. Летягина[1,2], А.В. Иванкин1, Л.А. Яринич[1,2], М.О. Лебедев[1,2], Е.Н. Кожевникова[1], А.В. Пиндюрин[1,2]

[1]Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН;[2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

В пространственно-временной и оперативной регуляции активности генов в клетках млекопитающих важнейшую роль играет правильное процессирование (созревание) вновь синтезированной матричной РНК (мРНК). При этом роль последовательностей ДНК, расположенных в *3′*-области гена и не входящих в состав зрелых молекул мРНК, в регуляции процесса терминации транскрипции мало изучена. В частности, это связано с отсутствием подходов для систематического и масштабного поиска функциональных нуклеотидных мотивов в *3′*-области гена. Мы обнаружили, что делеция нуклеотида, расположенного в позиции +32 после сигнала полиаденилирования модельного репортерного гена, приводит, как минимум, к двукратному усилению его экспрессии в разных типах культивируемых клеток мыши и человека. Мы определили, что данный эффект является следствием более эффективного разрезания первичного транскрипта в 14 нуклеотидах ниже сигнала полиаденилирования.

Для широкомасштабного скрининга *3′*-участков гена, важных для процесса терминации транскрипции, мы использовали модификацию мультиплексного анализа MPFA (Massively Parallel Functional Assay), в котором модельный репортёрный ген, несущий разные мутации, эписомально экспрессируется в культивируемых клетках человека. Этот подход основан на использовании ДНК-штрихкодов и позволяет одновременно измерять уровень транскрипционной активности десятков тысяч идентичных трансгенов, различающихся только последовательностями короткого исследуемого фрагмента ДНК. Мы установили, что различные мутации в 3′-районе репортёрного гена способны как полностью подавлять, так и в сотни раз усиливать его экспрессию. Полученные результаты указывают на огромный регуляторный потенциал 3′-участков гена у млекопитающих, сравнимый с таковым энхансерных элементов генома. Выявленный нами спектр нуклеотидных мотивов, влияющих на уровень экспрессии гена, может быть использован на практике при разработке генно-инженерных конструкций.

Благодарности: Данная работа была выполнена при поддержке гранта РНФ #16-14-10288.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ СПЕЦИФИЧНОГО РЕКРУТИРОВАНИЯ Su(Hw)-ЗАВИСИМЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ХРОМАТИН И ДИСТАНЦИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ НИМИ

А.К. Головнин, Л.С. Мельникова, М.В. Костюченко, В.В. Молодина

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Внутриядерная структура хроматина играет ключевую роль в регуляции транскрипции эукариотических генов. Образование независимых транскрипционных доменов и пространственные контакты между регуляторными участками отдельных локусов или хромосомами зависят от архитектурных белков, одним из которых у Drosophila является Su(Hw). Su(Hw) рекрути-

рует на хроматин регуляторный комплекс, обладающий функциями инсулятора. Цель представленной работы – изучение механизмов, с помощью которых белок Su(Hw) формирует комплексы, обладающие разной регуляторной активностью, специфично связывающиеся с геномными сайтами и обеспечивающие дистанционные взаимодействия между энхансерами и промоторами. Su(Hw)-зависимый комплекс является уникальной моделью для исследования, так как известны основные белки, входящие в его состав и влияющие на его активность –Su(Hw), Mod(mdg4)-67.2 и CP190. Мы подробно описали механизм взаимодействий между этими белками. Впервые выявлены домены Su(Hw) и CP190, обеспечивающие взаимодействие между ними, а также точно картированы последовательности Mod(mdg4)-67.2, обеспечивающие его взаимодействие с Su(Hw) и CP190. Доказано, что один и тот же домен белка Su(Hw) необходим и для инсуляции, и для тканеспецифичной Su(Hw)-зависимой репрессии. Интересно, что в такой репрессии не участвуют Mod(mdg4)-67.2 и CP190. Установлено, что белок Su(Hw)e8 с мутацией в 7-ом цинковом пальце, не способный связываться с ДНК, привлекается в состав Su(Hw)-зависимого комплекса и восстанавливает инсуляторную активность мутантных производных Su(Hw). Значительную роль в рекрутировании Su(Hw)e8 на хроматин играет Mod(mdg4)-67.2. Вероятно, Mod(mdg4)-67.2 участвует в транс-взаимодействиях между Su(Hw)-зависимыми инсуляторами. Через белок CP190 Su(Hw)-зависимый комплекс способен взаимодействовать с различными партнёрами, например, с HIPP1 и CP60. Однако эти белки не участвуют в инсуляции и репрессии. Мы предполагаем, что Su(Hw) меняет свои регуляторные функции в зависимости от того, какие белки способны взаимодействовать с ним в конкретном месте связывания. Полученные данные позволяют предложить новую детализированную модель формирования Su(Hw)-зависимых комплексов на различных по структуре сайтах генома.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ – проект № 18-14-00295.

ТРАНСКРИПТОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ В РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ И ПРОТИСТО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОСИСТЕМАХ

Ю.В. Гоголев[1,2], Н.Е. Гоголева[1,2], Т.Т. Исмаилов[1], Е.В. Осипова[1], А.С. Балкин[3], А.С. Савастьянов[4]
[1]Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань; [2]Казанский (Поволжский) федеральный университет; [3]Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург; [4]НИУ «Высшая школа экономики», Москва, Россия

Изучение РНК бактерий методом высокопроизводительного секвенирования показало, что бактериальные транскриптомы устроены достаточно сложно. Значительную долю в них составляет некодирующая РНК (нкРНК), которая представлена множеством вариантов, различающихся по происхождению, размеру молекул и их копийности в клетке. Было показано, что некоторые нкРНК бактерий действуют в качестве негативных регуляторов многих генов, а так же могут служить факторами иммунитета. Однако, функциональная роль большей части нкРНК бактерий остается не выясненной. Мало сведений так же о роли нкРНК в регуляции вирулентности патогеннх бактерий. Сложность для изучения патосистем заключается в том, что в смешанных транскриптомах бактерий и организмов-хозяев бактериальная РНК, как правило, составляет несколько процентов. Разработка метода Cappable-Seq, основанного на селекции транскриптов, содержащих 5'-концевые трифосфаты, предоставляет дополнительные возможности для исследования сложных транскриптомов. Применение этого метода позволило нам провести секвенирование РНК патогенных бактерий *Pectobacterium atrosepticum* и Salmonella enterica непосредственно в тканях и клетках эукариотических организмов-хозяев – *Nicotiana tabacum* L. и *Acanthamoeba castellanii* Neff соответственно. В результате была охарактеризована дифференциальная активность транскрипции бактериальной РНК в процессе развития инфекции, кроме того, проведено картирование сайтов инициации транскрипции с точностью до одного нуклеотида. Показано, что количество сайтов инициации транскрипции для нкРНК многократно превышает количество картированных генов. Большинство из обнаруженных транскриптов представляют собой короткие РНК, спектр которых меняется в зависимости от физиологического состояния бактерий. Сайты инициации транскрипции нкРНК кластеризуются на прямой и обратной цепи в непосредственной близости от регуляторных элементов известных генов. В условиях эксперимента транскрипционная активность большинства выявленных сайтов проявляла корреляцию с экспрессией топологически близких генов, что свидетельствует о возможной регуляторной роли нкРНК в качестве цис-кодируемых элементов. *Эксперименты по секвенированию РНК проведены при поддержке РНФ (проект №17-14-01363). Биоинформатическая часть работы поддержана РФФИ (грант №17-04-01908).*

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВИЧ-1-ЭФФЕКТОРНЫХ И ВИЧ-1-РЕЗИСТЕНТНЫХ Т КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА SORTS

Д.В. Мазуров[1,2], А.Ю. Масленникова[1], А.А. Зотова[1,3]
[1]Группа клеточных и генных технологий, Институт биологии гена РАН; [2]Лаборатория иммунохимии, ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России; [3]Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Ранее мы разработали и описали новый метод SORTS (Surface Oligoprptide knock-in for Rapid Target Selection), позволяющий быстро выделять нокаутные клетки по экспрессии пептидных тагов Flag и HA (Zotova et al., Sci.Rep. 2019), которые доставляются на поверхность клетки в контексте короткого GPI-белка CD52. Разработанный нами трансген с короткими кодирующей и поли-А последовательностями (в сумме не более 250 нт) доставляется в целевой ген методом CRISPR/Cas9 нокина. Использование двух тагов одновременно позволяет отсортировать клетки с биаллельным нокутом. К преимуществам метода относятся: отсутствие необходимости отбирать нокауты методом клонирования или генерировать донорскую плазмиду под каждый ген, а поликлональность нокаутов способствует отбору клеток с минимальным off-target повреждениями генома. Мы модифицировали SORTS в целях изучения функции жизненно-важных генов и адаптировали его под систему ауксин-индуцированной деградации целевого белка. Также нами была разработана стратегия нокина in-frame, расширяющая возможности таргетирования гена. Недавно мы адаптировали метод SORTS для решения проблем, связанных с изучением и терапией ВИЧ.

Например, в целях конструирования вирус-продуцирующих Т-клеток человека и изучения межклеточной трансмиссии ВИЧ-1, кодирующая часть НА в контексте CD52 была вставлена в геном ВИЧ-1. Это позволило избежать проблем, возникающих при отборе ВИЧ-1-трансгенных клеток методом клонирования (Zotova et al., Viruses, 2017). Другим интересным приложением метода SOTRS является селекция Т-клеток человека, в которых провирусная ДНК ВИЧ-1 была эффективно инактивирована. Для решения проблемы повторного заражения «вылеченных» клеток мы заменили НА-таг на пептид из оболочечного белка gp41, ингибирующего слияние ВИЧ с клеткой и являющегося одновременно маркером селекции резистентных клеток. В ходе тестирования gp41 пептидов мы определили наиболее эффективный вариант MT34 (ингибирование >99%). В заключении, SORTS обладает огромным потенциалом использования под различные задачи, когда из большой количества клеток необходимо выделить малую популяцию клеток с отредактированным геном. *Работа поддержана грантом РНФ 18-04-00333 (разработка метода SORTS), РФФИ (генотерапия ВИЧ-1) и РФФИ (конструирование ВИЧ-1-эффекторных клеток).*

МиРНК-НАПРАВЛЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

М.А. Зенкова
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Одной из важнейших задач практической онкологии является поиск эффективных стратегий для терапии злокачественных заболеваний. Перспективным подходом является контроль и регуляция активности коротких некодирующих РНК, в частности, миРНК. Эти молекулы являются ключевыми регуляторами сигнальных каскадов клетки, ответственных за процессы пролиферации, апоптоза, миграции и инвазии. Экспрессия миРНК нередко нарушена при развитии патологических состояний, что делает их перспективными мишенями противораковой терапии. Многолетние исследования доказали, что антисмысловые олигонуклеотиды обладают мощным потенциалом для подавления экспрессии и некодирующих РНК, в частности миРНК, ассоциированных с различными патологическими состояниями. Применение олигонуклеотидов в биологических системах требует введения в их структуру химических модификаций как для улучшения их физико-химических свойств, так и для усиления их биологической активности. В докладе будут представлены данные по использованию новых производных антисмысловых олигонуклеотидов, а именно олигонуклеотидов, содержащих мезилфосфорамидный остов (μ-олигонуклеотиды), и миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз (иРНКаз), представляющих собой конъюгаты антисмыслового олигонуклеотида, специфически узнающего зрелую миРНК, и каталитического пептида -[(LeuArg)2Gly]2 или -[(LeuArg)]4Gly-NH2, для регуляции экспрессии онкогенных миРНК in vitro и на моделях опухолевой прогрессии *in vivo*. Будут рассмотрены вопросы стабильности новых аналогов олигонуклеотидов в культуральных средах и *in vivo*, а также механизмы, опосредующие их высокую биологическую активность. Данное исследование включает в себя изучении базовых характеристик новых μ-олигонуклеотидов и миРНК-направленных иРНКаз в качестве противоопухолевых терапевтических средств in vivo: изучение кинетики подавления опухоли, оценку основных критериев системной токсичности, изучение биораспределения и первичный анализ фармакокинетических параметров разработанных производных. Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанные производные являются новым мощным инструментом, использующим лучшие достижения антисмысловой технологии. *Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-14-00250 и бюджетом Российской федерации грант № АААА-А17-117020210024-8.*

МАЛЫЕ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ РНК И НЕВИРУСНЫЕ СРЕДСТВА ДОСТАВКИ

И.В. Черников, Д.В. Гладких, У.А. Карелина, А.Г. Веньяминова, М.А. Зенкова, В.В. Власов, Е.Л. Черноловская
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Препараты на основе нуклеиновых кислот представляют собой новый класс фармацевтических препаратов, наиболее подходящий для лечения сложных многофакторных заболеваний и представляющий большие возможности для персонализированной медицины. Наиболее эффективными агентами для направленного подавления экспрессии генов, действующими в наномолярных концентрациях, являются siРНК (малые интерферирующие РНК, действующие по механизму РНК интерференции. Для обеспечения биодоступности siРНК *in vivo* используют два основных подхода: образование комплексов с различными частицами и полимерами и образование биоконъюгатов с липофильными молекулами, антителами, аптамерами и амфифилами. Конъюгация siРНК с молекулами природного происхождения является наиболее перспективным способом доставки siРНК в клетки-мишени. Для решения проблемы доставки siРНК в клетки нами использованы липофильные аналоги нуклеазоустойчивых siРНК. Показано, что присоединение холестерина к siРНК обеспечивает эффективное накопление полученного конъюгата в печени и опухоли, при этом уменьшает его задержку в почках после внутривенной и внутрибрюшинной инъекции. Показано, что однократное введение нуклеазоустойчивого конъюгата холестерин-siРНК вызывает снижение уровня гена-мишени в ксенографте опухоли человека. Для решения задачи разработки ингибиторов РНК-мишеней с улучшенной эффективностью и биодоступностью *in vivo* мы использовали платформы sisiРНК (сегментированной siРНК) и супрамолекулярной tsiРНК (тримерной siРНК). Это позволяет вводить лиганды с разными функциями – транспортной и эндосомолитической в состав разных олигорибонуклеотидов, что облегчает выделение конъюгатов и позволяет проводить эффективный скриннинг лигандов. Использование супрамолекулярной tsiРНК позволяет сочетать ингибиторы нескольких терапевтических генов в одной tsiРНК, которая обладает увеличенным временем циркуляции в кровотоке за счет увеличения молекулярной массы и, вследствие этого, лучше накапливается в опухоли. Таким образом, «неканонические» индукторы РНКi и биоконъюгаты, обеспечивающие доставку в клетки опухоли, являются перспективными компонентами потенциальных лекарственных препаратов. *Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-14-00251 и Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 18-29-08009-мк.*

СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ РЕИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У ЭУКАРИОТ

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

Подавляющее большинство эукариотических мРНК моноцистронны, т.е. кодируют только один функциональный полипептид. Тем не менее, в 5'-нетранслируемых областях многих из них содержатся короткие рамки считывания (uORF), которые могут регулировать экспрессию основной кодирующей части. После трансляции uORF перед терминировавшей рибосомой встаёт выбор: возобновить сканирование с последующим узнаванием нижерасположенного стартового кодона или диссоциировать с мРНК, что приведёт к отсутствию основного продукта. До недавнего времени считалось, что в принятии этого решения задействованы только классические факторы инициации трансляции (прежде всего, eIF3). Нам удалось обнаружить новое семейство эукариотических трансляционных факторов, контролирующих рециклинг рибосомной 40S субчастицы на стоп-кодоне и последующую реинициацию трансляции с её участием. Было показано, что фактор eIF2D, а также гетеродимер онкобелков MCT-1 и DENR (гомологичных N- и C-концевым частям eIF2D, соответственно) способны обеспечивать ГТФ-независимое связывание тРНК в P-сайте 40S субчастицы рибосомы, стабилизируя или, наоборот, дестабилизируя её комплекс с мРНК. Изучение функций дрожжевых ортологов этих факторов (TMA64, TMA20 и TMA22) с помощью методов рибосомного профайлинга нокаутных штаммов и in vitro трансляции в дрожжевой бесклеточной системе позволило предположить, что белки необходимы для предотвращения ненужной реинициации после прочтения рибосомой основной кодирующей части мРНК, а также для подавления несанкционированной реинициации после трансляции uORF. Анализ кристаллической структуры комплекса MCT-1/DENR с человеческой 40S субчастицей позволил понять механистические основы данной активности. Мы показали, что SUI1-домен DENR связывается с пост-терминационным комплексом аналогично тому, как это делает фактор eIF1 в инициаторном комплексе, влияя на аккомодацию деацилированной тРНК. Одновременно другие участки димера стерически препятствуют посадке eIF2, eIF3 и прочих компонентов инициаторного комплекса.

Предложена модель, согласно которой белки MCT-1/DENR и eIF2D контролируют реинициацию трансляции, предотвращая связывание канонических факторов инициации на 3'-конце основной рамки, но в ряде случаев разрешая её после прочтения uORF. *Поддержано грантом Правительства РФ 14.W03.31.0012.*

SYNONYMOUS CODON USAGE – A GUIDE FOR CO-TRANSLATIONAL PROTEIN FOLDING IN THE CELL

A.A. Komar[1,2,3]
[1]Center for Gene Regulation in Health and Disease and Department of Biological, Geological and Environmental Sciences, Cleveland State University; [2]Department of Biochemistry and Center for RNA Science and Therapeutics, Case Western Reserve University; [3]Genomic Medicine Institute, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, USA

For any protein to function properly, the polypeptide chain produced by the ribosome has to fold into a correct three-dimensional structure. Protein folding in vivo begins co-translationally when the nascent peptide emerges from the ribosome exit tunnel. We and others suggested that choice of synonymous codons in mRNA may alter the properties of a protein; however, the mechanisms behind such effects remained unclear. We have recently shown how the use of different synonymous codons results in a change of local and global translational kinetics, altering the pathway of co-translational folding, as well as the ultimate stable conformation attained by a model protein, mammalian eye lens gamma-B crystallin, as assessed by 2D-NMR. We investigate translation and co-translational folding in a time-resolved manner, providing evidence that the structural difference between synonymous variants arise at the level of co-translational folding. Our study provides important insights into the mechanism of protein folding in the cell and contributes to better understanding of the relationship between degeneracy of the genetic code, genotype and phenotype, origin of human diseases caused by synonymous mutations leading to incorrect protein folding and gives a tool to upscale and evaluate the production of functional proteins for medical and biotechnological purposes.

DIVERGENT MECHANISMS OF TRANSLATION INITIATION ON NOVEL INTERGENIC REGION (IGR) IRESS IDENTIFIED VIA METAGENOMIC STUDIES OF INVERTEBRATE VIRUSES

I.S. Abaeva, K. Lu, T.V. Pestova, C.U.T. Hellen
SUNY Downstate Health Sciences University, Dept. of Cell Biology, Brooklyn, NY, USA

The ~200nt long IGR IRESs from dicistroviruses such as Cricket paralysis virus (CrPV) consist of a 3'-terminal domain formed by pseudoknot PKI and a 5'-terminal domain comprising the nested PKII and PKIII. IGR IRESs promote translation by an exceptional mechanism that bypasses the conventional initiation process by binding directly to the ribosome. The conserved stemloops SLIV and SLV in PKIII bind to the head of the 40S ribosomal subunit, PKII engages with the L1 stalk of the 60S subunit and PKI occupies the ribosomal A site, mimicking the anticodon stem-loop of a tRNA base-paired to mRNA. eEF2-mediated pseudo-translocation of PKI to the P site allows [eEF1A-GTP/aminoacyl-tRNA] to bind to the A site codon. Elongation starts once this aminoacyl-tRNA has been released from eEF1A and translocated to the P site by eEF2 in a second pseudo-translocation step. Analysis of metagenomic datasets from members of the phyla Arthropoda, Cnidaria and Mollusca identified three divergent classes of dicistrovirus IGR IRESs. Bioinformatics, chemical/enzymatic probing and mutational analysis showed that each class is distinct and structurally homogenous. These IRESs all contain PKII, PKI and an adjacent non-AUG codon, but PKIII is completely absent in the class epitomized by Halastavi árva virus (~125nt long), and the SLIV and SLV elements in it are absent or highly divergent in the two other classes (~150nt and ~160nt long, respectively). In vitro reconstitution showed that these IRESs bound directly to 80S ribosomes such that the coding region downstream of PKI is placed in the ribosomal mRNA-binding cleft, and three distinct lines of evidence showed that, in direct contrast to the CrPV IRES, these IRESs bind to ribosomes so that PKI occupies the P-site, and the A-site is accessible for decoding without prior eEF2-mediated translocation of the IRES. These novel IRESs therefore bind to the ribosome in a way that mimics the post-translocation state, and by bypassing the initial pseudo-translocation step, initiate translation by an even more streamlined mechanism than that used

by CrPV-like IGR IRESs. Taken together, these studies have identified an exceptional initiation mechanism and provided significant insights into evolution of the structure and function of IRESs.

THE ROLE OF THE Ski COMPLEX IN RIBOSOME-ASSOCIATED QUALITY CONTROL PATHWAYS

A. Zinoviev, R.K. Ayupov, I.S. Abaeva, C.U.T. Hellen, T.V. Pestova
SUNY Downstate Health Sciences University, Brooklyn, NY, USA

In eukaryotes, aberrant mRNAs arise from defects in splicing or polyadenylation, or because of environmentally-induced damage. Eukaryotes have evolved various ribosome-associated mechanisms to identify and eliminate such aberrant mRNAs and to degrade the resulting truncated polypeptides. In brief, stalling of a ribosome on an aberrant mRNA leads to ribosomal collisions, which trigger ribosomal ubiquitination followed by an endonucleolytic cleavage in the mRNA that leaves the stalled ribosome at the 5' end of the 3'-terminal mRNA fragment and the collided ribosome at the 3'-end of the 5'-terminal fragment. After ribosomal disassembly, 60S-associated nascent chains undergo proteasomal degradation, whereas the 3’ and 5’ mRNA cleavage products are degraded in the 5′→3′ and 3′→5′ directions by Xrn1 and the RNA exosome, respectively. However, the mechanism of ribosomal disassembly is not clear, because recycling factors Pelota/Hbs1/ABCE1 can act on ribosomal complexes only if they have very few mRNA nucleotides after the P site. An important question also concerns the mechanism of action in this process of the evolutionarily conserved Ski complex. It consists of the tetratricopeptide repeat protein Ski3, two copies of the WD repeat protein Ski8, and the DExH helicase Ski2 that possesses a 3’-5’ unwinding activity. The Ski complex binds directly to 80S ribosomal complexes near the mRNA entrance. To address the mechanism of action of the Ski complex, we used an in vitro reconstitution approach and now report that the Ski complex extracts mRNA from 80S ribosomes in the 3′→5′ direction in a nucleotide-by-nucleotide manner. The process is ATP-dependent and can occur on pre- and post-translocation ribosomal complexes. The identified activity of the Ski complex suggests a new model for its function, in which Ski’s primary role in mRNA surveillance would not be to assist the exosomal degradation of the 5’-terminal mRNA fragment after endonucleolytic cleavage, but instead, to extract the 3'-terminal mRNA fragment from stalled ribosomes, which would render them susceptible to splitting by Pelota/Hbs1/ABCE1 and the mRNA fragment accessible to the Xrn1 exonuclease.

РЕГУЛЯЦИЯ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ЧЕЛОВЕКА БЕЛКАМИ PAIP1 И PAIP2

А.В. Иванов[1], Е.Ю. Шувалова[1], Т.В. Егорова[1], А.В. Шувалов[1], Е.Е. Соколова[1], И.М. Теренин[2], Е.З. Алкалаева[1]
[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

Поли(А)-связывающий белок (PABP) стимулирует трансляцию терминации через взаимодействие его С-домена с эукариотическим фактором терминации трансляции eRF3. Дополнительно два других белка PAIP1 и PAIP2 связываются с этим же доменом PABP и регулируют его трансляционную активность. Для исследования конкуренции eRF3 и PAIP1/2 за связывание с PABP, мы определяли влияние PAIP1/2 на терминацию трансляции человека в присутствии/отсутствии PABP. Наши результаты показали, что оба белка PAIP1 и PAIP2 предотвращают терминацию трансляции на преждевременных стоп кодонах в результате контроля активности PABP. Более того, PAIP1 и PAIP2 ингибируют активность свободного PABP в трансляции терминации в системе in vitro. Однако, после связывания PABP с поли(А) хвостом мРНК, PABP становится нечувствительным к супрессии этими белками и эффективно активирует терминацию трансляции в присутствии eRF3a. Дополнительно, мы обнаружили, что PAIP1 связывается с eRF3 в растворе, что стабилизирует пост-терминационный комплекс. Эти результаты демонстрируют что PAIP1 и PAIP2 принимают участие в терминации трансляции и являются важными регуляторами сквозного чтения преждевременных стоп кодонов. *Данная работа была выполнена при поддержке гранта РНФ 19-14-00349 и программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (No. 1201363822).*

ТРЕТИЙ ФАКТОР ИНИЦИАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ТРАНСЛЯЦИИ У ДРОЖЖЕЙ: ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ В БИОСИНТЕЗЕ БЕЛКА

С.А. Левицкий, И.В. Чичерин, М.В. Балева, И.А. Крашенинников, П.А. Каменский
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Митохондрии содержат собственный геном, и экспрессия митохондриальных генов происходит в органеллах. Митохондриальная трансляция обладает существенным количеством общих черт с бактериальным биосинтезом белка. В частности, набор белковых факторов трансляции в двух данных системах в большой степени перекрывается. Третий фактор инициации (IF3) был описан в митохондриях млекопитающих и некоторых других организмов, однако в митохондриях дрожжей подобный белок не удавалось обнаружить до 2012-го года, когда было показано, что эту роль выполняет белок Aim23p. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что в отсутствие данного белка трансляция в дрожжевых митохондриях не останавливается, а разбалансируется: некоторых митохондриальных белков становится меньше, в то время как количества других вырастают. Такое избирательное действие белка Aim23p схоже с действием трансляционных активаторов – уникальных белков дрожжевых митохондрий, специфически активирующих трансляцию каждой конкретной мРНК. В работе показано, что Aim23p выполняет активатороподобную роль для мРНК COX1, COX2 и COX3. Физического взаимодействия Aim23p с этими мРНК не продемонстрировано, однако показано физическое и генетическое взаимодействие этого белка с несколькими активаторами вышеупомянутых мРНК. Таким образом, белок Aim23p может рассматриваться как своего рода организатор активаторов индивидуальных мРНК, кодирующих субъединицы цитохром с-оксидазы.

НОВЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ В БАКТЕРИЯХ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

Д.С. Виноградова[1,4], В. Зегарра[3], Е.М. Максимова[1,2], П.С. Касацкий[1], Е.В. Полесскова[1,2], П. Милон[3], А.Л. Коневега[1,2,5]

[1]НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия; [3]Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas – UPC, Lima, Peru; [4]Нанотемпер Технолоджис Рус, Санкт-Петербург; [5]НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

При неблагоприятных условиях в бактериальной клетке происходит значительная перестройка метаболизма. Данный процесс обозначается термином «строгий ответ» (stringent response) и регулируется изменением концентрации алармона (p)ppGpp. Мы использовали выделенную бактериальную систему биосинтеза белка *in vitro* для изучения (p)ppGpp- опосредованной регуляции этапа инициации синтеза полипептида. Применение флуоресцентной спектроскопии позволяет изучать молекулярный механизм взаимодействия (p)ppGpp с инициаторным фактором IF2 в процессе образования 30S инициаторного комплекса. С помощью флуоресцентномеченых лигандов и метода микротермофореза (Microscale thermophoresis, MST) подтверждён кооперативный характер процесса образования инициаторного комплекса, изучена зависимость от лигандов, а также выявлена роль гуаниновых нуклеотидов (p)ppGpp и GTP в регуляции связывания инициаторной тРНК (fMet-tRNAfMet) и мРНК. Анализ престационарной кинетики инициации показывает, что (p)ppGpp эффективно предотвращает быструю ассоциацию 50S субчастицы с 30S субчастицей, т.е. сдвигает равновесие в сторону образования 30S пре-инициаторного комплекса. Эксперименты по конкурентному связыванию показали, что (p)ppGpp является более эффективным (чем GDP) конкурентом для GTP при взаимодействии с IF2. Впервые показано, что конкурентное ингибирующее действие (p)ppGpp на этап инициации зависит от типа матричной РНК. Инициация активно транслируемой мРНК (кодирующей элонгационный фактор EF-Tu) менее чувствительна к повышению концентрации ppGpp, тогда как инициация менее активно транслируемых мРНК более чувствительна к наличию алармона ppGpp1. Таким образом, мы предлагаем новую модель регуляции инициации трансляции, зависящую от концентрации (p)ppGpp, которая подразумевает дифференциальную регуляцию инициации для различных типов мРНК при реализации механизма строгого ответа в бактериальной клетке. *Эксперименты по эффективности инициации на различных мРНК выполнены в рамка проекта РФФИ 17-00-00368 (АЛК), эксперименты по конформационной динамике рибосомных комплексов выполнены в рамках проекта РНФ 17-14-01416 (АЛК). Работа в лаборатории Р.М. поддержана грантом InnóvatePerú 382-PNICP-PIBA-2014 и 297-INNOVATEPERU-EC-2016.*

1. Vinogradova et al, bioRxiv 545970; doi: https://doi.org/10.1101/545970

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДИРИТРОМИЦИНА С РИБОСОМАМИ ДВУХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВИДОВ

Е.В. Полесскова[1,2], Е.Б. Пичкур[1,3], А.Г. Терещенков[4], И.А. Остерман[4,5], Ю.С. Поликанов[6], А.Г. Мясников[1,7], А.Л. Коневега[1,2,3]

[1]НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; [3]НИЦ «Курчатовский институт», Москва; [4]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. Ломоносова, Москва; [5]Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия; [6]Университет Иллинойса, Чикаго, США; [7]Детский исследовательский центр святого Иуды, Мемфис, США

Высокая терапевтическая эффективность и безопасность применения эритромицина привели к тому, что этот представитель класса макролидов и его полусинтетические аналоги являются наиболее широко используемыми лекарственными средствами в истории медицины наряду с аспирином и пенициллином [1]. Однако, распространение бактериальной резистентности приводит к необходимости разработки новых поколений антибиотиков для борьбы с лекарственно-устойчивыми патогенами.

В данной работе проведен структурный и функциональный анализ взаимодействия диритромицина – макролида второго поколения – с бактериальными рибосомами двух модельных организмов *Escherichia coli* и *Thermus thermophilus*. Термодинамические параметры связывания диритромицина и его аналогов с рибосомой, а также высокое разрешение структур комплексов, полученных при помощи рентгеновской кристаллографии [2] и криоэлектронной микроскопии, позволили установить особенности взаимодействия диритромицина с рибосомой. На основании полученных данных предложены направления дальнейшей работы для создания макролидов с улучшенными характеристиками.

Работа поддержана грантом РНФ № 17-14-01416.

1. Ying, L., and Tang, D. (2010). Recent advances in the medicinal chemistry of novel erythromycin-derivatized antibiotics. Curr. Top Med. Chem. 10, 1441-1469.
2. Khabibullina, N.F., Tereshchenkov, A.G., Komarova, E.S., Syroegin, E.A., Shiriaev, D.I., Paleskava, A., Kartsev, V.G., Bogdanov, A.A., Konevega, A.L., Dontsova, O.A., *et al.* (2019). Structure of dirithromycin bound to the bacterial ribosome suggests new ways for rational improvement of macrolides. Antimicrob. Agents Chemother. *63*.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДНК ОПУХОЛИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ПОТЕНЦИАЛ НЕИНВАЗИВНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ

А.И. Огурцова[1], О.Е. Еремина[1], В.М. Фарзан[2], Г. Роберти[3], Дж. Дурранд[3], Г. Воегел[3], М. Фолл[3], Т. Делом[3], Дж. МкКай[3], Дж. Село[3], Т.С. Зацепин[1,2], И.А. Веселова[1], Ф. Ле Калвез-Келм[3], М.Э. Зверева[1,3]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет; [2]Сколковский институт науки и технологии, центр наук о жизни, Москва, Россия; [3]Международное агентство исследования рака, Лион, Франция

ДНК, выделяемая в биологические жидкости опухолью, называемая циркулирующей опухолевой ДНК (ctDNA), часто представляет собой небольшую часть общей бесклеточной ДНК, что затрудняет ее обнаружение. Понимание свойств ctDNA

является ключевым для исследования клинической значимости ctDNA как неинвазивного маркера для выявления и мониторинга рака. Структурные особенности ctDNA, отличные от свободной ДНК, в норме циркулирующей в биологических жидкостях, являются основой для совершенствования биохимических методов определения ctDNA. Ее основная особенность состоит в том, что опухолевые мутации переносятся более короткими бесклеточными фрагментами ДНК, чем фрагменты аллеля дикого типа. Для экспериментального подтверждения этого факта мы провели амплификацию ПЦР и NGS анализ бесклеточной ДНК плазмы пациентов с раком поджелудочной железы, для которых было известно, что они несут мутации KRAS в 12 кодоне [Le Calvez-Kelm F. et al. Oncotarget 2016]. Мы показали, что эффективность определения мутаций KRAS падает с увеличением размеров ампликона и увеличение длины достоверно коррелируют со значительным уменьшением определяемой мутантной аллельной фракции. Таким образом, использование коротких ампликонов повышает чувствительность анализа бесклеточных ДНК и должно учитываться при дизайне эксперимента. В связи с этим возникает необходимость разработки высокочувствительных методов определения ctDNA, учитывающих высокую фрагментацию опухолевой ДНК. Ранее мы показали, что определение мутаций в промотере гена TERT в ctDNA мочи в случае рака мочевого пузыря является высокочувствительным и специфичным маркером [Avogbe P.H. et al., EBioMedicine 2019]. Структурные особенности ДНК с мутацией являются основой для преимущественного определения такой последовательности на фоне ДНК дикого типа. Для обнаружения последовательности TERT промотора был опробован подход на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния, который дает возможность для обнаружения целевых молекул в многокомпонентных смесях без их предварительного выделения на уровне фемто-молярных концентраций за счет резонансного усиления сигнала (без амплификации ДНК).

Разработка безамплификационного подхода была поддержана грантом РФФИ № 18-29-08040.

ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Стендовые доклады и конкурс молодых ученых

SINE-ПРОИЗВОДНЫЕ MIRNA ПУРПУРНОГО МОРСКОГО ЕЖА (*STRONGYLOCENTROTUS PURPURATUS*)

Д.И. Остромышенский[1], М.А. Челомбиткин[2], Е.Е. Лебедев[3], Л.С. Адонин[1]
[1]Институт цитологии РАН, лаборатория морфологии клетки; [2]СПБГТИ, кафедра ТМС, Санкт-Петербург; [3]ДВФУ, Владивосток, Россия

МикроРНК (миРНК) – небольшие некодирующие молекулы РНК длиной до 25 н.п. (обычно 22). Они описаны у животных, растений и некоторых вирусов. Первые миРНК были описаны в начале 1990-х годов; однако, как отдельный класс биологических регуляторных молекул с определенными функциями, они были рассмотрены только в начале 2000-х годов. На сегодняшний день известно более 10000 различных миРНК, и эта цифра постоянно увеличивается с улучшением методов секвенирования. МиРНК довольно высоко консервативны среди эукариот, и считается, что миРНК являются жизненно важным и эволюционно древним компонентом системы регуляции экспрессии генов.

В настоящее время установлены многочисленные регуляторные функции миРНК (транскрипционная деградация или изоляция, подавление трансляции), помимо этого, вероятно миРНК участвует в механизмах позитивной регуляции (активация транскрипции и трансляции). Известно, что нарушение транскрипции некоторых миРНК, которые происходят в раннем развитии (а иногда и в клетках взрослого организма) приводят к серьезным последствиям: известно более 100 случаев различных заболеваний, включая наследственные синдромы (гемофилия, хориодермия сетчатки) и рак, причиной чего является нарушение транскрипционной активности miRNA.

Понимание процессов эпигенетической регуляции и роль молекул миРНК в нормальном развитии поможет нам разобраться в процессах возникновения заболеваний связанных с нарушением функций миРНК. Модель, которую мы используем в этой работе – развитие морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus*. Модель доказала свою ценность, на ее основе было проведено большое количество фундаментальных работ биологии развития. В ходе нашей работы мы составили heat-map карту из 284 транспозонов (TE) *S.purpuratus*, аннотированных в RepBase (GIRI). Уровень транскрипции различных TE довольно неоднороден и не подвергается кластеризации, в отличие от классических работ Дэвидсона по транскрипции генов (около 16 000) этого морского ежа в ходе эмбрионального развития. Но при описании профиля транскрипции TE на этапах эмбрионального развития мы описали некоторые закономерности: (1) Интенсивность транскрипции разных участков TE варьируется от стадии к стадии; (2) Пики профилей транскрипции совпадают с предсказанными функциональными миРНК большинства TE пурпурного морского ежа.

Результаты, полученные в ходе этого исследования, будут использованы в дальнейших экспериментальных работах для подтверждения гипотезы о том, что TE являются основным источником miRNA в процессе развития. *Работа поддержана грантом РНФ № 19-74-20102.*

РОЛЬ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА АР-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ЧЕЛОВЕКА APE1 В РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК

И.В. Алексеева[1], О.С. Федорова[1,2], Н.А. Кузнецов[1,2]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Одной из актуальных задач в изучении репарации ДНК остается выяснение механизма ферментативного процесса с участием АР-эндонуклеазы APE1, который обеспечивает высокоточное узнавание апуриновых/апиримидиновых (АР) сайтов в

ДНК и эффективный гидролиз 5'-фосфодиэфирной связи, играя тем самым важную роль в обеспечении стабильного функционирования ДНК и жизнедеятельности клетки. Анализ кристаллических структур свободного фермента и его комплексов с ДНК показал, что для осуществления катализа в комплексе APE1×ДНК образуются контакты, которые приводят к выворачиванию AP-сайта из двойной спирали в активный центр фермента. В настоящей работе для выяснения роли некоторых аминокислотных остатков активного центра APE1 при специфическом узнавании поврежденного участка ДНК и осуществлении каталитической стадии методом «остановленного потока» исследовали кинетику конформационных перестроек молекул фермента и ДНК-субстрата в ходе ферментативной реакции. Для этого были использованы мутантные формы APE1, содержащие замены Asp210Asn, Asn212Ala, Thr268Asp, Met270Ala и Asp308Ala. Конформационные изменения фермента регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции остатков триптофана. Для регистрации конформационных изменений ДНК использовали модельные ДНК-субстраты, содержащие остаток 2-аминопурина или FRET-пару красителей FAM-BHQ1. Сравнение кинетических параметров, полученных для мутантных форм и фермента дикого типа, позволили установить стадии ферментативного процесса, на которые оказывают влияние данные аминокислотные остатки и, таким образом, определить роль этих остатков в процессах образования каталитически-компетентного комплекса и катализа. Так, например, показано, что замена Asp210Asn полностью инактивирует фермент и повышает эффективность связывания фермента с субстратом. В тоже время, замена Asp308Ala снижает эффективность связывания фермента с субстратом и продуктом, не влияя на константу скорости каталитической стадии. *Работа поддержана грантом РНФ № 18-14-00135.*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ОПЕРОНОВ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ У МИКОБАКТЕРИЙ *IN VIVO*

Л.В. Асеев, Л.С. Колединская, И.В. Бони
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Изучение биогенеза рибосом у патогенных бактерий – важное направление в молекулярной микробиологии, связанное с необходимостью поиска новых антимикробных агентов. Одним из ключевых механизмов, обеспечивающих координацию синтеза рибосомных компонентов, является аутогенный контроль синтеза рибосомных белков (р-белков), когда избыток р-белка (по отношению к рРНК) связывается с регуляторной областью на своей мРНК и репрессирует дальнейший синтез. До сих пор аутогенный контроль изучался только на модельных организмах *E. coli* и, в меньшей степени, *B. subtilis*. Нашей целью является разработка подходов для исследования регуляции генов р-белков у микобактерий, грам-положительных организмов с высоким GC- составом, к которым относится возбудитель туберкулёза человека *Mycobacterium tuberculosis*. На первом этапе мы исследовали возможность использования *E. coli* как суррогатного организма для изучения регуляции гена rpsO *M. smegmatis* (Msm), кодирующего р-белок S15. Репортерные конструкции с lacZ-геном под управлением 5'-нетранслируемой области rpsO-мРНК Msm (rpsO-lacZ) были созданы на плазмидах, затем встроены в lac-область хромосомы *E. coli*. В полученных штаммах было изучено влияние синтеза р-белка S15 Msm in trans на экспрессию репортера. В результате были впервые получены экспериментальные доказательства работы механизма аутогенной репрессии трансляции rpsO-гена у микобактерий. Однако, в связи с низкой эффективностью экспрессии в *E. coli* генов из бактерий с высоким GC-составом, включая микобактерии, для развития исследований необходимо создание не суррогатной, а аутентичной системы анализа уровня экспрессии. Оптимальным вариантом является использование для этой цели непатогенной микобактерии *M. smegmatis*, для которой имеется шаттл-вектор pMV306 (Kan), способный встраиваться в хромосому. Для экспрессии р-белков in trans мы создали новый шаттл-вектор на основе pACYC184 (Cm, Tet), в который перенесли микобактериальный oriM-сайт, а для встраивания в хромосому Msm репортерных конструкций с gfp-геном модифицировали pMV306. Новая система анализа регуляции генной экспрессии открывает широкие перспективы для исследования механизмов, контролирующих биогенез рибосом у патогенных микобактерий, включая *M. tuberculosis*. *Работа поддержана грантом РФФИ №18-04-00743а.*

НОВАЯ ДЛИННАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ РНК – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР РАКА ПЕЧЕНИ

О.Ю. Буренина[1], Н.Л. Лазаревич[2,3], Т.С. Зацепин[4], М.П. Рубцова[1,4], О.А. Донцова[1,4]
[1]Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий; [2]НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ; [3]Биологический факультет, [4]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Длинные некодирущие РНК (днРНК) – обширный класс транскриптов длиной более 200 нуклеотидных остатков, активно синтезирующихся в клетках, но не подвергающихся трансляции. Большинство днРНК участвует в различных регуляторных процессах, и многие из них играют важную роль при канцерогенезе. Ассоциированные с тем или иным видом рака днРНК могут быть использованы как специфические биомаркеры, а также как мишени для направленной терапии. В нашей работе мы впервые охарактеризовали ранее неизученную печень-специфичную днРНК человека. Эта РНК активно синтезируется в образцах здоровой (донорской) печени, а также в дифференцированных клетках HepaRG, имитирующих культуру первичных нераковых гепатоцитов. При этом в раковых линиях печени HepG2 и Huh7 экспрессия днРНК отсутствует. Мы проанализировали уровни экспрессии днРНК в парных образцах печени (рак/норма) пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, холангиокарциномой, а также доброкачественными опухолями: фокальной нодулярной гиперплазией и гепатоцеллюлярной аденомой. В случае злокачественных опухолей наблюдалось существенное снижение синтеза днРНК, что может свидетельствовать о наличии диагностического и/или прогностического потенциала этой молекулы. Для изучения функциональной роли днРНК был проведен ряд экспериментов *in vitro*. С помощью системы интеграции в геном «Sleeping Beauty» были получены трансгенные линии HepG2 и Huh7 с суперэкспрессией днРНК. Для нокдауна днРНК в клетках HepaRG использовали набор модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов (ASO). Аналогичные ASO, содержащие на 3'-конце остаток флуоресцентного красителя Cy5, использовали для установления локализации РНК в клетке методом FISH (fluorescence *in situ*

hybridization). Также были синтезированы 5'-биотинилированные ASO для поиска потенциальных белковых партнеров днРНК методом соосаждения (RNA pull-down). *Работа проводилась при поддержке РНФ (грант № 18-74-00120).*

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВОВЛЕЧЕНИЯ мРНК В СТРЕСС-ГРАНУЛЫ ПРИ ОСТАНОВКЕ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Д.А. Быков[1,2,3], А.В. Бураков[3], Н.Е. Макарова[3,4], К.А. Акулич[3,4], Д.С. Макеева[3,4], В.И. Попенко[1], П.В. Спирин[1], В. С. Прасолов[1], С.Е. Дмитриев[1,2,3,4]

[1]Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН; [2]Кафедра биохимии, Биологический факультет, МГУ им. М.В.Ломоносова; [3]НИИ Физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова; [4]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Стресс-гранулы – структуры, образующиеся в цитоплазме эукариотических клеток в условиях жёсткого стресса, когда трансляция мРНК подавлена из-за инактивации отдельных компонентов трансляционного аппарата. Стресс-гранулы представляют из себя крупные рибонуклеопротеидные агломераты, включающие малые субчастицы рибосомы, ряд трансляционных факторов, а также нетранслируемые клеточные мРНК. Механизм попадания мРНК в стресс-гранулы неизвестен, однако считается, что освобождение транскриптов из полисом, которое происходит при подавлении инициации трансляции, провоцирует их агрегацию, опосредуемую мРНК-связывающими белками. Тем не менее, остаются открытыми вопросы, любая ли нетранслируемая мРНК может оказаться в стресс-гранулах и попадают ли туда те немногочисленные мРНК, которые продолжают активно транслироваться даже в условиях жёсткого стресса.

В данной работе мы использовали уникальную особенность участка внутреннего связывания рибосомы (IRES) из РНК вируса паралича сверчка (CrPV), способного обеспечивать инициацию трансляции по альтернативному бесфакторному механизму. Мы использовали классический индуктор образования стресс-гранул – арсенит натрия, вызывающий инактивацию фактора инициации eIF2 и практически полное подавление трансляции обычных матриц. В этих условиях репортерная мРНК, содержащая CrPV IRES, продолжала активно транслироваться. Мы применили систему визуализации данной репортерной мРНК на основе аптамеров к белку MS2CP-GFP и обнаружили, что эта мРНК показывает такую же частичную локализацию в стресс-гранулах, как и контрольная мРНК, чья трансляция полностью подавлена.

Во второй части работы мы применили трансляционные ингибиторы, которые блокируют рибосому на одном из первых элонгационных циклов, но не останавливают те рибосомы, которые уже прошли несколько первых кодонов и читают дистальные области кодирующей части, – харрингтонин, лактимидомицин и Т2-токсин. Они приводят к освобождению мРНК от рибосом, однако в начале кодирующей части остаётся одна арестованная 80S. Мы показали, что в присутствии этих веществ стресс-гранулы не образуются.

Таким образом, стресс-гранулы не могут быть сформированы мРНК, несущими одну 80S рибосому в начале кодирующей части, даже если они при этом не транслируются и свободны от рибосом на остальном своём протяжении.

ДЕТЕКЦИЯ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК МИКОБАКТЕРИЙ В ИНФИЦИРОВАННЫХ МАКРОФАГАХ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ АПТАМЕРОВ

О.С. Быченко, Ю.В. Скворцова, А.С. Григоров, Т.Л. Ажикина

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

РНК бактерий модулируют широкий спектр физиологических ответов и регулируют ключевые этапы жизнедеятельности у целого ряда возбудителей заболеваний. В последнее время обсуждается идея о том, что малые РНК внутриклеточных патогенных бактерий могут не только адаптировать бактериальный транскриптом под меняющиеся условия, но также взаимодействовать с транскриптомом инфицированного организма, вмешиваясь тем самым в процессы антибактериальной защиты. Выявление и исследование молекулярных цепей адаптации *M. tuberculosis* к иммунной защите хозяина при персистировании в макрофагах представляет собой важную научно-прикладную проблему. Мы исследуем малую РНК M tuberculosis MTS1338, которая специфична только для микобактерий туберкулезного комплекса, и уровень ее экспрессии в системе in vivo чрезвычайно высок. Нами впервые показано, что при персистировании микобактерий в макрофагах клеточной линии RAW261, транскрипты MTS1338 детектируются методом ОТ-ПЦР в цитоплазме макрофагов. Таким образом, малая РНК *M tuberculosis* MTS1338 может секретироваться во внешнюю среду бактерий и влиять на защитные клетки иммунной системы при развитии инфекции. Для изучения этого процесса востребована система детекции малых РНК бактерий с помощью конфокальной микроскопии. Нами были созданы генно-инженерные конструкции для оверэкспрессии РНК модулей, содержащих MTS1338 и различные флуоресцентные аптамеры (Broccoli, 2xdBroccoli, F30-Broccoli и F30-2xdBroccoli). Проанализирована флуоресценция полученных модульных РНК при взаимодействии с флуорофором DFHBI *in vitro*, показана четкая зависимость яркости флуоресценции от размера аптамера в системе *in vitro*. Созданы штаммы *M. smegmatis*, экспрессирующие модульные РНК, показан выход этих РНК в цитоплазму макрофага из бактерии *ex vivo*, а также детектирована флуоресценция изучаемых РНК при взаимодействии с DFHBI флуорофором в заражённых макрофагах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 18-15-00332.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ ВРОЖДЕННОГО БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА (ВБЭ): ПОЛУЧЕНИЕ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, НЕСУЩИХ МУТАЦИИ В ГЕНЕ, КОДИРУЮЩИМ COL7A1, ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Н. Гурская[1,2], А. Бейлин[1,2], Н. Евтушенко[3], К. Азимов[3], Н. Мурашкин[4], К. Севостьянов[4], Э. Амбарчян[4], А. Фесенко[4], Е. Воротеляк[1,2,3], А. Васильев[2,3]

[1]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ; [2]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН; [3]МГУ им. М.В. Ломоносова; [4]НМИЦ здоровья детей МЗ РФ, Москва, Россия

ВБЭ – это группа тяжелых генодерматозов с повышенной чувствительностью кожи к механической травме. Известно около 20 генов, кодирующих структурные элементы кожи и слизистых оболочек, мутации в которых вызывают ВБЭ. Доступно только симптоматическое лечение таких больных, которое сложное, затратное и не устраняет причины заболевания. Использование современных методов генной терапии в сочетании с клеточными технологиями позволяет создать функциональную ex vivo терапию, при которой из небольшого количества клеток больного путем культивирования получают 3D эквиваленты кожи, которые подвергают генетической коррекции, а затем трансплантируют больному. Сочетание клеточных биоинженерных технологий с молекулярно-генетическими подходами по редактированию геномов с применением системы CRISPR/Cas9 позволит на основе биоматериала больных создать культуры клеток, изогенные клеткам кожи больного, но не содержащие патологической мутации. Для 3 пациентов были получены культуры клеток кожи. Точечные мутации в гене Col7A1 были установлены путем массового параллельного секвенирования (подтверждены секвенированием по Сэнгеру). Идентифицированные мутации были описаны ранее для ВБЭ дистрофического типа с аутосомно рецессивным механизмом наследования, они зарегистрированы в базах данных HGMD и deb register. Полученная информация о нуклеотидной последовательности в области мутации дала возможность синтезировать направляющие РНК и разработать стратегию проведения геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9, эффективность работы которой будет оцениваться в различных модельных клеточных системах. На основе культур клеток фибробластов были получены культуры изогенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток путем репрограммирования с помощью вирусов Сендай, разрабатываются методы получения изогенных иммортализованных и обратимо иммортализованных клеток. Получение клеточных линий из первичных культур клеток больных дистрофическим типом врожденного буллезного эпидермолиза, изучение и сравнение их свойств в модельных системах с клетками здоровых доноров необходимо для понимания патологических процессов заболевания, является важным этапом для разработки стратегии функциональной терапии *ex vivo*. *Работа поддержана РФФИ, грант № 19-29-04044.*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФАКТОРОВ ТРАНСЛЯЦИИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ БАКУЛОВИРУСНОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ

Т.В. Егорова[1], А.В. Шувалов[1], Е.Ю. Шувалова[1], Е.Е. Соколова[1], Б.Д. Елисеев2, С.Д. Иванова[1], C. Schaffitzel[2,3], Е.З. Алкалаева[1]

[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; [2]European Molecular Biology Laboratory, Grenoble Outstation, Grenoble, France; [3]School of Biochemistry, University of Bristol, Bristol, UK

Трансляция эукариот – сложный процесс, требующий участия многих белковых факторов. Для исследования механизмов и регуляции трансляции часто используют *in vitro* системы, которые требуют получения изолированных рекомбинантных факторов трансляции. Общепринятым методом получения рекомбинантных белков является их наработка в бактериях. Однако не все трансляционные факторы можно получить в бактериальных клетках, так как некоторые из них имеют большую молекулярную массу и/или состоят из нескольких субъединиц. Для решения этой задачи можно использовать, например, бакуловирусную систему экспрессии белков в клетках насекомых. Так для получения ряда факторов трансляции человека: факторов инициации eIF4F, eIF2, eIF4G, eIF4B, факторов терминации eRF1_iso2, eRF1_iso3, eRF3a, фактора рециклинга ABCE1, а также вовлеченных в трансляцию белков Gle1A и Gle1B, нами были сконструированы соответствующие генно-инженерные конструкции и проведена их экспрессия в культуре клеток насекомых Sf21. В результате нам удалось получить большинство из этих белков в растворимом виде и достаточных для хроматографической очистки количествах. Активность полученных рекомбинантных белков, протестированная в реконструированной *in vitro* системе трансляции млекопитающих, оказалась сравнима с активностью белков, выделенных из лизатов клеток HeLa и RRL. Таким образом, нам удалось получить функциональные рекомбинантные факторы трансляции человека, что позволило в дальнейшем подробнее изучить механизмы разных стадий трансляции эукариот. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №19-14-00349.*

6S РНК *B. JAPONICUM* И *S. MELILOTI:* СХОДСТВА И РАЗЛИЧИЯ

Д.А. Елкина[1], О.Ю. Буренина[2], Е.А. Кубарева[1]

[1]НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова; [2]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Одной из наиболее известных некодирующих РНК в бактериях является 6S РНК. Благодаря своей уникальной вторичной структуре она связывается с РНКП и блокирует её активность, что приводит к глобальному ингибированию транскрипции в клетке. Имитируя промотор ДНК, 6S РНК может служить матрицей для синтеза коротких РНК-транскриптов (пРНК), что при определенных обстоятельствах приводит к высвобождению РНКП из прочного комплекса с 6S РНК. Основные исследования в этой области проведены для *E. coli* и *B. subtilis*. Выявлены значительные отличия в свойствах и особенностях функционирования 6S РНК различных бактерий.

В данной работе впервые были охарактеризованы 6S РНК из двух родственных альфа-протеобактерий: *B. japonicum* и *S. meliloti*. Последовательности этих РНК обладают высокой степенью гомологии, особенно их центральные части. Соответствующие предсказанные вторичные структуры имеют типичную для 6S РНК форму с большим расплетенным участком в центре, причем формирование в нем небольшой шпильки, расположенной ближе к 3'-концу молекулы, приводит к более стабильной конформации. Несмотря на близкое родство *B. japonicum* и *S. meliloti* и гомологичность их 6S РНК, нами выявлены существенные различия в свойствах двух нкРНК. В первую очередь с помощью Нозерн-блоттинга были получены профили экспрессии обеих нкРНК. Максимальные концентрации 6S РНК в этих бактериях приходятся на разные фазы клеточного роста: в стационарной фазе количество 6S РНК в *B. japonicum* увеличивается, а в *S. meliloti* – уменьшается. Этот результат также подтвержден методом ОТ-кПЦР. В экспериментах *in vitro* было показано, что обе 6S РНК образуют комплекс с холоферментом РНКП *E. coli*. При добавлении радиоактивно меченных нуклеозидтрифосфатов наблюдали синтез пРНК на матрицах обеих 6S РНК. В случае 6S РНК *S. meliloti* детектировались сигналы, соответствующие 16–23-звенным пРНК. Для 6S РНК *B. japonicum* методом гель-электрофореза не удалось разделить продукты транскрипции, длина которых составляет примерно 20–24 нуклеотидных остатка (н.о.). В обоих случаях также наблюдали синтез длинных полноразмерных продуктов (42-49 н.о.). Было показано, что образующиеся пРНК остаются связанными с комплементарными 6S РНК, что является их характерной функциональной особенностью. *Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00791.*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РОДА *JORDANITA* VERITY, 1946 (*LEPIDOPTERA, ZYGAENIDAE*)

К.А. Ефетов, З.С. Лазарева, Е.В. Паршкова
Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

Всё больший вес в молекулярно-генетических исследованиях приобретает изучение участка гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы (COI) длиной 658 нуклеотидов. Этот участок ДНК используется как «штрихкод», способный маркировать большинство видов животных. Данный участок гена кодирует часть молекулы COI, которая необходима для работы дыхательной цепи. Таким образом, вариации в аминокислотной последовательности этого белка могут влиять на энергетический обмен.

Кафедра биохимии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» с 2009 года участвует в международном проекте «ZYGMO», осуществляемом под руководством профессора К.А. Ефетова. В рамках этого проекта проводится секвенирование последовательностей гена COI у различных представителей семейства Zygaenidae.

К настоящему времени расшифрованы последовательности гена COI для 132 экземпляров 25 видов, принадлежащих к роду *Jordanita* Verity, 1946 (подсемейство Procridinae). Анализ этих участков ДНК в программе MEGA 6.0 выявил 222 вариабельных сайта. При изучении кариотипов представителей Procridinae (Zygaenidae) во многих родах обнаружены виды с гаплоидным числом хромосом (n), сильно отличающимся от модального для Lepidoptera. Однако у большинства изученных нами видов рода *Jordanita* n=31 (что соответствует модальному числу). В то же время внутривидовая вариабельность последовательностей митохондриальной COI у некоторых хорошо различимых морфологически видов этого рода значительно превышает обычные уровни межвидовой дивергенции (2–3 %), достигая у отдельных представителей подрода *Jordanita* 6–7 %.

При изучении аминокислотных последовательностей, соответствующих ДНК штрихкодам, у представителей рода *Jordanita* была выявлена 31 точка вариабельности, при этом две из них (позиции 8 и 27) локализованы на близком расстоянии к активному центру фермента.

Данные о строении и изменчивости COI, вариабельности кодирующих её генов в комплексе с цитогенетическими исследованиями имеют важное значение не только для понимания механизмов функционирования белков, но и для выяснения путей видообразования, эволюции и филогенетических взаимоотношений биологических видов.

РОЛЬ БЕЛКА CG9890 *D. MELANOGASTER* В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

А.Н. Краснов, Н.А. Фурсова
Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

В ходе предыдущих исследований мы обнаружили новый компонент ENY2 содержащих комплексов дрозофилы, белок CG9890. Было показано, что сайты посадки изучаемого белка в геноме преимущественно ассоциированы с промоторными областями генов. С помощью биоинформатических подходов нам удалось продемонстрировать наличие геномной колокализации белка CG9890 с субъединицами ENY2-содержащих комплексов SAGA и ORC, а также комплекса ремоделирования хроматина dSWI/SNF. Биохимическими методами также показано взаимодействие с комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID и THO. Взаимодействие с белком Xmas-2 (комплекс AMEX) показать не удалось. Таким образом, CG9890 взаимодействует с транскрипционными комплексами, вовлеченными в инициацию и элонгацию транскрипции, но не взаимодействует с комплексом AMEX, участвующем в экспорте мРНК из ядра в цитоплазму, что указывает на работу CG9890 в первых стадиях транскрипционного цикла. В данной работе мы изучили влияние белка CG9890 на экспрессию генов. Для этого уровень данного белка был понижен с помощью РНК-интерференции и проведено измерение уровня мРНК для рада генов как в контроле, так и в эксперименте. Для анализа было отобрано более 20 генов на промоторах которых присутствует белок CG9890. Результаты показали, что для 10 генов из 22 наблюдается значимое изменение (p-value <0,05) уровня мРНК в результате РНК-интерференции. Интересно, что из этих 10 генов, 6 генов оказались экдизон-зависимыми генами. Поэтому было изучено влияние белка CG9890 на экдизоновую активацию. Для этого была проведена активация клеток экдизоном и снята кинетика активации этих 6 генов как в норме, так и при нокдауне CG9890. Было показано, что CG9890 оказывает влияние на активацию всех этих генов: CG12974, EIP78C, Hr39, EIP75-RA, CG5455, Psc. При этом необходимо подчеркнуть, что транскрипция самого гена CG9890 не изменяется в результате экдизоновой активации клеток. Таким образом было показано, что белок CG9890

принимает участие в регуляции экспрессии генов, на промоторах которых он локализуется. Он задействован в поддержании как базального уровня экспрессии генов, так и участвует в корректной активации ассоциированных с ним генов экдизонового ответа в ответ на гормональную индукцию. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-04-02193.*

КОРОТКИЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК – ПРОДУКТЫ ТРАНСКРИПЦИИ 6S РНК В БАКТЕРИИ *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Д.А. Елкина[1], О.Ю. Буренина[2], В.А. Банникова[3], Н.А. Транкова[2], Л.А. Лисицкая[4], А.В. Кульбачинский[4], Д.Д. Первушин[2], Е.А. Кубарева[1]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Сколковский институт науки и технологий; [3]Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; [4]Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

6S РНК регулирует транскрипцию генов в клетке, связываясь с РНК-полимеразой (РНКП) и блокируя её активность. РНКП способна препятствовать этому процессу: используя 6S РНК как матрицу для транскрипции, она синтезирует короткие олигорибонуклеотиды – пРНК (product RNA, pRNA), часть которых связывается с 6S РНК и меняет её конформацию. В результате происходит высвобождение РНКП из комплекса с 6S РНК. Особенности синтеза, свойства и функции пРНК в бактериальной клетке мало изучены. Согласно нашим данным 6S РНК *R. sphaeroides* имеет длину 162 нуклеотидных остатка (н.о.) и постоянно экспрессируется в клетках с разной эффективностью в зависимости от фаз роста клеточной культуры. Синтез специфических пРНК длиной 12–16 н.о. в условиях *in vivo* был продемонстрирован с помощью Нозерн-блоттинга общей клеточной РНК *R. sphaeroides*: максимум их экспрессии наблюдается в экспоненциальной и переходной фазах роста клеток, что также согласуется с данными RNA-Seq. В экспериментах по транскрипции in vitro при использовании РНКП из *E. coli* и 6S РНК *R. sphaeroides* было зафиксировано образование пРНК длиной более 24 н.о. Для установления деталей синтеза и роли пРНК в механизме функционирования 6S РНК разработана схема выделения и очистки РНКП из *R. sphaeroides*. Она включает осаждение белка полиэтиленимином, аффинную, эксклюзионную и анионообменную хроматографии. Показано, что полученная РНКП обладает транскрипционной активностью, начато исследование её взаимодействий с 6S РНК *in vitro*. В клетках РНКП синтезирует огромное количество пРНК, лишь малый процент которых не диссоциирует из комплекса с 6S РНК, что может свидетельствовать о наличии у пРНК дополнительных функций. Например, пРНК могут взаимодействовать с комплементарными последовательностями мРНК, выступая в роли антисмысловых РНК. В ходе биоинформатического анализа мРНК *R. sphaeroides* был определен набор потенциальных мишеней для пРНК. Энергия гибридизации пРНК с мРНК-мишенями в среднем более отрицательная, чем это ожидается по случайным причинам, что позволяет выбрать наиболее вероятных кандидатов. В дальнейшем будет проведен сравнительный анализ уровней экспрессии этих мРНК методом количественной ПЦР в штамме дикого типа и в штамме с делецией гена 6S РНК. *Работа проводилась при поддержке РФФИ (грант № 19-04-00791).*

ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ ОСНОВАНИЙ В НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ ДНК

А.А. Кузнецова[1], А.Т. Далетгильдеева[1], О.С. Федорова[1,2], Н.А. Кузнецов[1,2]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины; [2]Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

В клетках человека 11 различных ДНК-гликозилаз участвуют в поиске и удалении окисленных, алкилированных или неканонических оснований. Образовавшийся в результате N-гликозилазной реакции апуриновый/апиримидиновый (АР) сайт далее подвергается превращению либо за счет АР-лиазной активности бифункциональных ДНК-гликозилаз, либо под действием АР-эндонуклеаз. С помощью биоинформационного анализа показано, что в геноме человека могут встречаться неканонические структуры, отличные от B-формы ДНК, например, квадруплексы. Наиболее часто они встречаются в теломерных участках хромосом. Кроме того, установлено, что более 40% генов человека содержат вблизи промоторных областей, как минимум, одну последовательность, потенциально формирующую квадруплексную структуру. Однако особенности процессов репарации ДНК в составе неканонических структур, в том числе квадруплексов, остаются до сих пор мало изученными. Поэтому целью данной работы являлся сравнительный анализ эффективности удаления поврежденных нуклеотидов в составе неканонических структур ДНК некоторыми ферментами эксцизионной репарации оснований. В ходе исследования проводили анализ эффективности узнавания и удаления специфических повреждений ДНК-гликозилазами человека OGG1, NEIL1, NTH1 и АР-эндонуклеазой APE1. Для прямой регистрации продуктов расщепления использовали метод гель-электрофореза. Стадии образования фермент-субстратных комплексов и катализа были проанализированы методом остановленного потока, позволяющего зарегистрировать конформационные превращения в молекулах ферментов и модельных ДНК-субстратах. В работе использованы ДНК-субстраты, содержащие различные структурные элементы, такие как выпетливания, «пузыри», а также квадруплексные структуры. Полученные данные свидетельствуют о том, что на эффективность удаления повреждения влияют как структура ДНК-субстрата, так и местоположение поврежденного нуклеотида.

Работа выполнена при поддержке грантом РФФИ № 19-04-00012.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ УДАЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ, ОБРАЗУЮЩИХ КЛАСТЕР, ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ИХ ВЗАИМНЫМ РАСПОЛОЖЕНИЕМ

Н.В. Лукьянчикова, И.О. Петрусева, А.А. Ломзов, О.И. Лаврик
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Повреждения, располагающиеся в пределах одного-двух витков ДНК спирали, называют кластерными. Появление кластеров повреждений в клеточной ДНК может иметь различные биологические последствия, выраженные в ингибировании репарации и мутагенезе [1]. Эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН) в клетках высших эукариот – многостадийный процесс,

в ходе которого из ДНК удаляется широкий спектр повреждений, вызывающих значительные нарушения ее регулярной структуры, таких как УФ-повреждения и объемные химические модификации. В данной работе мы изучали взаимодействия белков ЭРН с ДНК, несущими кластерные повреждения, расположенные в одной или обеих цепях дуплекса: объемное повреждение (ненуклеозидная вставка, содержащая остаток флуоресцеина (nFlu, N-[6-(дипивалоил-5(6)-флуоресцеинил-карбамоил)гексаноил]-O1-(4,4'-диметокситритил)-O2-[(диизопропил-амино)(2-циано-этокси)фосфино]-3-амино-1,2-пропандиол)) и аналог АР-сайта (вставка на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля (DEG) [2]). Если расстояние между повреждениями в противоположных цепях было меньше 6 п.н., то сродство XPC, сенсора объемных повреждений в системе ЭРН, к таким ДНК повышалось. Одновременно, если повреждения в противоположных цепях разделяло менее 4 п.н, уровень ЭРН-катализируемой специфической эксцизии nFlu-содержащего фрагмента был резко снижен. В случае тандемного (в одной цепи) расположения повреждений DEG и nFlu на расстоянии 5 нт эксцизия nFlu-содержащего фрагмента происходила так же эффективно, как в случае одиночного повреждения. Полученные результаты вместе с данными выполненного компьютерного моделирования ДНК, содержащих модельные повреждения DEG и nFlu, позволяют проанализировать процесс репарации кластерных повреждений ДНК в клетках млекопитающих и оценить зависимость скорости удаления объемного повреждения в составе кластера от структуры и взаимного расположения повреждений.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-04-00018.

1. Sage E., Harrison L. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: Relevance to mutagenesis and cell survival. // Mutation Research. – 2011. – 711, p. 123–133.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ГОССИПОЛА НА PARP-1

Н.В. Малюченко[1], Н.С. Герасимова[1], Е.А. Котова[3], А.В. Феофанов[1,2], В.М. Студитский[1,3]
[1]Кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [3]Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, США

Одной из перспективных молекулярных мишеней для поиска противоопухолевых соединений является поли(ADP-рибозо)полимераза 1 (PARP-1). Более 250 ингибиторов PARP-1 в настоящее время находятся на разных стадиях доклинических и клинических исследований. Хотя ингибиторы PARP-1 зарекомендовали себя как эффективные агенты, их повышенная токсичность остается нерешенной проблемой. В ходе биоинформационного поиска обнаружен лиганд PARP-1- госсипол являющийся природным полифенолом и не обладающий, в отличие от известных ингибиторов PARP-1 никотинамидной фармакоформной группой. Как установлено, госсипол образует сшивку двух молекул PARP-1, ингибируя конформационную подвижность фермента, необходимую для каталитической активности. Данная работа посвящена исследованию методом spFRET-микроскопии взаимодействий госсипола, PARP-1 и флуоресцентно-меченых мононуклеосом. Эффект госсипола на каталитическую активность PARP-1 изучен методом иммуноблоттинга с использованием анти-PAR антител. Проведены эксперименты по оценке воздействия госсипола на транскрипционную активность PARP-1 в системе in vitro. В spFRET-экспериментах показано, что при концентрации госсипола более 30 мкМ разрушается структура нуклеосом. Прединкубация госсипола с PARP-1 предохраняет нуклеосому от разрушения. При этом PARP-1 сохраняет способность связываться с нуклеосомой и вызывать в ней обратимые структурные перестройки. Как ингибитор каталитической функции PARP-1, госсипол уступает олапарибу, известному ингибитору PARP-1. Методом иммуноблотинга показано, что олапариб полностью блокирует ферментативную активность PARP-1, а госсипол – лишь частично. При исследовании транскрипции нуклеосомных матриц установлено, что госсипол в меньшей степени, чем олапариб, отменяет позитивное действие PARP-1 на транскрипцию. Таким образом, с использованием нуклеосом, было показано, что госсипол обладает умеренным ингибирующим действием на PARP-1. Авторы благодарят J.M.Pascal (Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada) за любезно предоставленный рекомбинантный белок PARP-1 человека. *Работа поддержана проектом РФФИ-КОМФИ №17-00-00132.*

ВЛИЯНИЕ SUMO-МОДИФИКАЦИИ НА СВОЙСТВА ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ CP60 И BEAF У *D. MELANOGASTER*

Л.С. Мельникова, А.К. Головнин, М.В. Костюченко, В.В. Молодина
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена РАН, Москва, Россия.

Посттрансляционные модификации белков-субстратов белками семейства SUMO (Small Ubiquitin like Modifier), широко распространены среди эукариот в качестве систем регулятивного контроля. Цель представленного проекта – описание механизма SUMO-модификации белков CP60 и BEAF. Мы обнаружили, что CP60 и BEAF образуют дискретные скопления внутри ядра. Такие скопления частично колокализуются с белком CP190, маркирующим «инсуляторные тельца». Возможно, как и белки Su(Hw)-инсулятора, CP60 и BEAF привлекаются в состав регуляторных комплексов посредством сумолирования. Взаимодействие CP60 и BEAF с белком Ubc9, SUMO E2-лигазой, тестировалось в двугибридной дрожжевой системе (ДДС). Установлено, что для прямого взаимодействия BEAF с белком Ubc9 необходима последовательность BEAF от 200 до 280 ак. Для прямого взаимодействия между белками CP60 и Ubc9 – последовательность CP60 от 420 до 440 ак. Кроме того, сумолирование CP60 и BEAF было протестировано в IP-экспериментах на культуре клеток S2 с использованием ингибитора десумолирования NEM. В результате иммуноокрашивания лизата клеток антителами к тестируемым белкам мы наблюдали 2 полосы. Нижняя соответствовала подвижности немодифицированных форм белков CP60 и BEAF, а верхняя – SUMO-модификации. При добавлении NEM интенсивность верхних полос значительно возросла. Эти же полосы детектировались антителами к белку dSmt3. Следовательно, белки CP60 и BEAF действительно сумолируются. С помощью биоинформатики в составе CP60 и BEAF были выделены последовательности близкие к каноническим сайтам сумолирования. Мы внесли точечные замены в SIM-сайты CP160 и BEAF, а затем протестировали взаимодействие между мутантными вариантами этих белков и Ubc9 в ДДС. При мутациях в SIM-сайтах белок Ubc9 не взаимодействовал ни с CP60, ни с BEAF. Следовательно, предсказанные SIM-сайты

CP160 и BEAF участвуют в сумолировании. Вероятно, CP60 и BEAF, как и компоненты Su(Hw)-инсулятора, с помощью SUMO-конъюгации включаются в состав внутриядерных белковых конгломератов – «спеклов». В спеклах происходит предварительная сборка регуляторных комплексов, в работе которых участвуют CP60 и BEAF. Белковый комплекс привлекается на специфичные сайты ДНК уже в таком преассоциированном состоянии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ – проект № 19-04-00257.

ИЗУЧЕНИЕ ЛАБИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ БЕЛКОВ MUTS И MUTL СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ «МИСМАТЧЕЙ» *E. COLI* С ДНК

М.В. Монахова[1], А.Ю. Рязанова[1], Т.С. Орецкая[1], П. Фридхофф[2], Е.А. Кубарева[1]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [2]Institute of Biochemistry, Justus-Liebig University, Giessen, Germany

Система репарации неканонических пар нуклеотидов или «мисматчей» (MMR) исправляет «ошибки», возникающие при репликации ДНК. Ключевыми белками системы репарации являются MutS и MutL. Комплексы этих белков с ДНК являются конформационно подвижными, что затрудняет их изучение. Нами предложена методология изучения формирования тройного комплекса MutS-MutL-ДНК, в основе которой лежат два метода – ковалентной фиксации белка на ДНК и Фёрстеровского переноса энергии (FRET). В гомогенном состоянии получены конъюгаты, в которых мутантные формы MutS(N497C) и MutS(A336C) присоединены к ДНК через линкеры различной длины. В комплексе с MutS(N497C) ДНК зафиксирована вблизи «мисматч»-связывающего центра белка, в комплексе с MutS(A336C) – в полости, формирующейся при изменении конформации белка на «скользящий зажим». Методом FRET изучена кинетика образования комплекса MutL с мутантными формами MutS в составе конъюгатов с ДНК. Донором флуоресценции выступал краситель Sytox Blue, имеющий высокое сродство к двутяжевой ДНК. Акцептор – Alexa-594 – присоединяли к введенному в позицию 297 остатку Cys белка MutL. Показано, что скорость образования тройного комплекса MutL-MutS-ДНК и выход зависят от места «сшивки» MutS с ДНК, от длины линкера между белком и ДНК и от концентрации АТФ. Скорость образования комплекса MutL с MutS в 1,5–3 раза выше в присутствии 1 мМ АТФ по сравнению с 10 мкМ АТФ, что связано со скоростью перехода белка MutS в активную форму «скользящий зажим». MutL в 2 раза более эффективно связывается с конъюгатом MutS(N497C)-ДНК, чем с MutS(A336C)-ДНК, причем выход комплекса MutL-MutS(N497C)-ДНК не зависит от длины линкера, на котором закреплён MutS. Белок MutL не взаимодействует с MutS(A336C), зафиксированным на ДНК с помощью короткого линкера. Таким образом, комплекс MutS(N497C)-ДНК является предпочтительным для «привлечения» MutL и дальнейшей активации всей системы MMR. Очевидно, что ДНК после связывания MutS молекулы АТФ сближается с позицией 336 в белке, но при формировании тройного комплекса с меняет свое положение относительно MutS. Предложенный нами подход позволяет фиксировать конформационные перестройки, происходящие в процессе формирования лабильных комплексов с участием нескольких белков и ДНК. *Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ (№ 18-34-00768).*

ГЕН ИНТРОННОЙ МИКРОРНК hsa-miR-1273a ОБЛАДАЕТ СОБСТВЕННЫМ ДВУНАПРАВЛЕННЫМ ПРОМОТОРОМ И МОЖЕТ БЫТЬ ЭКСПРЕССИРОВАН В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА HEK293

Л.И. Патрушев, Л.К. Даянова
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

МикроРНК составляют один из классов коротких некодирующих РНК длиной 18-25 нт, которые играют важную роль в регуляции экспрессии генов на всех основных уровнях, включая транскрипцию и трансляцию. Гены их предшественников могут располагаться в межгенном пространстве, где они встречаются поодиночке или в виде кластеров, а также внутри самих генов, главным образом, в интронах. Проведенный нами анализ интронов генов протромбина и природных антикоагулянтов протеина С и протеина S выявил несколько гомологов пре-миРНК hsa-miR-1273a, функциональность которых мы предполагаем исследовать в дальнейшем на предмет их возможного влияния на экспрессию генов-хозяев и систему свертывания крови человека. Ген hsa-miR-1273a локализован на хромосоме 8 в интроне гена RGS22 (regulator of G-protein signaling 22), и его экспрессия пока продемонстрирована только в плюрипотентных эмбриональных стволовых клетках человека методом глубокого секвенирования их транскриптома. Из-за недостатка экспериментальных данных его существование (как и большинства других генов этого семейства) в настоящее время подвергается сомнению. Предполагая использовать данный ген в нашей дальнейшей работе в качестве положительного контроля, мы изучили его экспрессию в недавно разработанной нами системе с минигеном TurboGFP. Фрагмент геномной ДНК человека, содержащий ген предшественника hsa-miR-1273a и фланкирующие его короткие последовательности, клонировали в новом векторе в виде искусственного интрона в гене TurboGFP, который находился под контролем цитомегаловирусного промотора. После трансфекции клеток HEK293 в них происходило вырезание искусственного интрона из TurboGFP-РНК в результате сплайсинга и восстановление флуоресценции TurboGFP вследствие восстановления открытой рамки считывания его РНК, нарушенной интроном. Предшественник hsa-miR-1273a претерпевал эффективный процессинг с образованием зрелой миРНК, что было продемонстрировано методом ОТ-ПЦР. Тем же методом в клонированной ДНК был обнаружен активный двунаправленный промотор, расположенный перед последовательностью pre-hsa-miR-1273a. Таким образом, активный ген hsa-miR-1273a реально существует и может использовать сложную систему регуляции своей экспрессии на уровне транскрипции.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ СИСТЕМЫ ТРАНСЛЯЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ АСПЕКТОВ ЭЛОНГАЦИИ

Е.В. Полесскова[1,2], Е.М. Максимова[1], Д.С. Виноградова[1], А.Л. Коневега[1,2,3]
[1]НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, [3]НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Рибосома – макромолекулярный комплекс, который переводит генетическую информацию в аминокислотную последовательность белков. И хотя рибосома является платформой и центральным компонентом биосинтеза белка, элонгационные факторы Tu и G (EF-Tu и EF-G) играют важную роль в ускорении и повышении точности элонгации. Ключевые моменты функционирования этих компонентов трансляционного аппарата известны, однако детали этих процессов остаются не до конца понятными. Для более детальной характеристики отдельных аспектов цикла элонгации мы создали систему трансляции in vitro, состоящую из компонентов Escherichia coli с заменой одного из факторов элонгации на гетерологичный белок термофильного микроорганизма Thermus thermophilus. Скорости реакций связывания и аккомодации тРНК в А сайте снижались на порядок в присутствии термофильного EF-Tu, что указывает на то, что кинетика доставки аминоацил-тРНК определяется свойствами фактора элонгации. В то же время термофильный EF-G не изменял кинетические параметры фактор-зависимой транслокации и действие ряда ингибиторов транслокации (спектиномицин, гигромицин B, виомицин и стрептомицин). Это свидетельствует о том, что процесс транслокации определяется главным образом взаимодействием тРНК и рибосомы, тогда как EF-G как мезофильного, так и термофильного микроорганизмов способны в одинаковой степени обеспечивать создание благоприятных условий для реализации транслокации и не ограничивать скорость реакции даже при субоптимальных температурах. *Работа поддержана грантом РНФ № 17-14-01416.*

ВАЛИДАЦИЯ *IN VIVO* КОНЪЮГАТОВ миРНК С N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИНОМ ДЛЯ АДРЕСНОГО ПОДАВЛЕНИЯ UBR УБИКВИТИН-ЛИГАЗ В ПЕЧЕНИ

Т.А. Приказчикова[1], Д. Лебоф[1], З.А.В. Виана де Баррос[1], Т.О. Абакумова[1], К. Пятков[1], Т.С. Зацепин[1,2]
[1]Сколковский институт науки и технологий; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

Гепатоклеточная карцинома (ГЦК) является одним из наиболее распространеных онкологических заболеваний в мире и обладает устойчивостью к действию противоопухолевых препаратов, применяющихся в клинической практике. Поэтому поиск и валидация новых мишеней для терапии ГЦК является актуальной задачей. Правило N-концевой последовательности играет важную роль для регуляции ангиогенеза, пролиферации и гибели клеток, деградации про-апоптотичексих фрагментов [Piatkov K. et al, PNAS, 2012], что позволяет рассматривать этот путь регуляции в качестве мишени для терапии онкологических заболеваний. Ранее нами было продемонстрировано, что подавление четырех убиквитин-лигаз UBR1, UBR2, UBR4 и UBR5 методом РНК-интерференции (миРНК, упакованные в липидные наночастицы – ЛНЧ) в контексте ГЦК *in vivo* увеличивало чувствительность гепатоцитов к апоптозу. Однако, при этом наблюдалось воспаление печени, сопровождающееся увеличением размера селезенки мышей. Воспаление было вызвано подавлением пути правила N-концевой последовательности из-за уменьшения экспрессии убиквитин-лигаз и действия липидов из ЛНЧ, а также сопровождалось увеличением содержания активных форм кислорода. Для уменьшения воспаления при сохранении эффективной адресной доставки в печень, нами были получены конъюгаты модифицированных миРНК с N-ацетилгалактозамином (GalNAc). При этом было проведено сравнение нескольких паттернов 2'-дезокси-2'-фтор- и 2'-О-метилнуклеозидов, а также тиофосфатов в различных положениях миРНК для максимальной стабилизации к действию нуклеаз при сохранении функциональной активности. После сравнения эффективности подавления экспресии убиквитин-лигаз UBR1, UBR2, UBR4 и UBR5 конъюгатами GalNAc-миРНК в перевиваемой культуре гепатоцитов Hepa1.6. Для наиболее перспективных кандидатов было проведено сравнение *in vivo* при внутривенном введении. Уже при однократном введении конъюгатов (доза 2.5–5.0 мг/кг) наблюдалось долгосрочное снижение до 30% уровня мРНК убиквитин-лигаз в печени при отсутствии увеличения селезенки. Полученные конъюгаты GalNAc-миРНК позволят изучить роль убиквитин-лигаз в развитии ГЦК за счет возможности проводить долгосрочное подавление экспрессии мишеней при минимизации воспаления.

Работа поддержана программой Skoltech–MIT NGP и грантом Российского научного фонда № 19-44-0411.

РЕПЛИКАЦИЯ ПОВРЕЖДЕННОЙ ДНК СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫМИ ДНК- ПОЛИМЕРАЗАМИ СТРЕССОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ РОДА DEINOCOCCUS

М.А. Простова[1], М.В. Никитин[1], Е.С. Шилкин[1], А.А. Комар[2], Д.М. Есюнина[1], А.В. Макарова[1], А.В. Кульбачинский[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия; [2]Center for Gene Regulation in Health and Disease and Department of Biological, Geological and Environmental Sciences, Cleveland State University, Cleveland, USA

Экстремофильные бактерии рода Deinococcus обладают исключительно высокой устойчивостью к ДНК-повреждающим воздействиям и являются прекрасной моделью для изучения механизмов репликации и репарации поврежденной ДНК. В геномах этих бактерий закодированы специализированные ДНК-полимеразы, которые могут участвовать в репликации поврежденной ДНК и включении в нее неканонических нуклеотидов. В частности, у бактерии *D. radiodurans* найден ген ДНК-полимеразы X-семейства, а у бактерии *D. gobiensis*, обладающей еще большей устойчивостью к радиации и оксидативному стрессу, – гены X- и Y-полимераз. Нами впервые детально исследованы функциональные свойства этих специализированных ДНК-полимераз по сравнению с репликативными ДНК- полимеразами и изучена их способность к прохождению поврежденных участков ДНК. В работе использованы синтетические ДНК-матрицы, содержащие в определенных позициях поврежденные и неканонические нуклеотиды (8-оксогуанин, O6-метил-гуанин, АП-сайты, тиминовые димеры, этеноаденин, рибонуклеотиды), изучена эффективность прохождения поврежденных участков и специфичность включения нуклеотидов ДНК-

полимеразами напротив повреждений. Эксперименты проведены в присутствии ионов магния либо марганца, причем показано, что последние стимулируют способность ДНК-полимераз к репликации поврежденной ДНК. Обнаружено, что X-полимеразы дейнококков обладают уникальным активным центром с заменой ключевых аминокислотных остатков, что приводит к значительному падению их полимеразной активности и усилению экзонуклеазного расщепения ДНК. Проведенные эксперименты указывают на важную роль специализированных ДНК-полимераз экстремофилов рода Deinococcus в репликации поврежденных участков ДНК в стрессовых условиях. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-14-01393.*

МАЛАЯ РНК MTS1338 *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* СПОСОБСТВУЕТ ВЫЖИВАНИЮ МИКОБАКТЕРИЙ В МАКРОФАГАХ ПУТЕМ ЗАМЕДЛЕНИЯ СОЗРЕВАНИЯ ФАГОЛИЗОСОМ

Ю.В. Скворцова[1], О.С. Быченко[1], Р.Х. Зиганшин[1], А.С. Григоров[1], Е.Г. Салина[2], А.А. Острик[2], Т.Л. Ажикина[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Патогенные бактерии выработали многочисленные стратегии выживания в инфицированном организме, которые реализуются в транскрипционных и пост-транскрипционных изменениях в специфическом наборе генов, кодирующих детерминанты вирулентности. За последние несколько лет малые некодирующие РНК обнаружены у многочисленных видов бактерий, в том числе и микобактерий. Малые РНК модулируют широкий спектр физиологических ответов, играя важную роль в регуляции транскрипции, трансляции, стабильности мРНК. Мы исследуем роль малой некодирующей РНК MTS1338 в метаболизме *Mycobacterium tuberculosis*. MTS1338 встречается только у патогенных микобактерий, ее экспрессия повышается при переходе в стационарную фазу роста, в состоянии покоя, также в мышиных моделях туберкулеза спустя 6-7 недель после заражения, т.е. при формировании адаптивного иммунного ответа. Мы экспрессировали MTS1338 в непатогенной быстрорастущей бактерии *M. smegmatis* и обнаружили, что рекомбинантный штамм Smeg1338 демонстрирует более высокую выживаемость при инфекции им клеточной линии макрофагов человека THP-1. Выживание микобактерий, экспрессирующих MTS1338, также сопровождается изменением спектра экспрессии цитокинов. В экспериментах по колокализации микобактерий, фагоцитированных макрофагами, с маркерами созревания фагосом показано, что в случае Smeg1338 образование фаголизосом наблюдается реже на 30% по сравнению с диким типом M.smegmatis. Мы использовали масс-спектрометрию для сравнительного исследования белков, секретирующихся штаммами Smeg1338 и дикого типа. Выявлено, что экспрессия малой РНК MTS1338 в микобактериях приводит к секреции белка Ag85A, компонента секретируемого антигенного комплекса Ag85, для которого показано участие в процессе остановки созревания фаголизосом. Суммируя полученные результаты, мы продемонстрировали, что одним из способов модулирования иммунного ответа микобактериями является экспрессия малой РНК MTS1338, которая приводит к секреции антигена Ag85A. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 18-15-00332.*

ИЗОФОРМЫ ERF1 ЧЕЛОВЕКА И ИХ АКТИВНОСТЬ В ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

А.В. Шувалов[1], С.Д. Иванова[1,2], Е.Ю. Шувалова[1], И.М. Теренин[3], Т.В. Егорова[1], Е.Е. Соколова[1], Е.З. Алкалаева[1]
[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

eRF1 является ключевым фактором, обеспечивающим терминацию трансляции у эукариот. Он состоит из 3 доменов: N-домен участвует в распознавании стоп-кодона, M-домен способствует гидролизу пептидил-тРНК, а C-домен связывается с eRF3, катализирующим работу eRF1. У человека eRF1 кодируется геном ETF1, расположенным на 5 хромосоме. Известно 6 транскрипционных вариантов ETF1, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Они кодируют 3 изоформы eRF1. Транскрипт 1 (NM_004730.4) кодирует 1-ю изоформу eRF1. Транскрипты 2, 4-6 (NM_001256302.1, NM_001291974.1, NM_001291975.1, NM_001364160.1) кодируют 2-ю изоформу eRF1, укороченную на 33 аминокислоты с N-конца. Транскрипт 3 (NM_001282185.1) кодирует 3-ю изоформу eRF1, отличающуюся от изоформы 1 заменой первых 33 аминокислот на 19 других. 1-я изоформа eRF1 является основной и хорошо изучена. Данные о 2 и 3 изоформах eRF1 в литературе отсутствуют. Транскрипт 1 экспрессируется в здоровых тканях на уровне более 95% от всех транскриптов ETF1. В то время как транскрипт 3 экспрессируется только в раковых клетках, не более 10 % от общего уровня экспрессии ETF1. В настоящей работе, используя реконструированную in vitro систему трансляции, мы изучали активность изоформ eRF1 человека в терминации трансляции. 2 и 3 изоформы eRF1 менее стабильны чем 1 изоформа и отличаются от нее своей активностью в терминации трансляции. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-00909.*

ВЛИЯНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ НА РЕПАРАЦИЮ ДНК У СТРЕССОУСТОЙЧИВОЙ БАКТЕРИИ *DEINOCOCCUS RADIODURANS*

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

Нарушения в структуре ДНК способны значительно влиять не только на процессы репликации генома, но и на синтез РНК в ходе транскрипции. Остановка РНК-полимеразы при наличии в ДНК поврежденных нуклеотидов способствует привлечению факторов репарации, прежде всего, к транскрибируемым участкам генома. Мы исследовали транскрипцию поврежденной ДНК РНК-полимеразой стрессоустойчивой бактерии *Deinococcus radiodurans* и выяснили, что различные типы повреждений ингибируют синтез РНК. Мы показали, что белки GreA и Gfh1, связывающиеся во вторичном канале РНК-полимеразы *D. radiodurans*, усиливают транскрипционные паузы, возникающие на поврежденных участках ДНК. При этом активность филум-специфичного транскрипционного фактора Gfh1 зависит от присутствия ионов Mn^{2+}, которые накапливаются в клетке в стрессовых условиях. Известно, что транслоказа Mfd играет важную роль в сопряжении транскрипции и репарации у *Escherichia coli*, стимулируя диссоциацию остановленных в поврежденных участках элонгационных комплексов РНК-

полимеразы и привлекая к повреждению белки эксцизионной репарации нуклеотидов (NER). Мы обнаружили, что Mfd-транслоказа *D. radiodurans* также приводит к диссоциации таких комплексов, причем этот эффект усиливается в присутствии Gfh1-фактора. Мы получили очищенные препараты факторов NER *D. radiodurans* и показали, что белок UvrC в присутствии UvrA, UvrB и АТФ проявляет эндонуклеазную активность на двунитевой ДНК, содержащей поврежденные нуклеотиды. Мы предполагаем, что белки Mfd, GreA, Gfh1 могут участвовать в сопряжении транскрипции и репарации. Важной задачей дальнейших исследований является анализ влияния этих факторов на процесс репарации транскрибируемых участков ДНК у *D. radiodurans*. *Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 18-34-00905 и РНФ 17-14-01393.*

УЧАСТИЕ КОМПЛЕКСА INTEGRATOR В ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК ЧЕЛОВЕКА

Д.П. Василькова[1], М.П. Рубцова[1,2], О.А. Донцова[1,2]
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского; [2]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Теломераза – сложный рибонуклеопротеидный комплекс, который удлиняет концевые участки хромосом по матрице одного из участков собственной РНК. Теломераза активна лишь в некоторых видах клеток человека, например, в стволовых и эмбриональных, а также в некоторых линиях раковых клеток, что делает её интересным объектом для изучения [1].

Теломеразная РНК синтезируется РНК-полимеразой II в форме длинного предшественника. Получившийся первичный транскрипт затем укорачивается до зрелой формы при участии поли-А-рибонуклеазы PARN. И только зрелая форма входит в состав активного фермента теломеразы [2,3].

Многокомпонентный комплекс Integrator необходим для правильного процессинга 3’-концевого участка предшественника малых ядерных РНК (мяРНК) в клетках многоклеточных организмов. На стадии инициации транскрипции комплекс Integrator распознает промотор мяРНК и взаимодействует с С-концевым доменом РНК-полимеразы II [4].

В данной работе мы показали, что Integrator участвует также и в терминации транскрипции теломеразной РНК человека. Нокдаун различных субъединиц комплекса (в том числе и каталитических) приводит к увеличению количества 3’-удлинённой формы теломеразной РНК в клетках HEK293. Уровень экспрессии теломеразной РНК и её незрелой формы анализировали методом ПЦР в реальном времени. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии комплекса Integrator в транскрипции и процессинге теломеразной РНК человека. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 16-14-10047.*

1. Kim, N.W., et al. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science, 266(5193), 2011-2015.
2. Fu,D. and Collins,K. (2003) Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs. Mol. Cell, 11, 1361–1372.
3. Tseng,C.-K., Wang,H.-F., Burns,A.M., Schroeder,M.R., Gaspari,M. and Baumann,P. (2015) Human Telomerase RNA Processing and Quality Control. Cell Rep., 13, 2232–2243.
4. Chen J., Wagner E.J. (2010) SnRNA 3′end formation: the dawn of the Integrator complex. Biochem. Soc. Trans., 38, 1082–1087.

РЕСУСЦИТАЦИЯ ДОРМАНТНОЙ ФОРМЫ *M.TUBERCULOSIS* ХАРАКТЕРИЗУЕТСЯ НЕЗАМЕДЛИТЕЛЬНЫМ ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ВЗРЫВОМ

А.С. Григоров[1], Е.Г. Салина[2], О.С. Быченко[1], Ю.В. Скворцова[1], А.С. Капрельянц[2], Т.Л. Ажикина[1]
[1]Институт биоорганической химиии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Несмотря на развитие науки и медицины, *M.tuberculosis* остается одним из самых успешных и опасных патогенов человека. Причины такой исключительной устойчивости кроются в наличии у микобактерий дормантной формы – состояния, в котором метаболическая активность бактерий и их рост практически отсутствуют. Понимание механизмов, лежащих в основе выхода из такого состояния (ресусцитации) *M.tuberctulosis* может помочь создать лекарства, которые предотвращают реактивацию латентной инфекции. О процессе выхода из дормантности в настоящий момент известно очень мало. В большинстве работ, исследовавших это состояние, полагались на модель ре-аэрационную модель, которая подразумевает получение дормантных форма *M.tuberculosis* путём гипоксии (модель Уэйна). В этой работе мы описываем траскриптомные изменения *M.tuberculosis* во время ресусцитации из безкалиевой модели дормантности. Эта модель характеризуется наличием бактерий некультивируемого фенотипа и больше подходит для in vitro имитации латетного туберкулеза. Мы обнаружили, что переход M.tuberculosis из дормантного некультивируемого состояния к стадии клеточной репликации in vitro происходит не раньше чем через 6–7 дней после начала процесса ресусцитации. Ранняя фаза ресусцитации характеризуется постоянным, хотя и небольшим, включением радиоактивного урацила, что указывает на то, что транскрипция *de novo* начинается сразу после удаления стрессирующего фактора. Этот ранний ответ включает транскрипцию генов, кодирующих регуляторные белки и синтазы жирных кислот типов I и II. Вторая фаза ресусцитации начинается на 4-й день и заключается в активации генов центрального метаболизма, кодирующих HADH-дегидрогеназы, ATP-синтазы и рибосомальные белки. Наши результаты впервые показывают, что ресусцитация дормантной некультивируемой формы *M.tuberculosis* характеризуется немедленной активацией de novo транскрипции, после которой начинается активация генов, контролирующих ключевые метаболические пути. *Только после этого начинается клеточная репликация.* *Работа выполнена при поддержке грантов РНФ 16-15-00245 и 18-15-00332.*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ АР-ЭНДОНУКЛЕАЗ ИЗ РАЗНЫХ СТРУКТУРНЫХ СЕМЕЙСТВ

А.Т. Давлетгильдеева[1,2], О.А.Кладова[1,2], М.К.Сапарбаев[3], А.А. Ищенко[3], О.С. Федорова[1,2], Н.А. Кузнецов[1,2]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия; [3]Институт Густава Росси, CNRS UMR8200, Вильжуиф, Франция

Апуриновые/апиримидиновые (АР) эндонуклеазы являются одними из ключевых участников системы эксцизионной репарации оснований ДНК. Основной биологической функцией этих ферментов считается гидролиз фосфодиэфирной связи с 5′-стороны от АР-сайта с последующим образованием 5′-дезоксирибофосфата и 3′-гидроксильной группы. Известно также, что эти ферменты способны узнавать в качестве субстратов не только АР-сайты, но и ряд поврежденных оснований, таких как 5,6-дигидроурацил, альфа-аномеры нуклеотидов, урацил и другие. Кроме того, среди активностей некоторых АР-эндонуклеаз также выделяют 3′-фосфодиэстеразную, 3′-5′-экзонуклеазную, 3′-фосфатазную и РНКазную. Несмотря на большой объем литературных данных, субстратная специфичность многих представителей этого семейства ферментов остается невыясненной. Кроме того, мало изученными остаются молекулярные механизмы, обеспечивающие узнавание широкого набора различных поврежденных и неповрежденных нуклеотидов активным центром фермента. Поэтому целью данного исследования являлось проведение анализа субстратной специфичности АР-эндонуклеаз из различных структурных семейств по отношению к таким субстратам, как АР-сайт, урацил, альфа-аденинозин и другие. В рамках представленной работы был проведен анализ каталитической активности АР-эндонуклеаз Rrp1 (Recombination repair protein) и dmUDE (Uracil-DNA degrading factor) из *Drosophila melanogaste*r, EndoQ *из Pyrococcus furiosus*, xAPE1 из *Xenopus laevis* и zAPE1 из Zebrafish. Был осуществлен подбор оптимальных условий реакции для всех ферментов с различными ДНК-субстратами, и изучена субстратная специфичность ферментов по отношению к модельным ДНК-субстратам. Было проведено сравнение эффективности взаимодействия изучаемых АР-эндонуклеаз с различными субстратами в оптимальных условиях. Полученные данные позволяют определить роль пластичности активного центра ферментов, принадлежащих разным структурным семействам, в процессе узнавания и процессирования ДНК-субстратов при осуществлении разных типов каталитической активности.

Работа выполнялась при частичной поддержке стипендией Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов (№ СП-498.2019.4). Часть работы, связанная с получением ферментов и определением их субстратной специфичности поддержана грантом РНФ (№ 18-04-00135).

ПРИМЕНЕНИЕ ПРИРОДНЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ В СОСТАВЕ sgРНК ДЛЯ МОДУЛИРОВАНИЯ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСА Cas9/sgRNA

Е.С. Журавлев[1], И.П. Вохтанцев[1,2], Е.И. Устьянцева[1,2,3], А.М. Матвеева[1,2], Л.М. Кулишова[1], Д.О. Жарков[1,2], Г.А. Степанов[1,2*]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины; [2]Новосибирский государственный университет; [3]Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

На сегодняшний день система CRISPR-Cas9 является наиболее эффективным и распространенным инструментом, позволяющим решать задачи по редактированию генома в клетках млекопитающих. В большинстве случаев, целевое действие нуклеазы Cas9 обеспечивают химически или ферментативно синтезированные химерные sgРНК, которые позволяют получать временную экспрессию необходимых функциональных компонентов системы, снижая при этом вероятность возникновения нецелевых эффектов. Кроме того, применение синтетических sgРНК даёт возможность вводить в их структуру химические модификации, которые корректируют свойства направляющих РНК, в том числе повышают их стабильность, а также снижают иммунотоксическое действие на клетки [1].

В данной работе в качестве модели для исследования был выбран комплекс белка Cas9 с синтетическими sgРНК, содержащими в своей структуре природные модификации нуклеотидов: N^6-метиладенозин (m^6A), псевдоуридин (Ψ) и 5-метилцитидин (m^5C).

С использованием web-инструмента TIDE было показано, что введение модификаций (m^6A, Ψ и m^5C) в структуру sgРНК не снижает эффективность редактирования как белок-кодирующих, так и белко-некодирующих областей генома комплексами Cas9/sgРНК при трансфекции их в клетки человека. Кроме того, модифицированные мономеры снижают иммуностимулирующее и цитотоксическое действие sgРНК. Результаты, полученные в экспериментах *in vitro* с использованием рекомбинантного белка SpCas9 и модифицированных sgРНК, позволили заключить, что введение модификаций в структуру sgРНК изменяет соотношение активностей доменов RuvC и HNH, в то время как полная замена канонических мономеров на m^6A и Ψ значительно понижает эффективность гидролиза, катализируемого Cas9.

Таким образом, применение модифицированных нуклеотидов (m^6A, Ψ и m^5C) в составе sgРНК, с одной стороны, позволяет снизить иммуностимулирующее действие комплексов Cas9/sgРНК без потери эффективности их работы и, с другой стороны, даёт возможность модулировать активности нуклеазы Cas9 без изменения структуры самого белка. *Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ для молодых российских ученых (МК-6196.2018.4).*

1. Basila M., et al. // PloS One 2017; 12(11):e0188593.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПРИРОДНЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ В СТРУКТУРУ РНК КАК СПОСОБ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО АНАЛИЗА КОРОТКИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ РНК В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Е.С. Журавлев[1*], В.О. Шендер[2], К.С. Ануфриева[3], Д.В. Семенов[1], Р. Шах Махмуд[4], С.Ю. Маланин[4], Т.В. Григорьева[4], В.А. Рихтер[1], Г.А. Степанов[1,5]

[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск; [2]ФНКЦ физико-химической медицины, Москва; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва; [4]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; [5]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Стратегия включения модифицированных нуклеотидов в структуру синтетических РНК широко распространена при решении как фундаментальных, так и практических задач молекулярной биологии. Введение модификаций позволяет избирательно корректировать свойства получаемых молекул РНК.

В данной работе такой подход был использован нами для выявления особенностей функционирования в клетках человека ряда малых ядрышковых C/D-бокс-РНК (SNORD25, SNORD35a, SNORD74), участвующих в патологических процессах. Для устранения неспецифических цитотоксических эффектов, вызываемых немодифицированными аналогами мяоРНК, были получены РНК, содержащие в своей структуре природные модификации нуклеотидов: N^6-метиладенозин (m^6A), псевдоуридин (Ψ) и 5-метилцитидин (m^5C). Было установлено, что введение Ψ и m^5C в структуру искусственных коротких нкРНК существенно снижает их иммуностимулирующее действие. Для подтверждения наблюдаемого эффекта проводили оценку изменений в экспрессии генов методами полнотранскриптомного анализа и ОТ-ПЦР, а также сравнение пролиферации клеток в реальном времени в условиях трансфекции полученными РНК. Кроме того, было показано, что модифицированные РНК в меньшей степени активируют клеточные рецепторы PKR и RIG-I по сравнению с немодифицированными аналогами. Обнаруженный эффект связан с повышением термодинамической стабильности элементов вторичной структуры РНК при включении модифицированных нуклеотидов [1]. С использованием Ψ-модифицированных аналогов методом глубокого секвенирования транскриптома и методом протеомного профилирования белков были проанализированы возможные молекулярные пути функционирования выбранных C/D-бокс-мяоРНК в клетках человека.

Таким образом, применение модифицированных нуклеотидов, с одной стороны, позволяет корректировать свойства коротких регуляторных РНК и, с другой стороны, дает возможность получить новую информацию о их функционировании. *Исследование выполнено при частичной поддержке проекта базового бюджетного финансирования Минобрнауки РФ (0245-2019-0001).*

1. Stepanov G.A., Zhuravlev E.S. et al. // Genes. 2018. V. 9. 531.

ВЛИЯНИЕ ДАЛЬНИХ РНК-РНК ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ПРЕ-МРНК ЧЕЛОВЕКА НА АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ

М.А. Калинина[1], С.Д. Калмыкова[1], Д.А. Скворцов[2], Д.Д. Первушин[1,3], О.А. Донцова[1,2]

[1]Сколковский институт науки и технологий; [2]Химический факультет и [3]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Для большинства эукариотических организмов характерен процесс альтернативного сплайсинга, в результате которого первичный транскрипт может давать начало разным мРНК. Изменение последовательности мРНК может приводить к сильным изменениям свойств и функций закодированного белка, поэтому процесс альтернативного сплайсинга подвергается сложной регуляции. Известно, что на протекание сплайсинга влияют как белковые факторы (элементы сплайсосомы и факторы сплайсинга), так и вторичная структура РНК [1]. Наименее изученным способом регуляции сплайсинга пре-мРНК человека является образование вторичной структуры РНК между далеко расположенными последовательностями [2], в то время как у многих беспозвоночных такой способ регуляции сплайсинга широко распространен [3]. В данной работе мы экспериментально подтвердили наличие дальних РНК-РНК взаимодействий, влияющих на альтернативный сплайсинг, в нескольких транскриптах человека. Мы показали, что с помощью таких вторичных структур РНК может регулироваться включение кассетных экзонов (на примере гена PHF20L1), а также происходить выбор включения одного из взаимно-исключающих экзонов (на примере гена ATE1). С помощью мини-генов и сайт-направленного мутагенеза мы показали наличие вторичных структур в пре-мРНК мишеней, за счет которых происходит регуляция альтернативного сплайсинга. При компенсирующих комплементарных мутациях в таких конструктах структура восстанавливалась, а паттерн сплайсинга возвращался к исходному. Также мы показали возможность модуляции альтернативного сплайсинга с помощью антисмысловых олигонуклеотидов на клеточной линии человека. Антисмысловые последовательности блокируют образование вторичной структуры и приводят к изменениям паттерна сплайсинга, что открывает возможности практического применения данного подхода. *Данная работа поддержана грантом РФФИ №18-29-13020*

[1] M. Chen and J. L. Manley, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., vol. 10, no. 11, pp. 741–754, Nov. 2009.
[2] D. D. Pervouchine et al., RNA N. Y. N, vol. 18, no. 1, pp. 1–15, Jan. 2012.
[3] Y. Yue et al., RNA Biol., Mar. 2017.

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАЦИИ МЕТИЛИРОВАННОЙ ДНК FE(II)/2–ОКСОГЛУТАРАТ-ЗАВИСИМОЙ ДИОКСИГЕНАЗОЙ AlkB

Л.Ю. Канажевская[1], Д.А. Смышляев[2], Н.А. Кузнецов[1,2], О.С. Федорова[1,2]

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

Fe(II)/2–оксоглутарат-зависимая диоксигеназа AlkB из *E.coli* является родоначальником семейства ферментов, удаляющих алкилированные основания из ДНК и РНК путем окислительного деалкилирования. AlkB катализирует окисление N1-метила-

денина (1-meA), N3-метилцитозина, а также экзоциклических аддуктов ДНК, таких как 1,N6-этеноаденин, в одно- и двуцепочечной ДНК. Механизм действия AlkB основан на активации молекулярного кислорода и включает два этапа: образование высокоактивного оксиферрильного интермедиата Fe(IV)=O и окисление алкильной группы ДНК-субстрата. Косубстрат 2-оксоглутарат (2-OG) выступает в качестве восстановителя в процессе активации молекулы O_2. Ранее было высказано предположение о том, что активация молекулярного кислорода требует конформационной перестройки активного центра AlkB. [1–2]. Целью настоящей работы было провести кинетический анализ конформационных перестроек в AlkB и ДНК на отдельных стадиях процесса деметилирования ДНК. В качестве модельных субстратов использовали 15-звенные одно- и двуцепочечные олгиодезоксирибонуклеотиды, содержащие остаток 1-meA. Изменение конформации AlkB в ходе каталитического цикла регистрировали по флуоресценции остатков Trp. Изменение конформации ДНК-субстратов – путем введения в олигонуклеотид флуоресцирующего основания 2-аминопурина и FRET-пары FAM/BHQ-1. Для изучения кинетического механизма использовали метод «остановленной струи». Полученные в предстационарных условиях кинетические кривые содержали фазы роста и тушения флуоресценции в интервале времени от 1 мс до 50 с, что свидетельствует в пользу предположения о конформационной подвижности активного центра AlkB. Для того, чтобы отнести наблюдаемые переходы к определенным этапам каталитического механизма, аналогичным образом исследовали взаимодействие AlkB с ДНК-субстратом в присутствии ионов Ni (II) и Co (II). Эти металлы ингибируют каталитическую активность AlkB, сохраняя его способность связывать поврежденную ДНК. Установлено, что связывание ДНК-субстрата сопровождается трехстадийным изменением конформации фермент-субстратного комплекса в промежутке времени 1 мс – 1с. *Работа поддержана грантом РНФ № 16-14-10038.*

1. B. Yu and J. F. Hunt, Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106, 14315-14320.
2. Z. Zhang, et al. FEBS Lett, 2002, 517, 7-12.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ СООТНОШЕНИЯ мтДНК/яДНК В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО АРЕСТА КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Н.Д. Кашко[1], Ф.Ф. Северин[1,2], Д.А. Кнорре[2,3]
[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики и [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В.Ломоносова; [3]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Репликация митохондриальной ДНК (мтДНК) контролируется белками, закодированными в ядерном геноме (яДНК). Однако то, как ядро координирует репликацию мтДНК и яДНК, до сих пор остается неясным. В некоторых исследованиях показано увеличение относительного содержания мтДНК в клетках при аресте клеточного цикла. В то же время существуют механизмы, препятствующие избыточной репликации мтДНК. Мы предположили, что в разных фазах клеточного цикла эффективность этих механизмов может существенно различаться. Чтобы проверить это предположение, мы исследовали динамику изменений соотношения мтДНК/яДНК при длительном аресте клеточного цикла на различных стадиях. Для этого мы использовали штаммы дрожжей с термочувствительными мутациями в генах CDC: cdc13-1 (арест при переходе из S в G2), cdc15-2 (телофаза), Δcdc26 (метафаза), cdc34-2 и cdc53-1 (G1). На непермиссивных температурах клетки этих штаммов прекращали деление. Мы не обнаружили изменений соотношения мтДНК/яДНК методом количественной ПЦР в этих условиях. Мы также исследовали накопление мутантных вариантов мтДНК (Rho-), содержащих большие делеции в последовательности и поэтому неспособных обеспечить формирование функциональной дыхательной цепи и АТФ-синтазы. В этих клетках также не происходило увеличение соотношения мтДНК/яДНК. Эти результаты указывают на то, что механизмы, ограничивающие избыточное накопление мтДНК, не связаны с эффективностью работы митохондрий. В то же время, в арестованных клетках наблюдалось увеличение интегральной флуоресценции от ДНК-интеркалирующего зонда — пропидий иодида. Расхождение полученных результатов может объясняться тем, что в условиях длительного ареста возможна абортивная репликация мтДНК, продукты которой не удается обнаружить ПЦР. Также возможно накопление других молекул ДНК в клетке, например, экстрахромосомальных кольцевых ДНК, несущих гены рРНК. В совокупности, наши данные указывают на то, что во всех фазах клеточного цикла дрожжей функционируют механизмы, ограничивающие избыточное накопление мтДНК.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00782

СТИМУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ АР-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ 1 ЧЕЛОВЕКА ФЕРМЕНТАМИ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ

О.А. Кладова, И.В. Алексеева, О.С. Федорова, Н.А. Кузнецов
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 человека (APE1) является одним из важнейших ферментов эксцизионной репарации оснований (BER), а также активатором различных факторов транскрипции. АР-эндонуклеаза APE1 осуществляет ферментативный гидролиз АР-сайтов, возникающих в ДНК спонтанно или в результате действия многих ДНК-гликозилаз. Ранее было показано, что APE1 взаимодействует с другими участниками BER и также стимулирует активность некоторых ДНК-гликозилаз. В настоящее время установлено, что существует несколько сотен полиморфных вариантов фермента APE1, распространенных у человека. Возникновение аминокислотных замен, вызванных однонуклеотидными полиморфизмами, может приводить к снижению активности фермента за счет влияния на способность фермента связываться с ДНК или осуществлять каталитическую реакцию. Кроме того, замены аминокислотных остатков могут также нарушать белок-белковые взаимодействия с другими участниками репарации ДНК. В данной работе было проведено исследование влияния ДНК-гликозилаз человека hOGG1, AAG и hUNG2 на активность APE1 дикого типа, и некоторых природных полиморфных форм: R221C, N222H, R237A, G241R, M270T, R274Q, P311S, содержащих замены аминокислотных остатков, участвующих в координации ДНК, либо осуществлении ферментативного гидролиза АР-сайта. Исследование белок-белковых взаимодействий проводилось

методом остановленного потока, при регистрации изменения интенсивности флуоресценции ДНК-зондов, содержащих в последовательности АР-сайт и FRET-пару FAM/BHQ1. Было показано, что степень расщепления АР-сайта ферментом APE1 дикого типа и полиморфными формами N222H, R237A, G241R, M270T, P311S значительно увеличивалась в присутствии ДНК-гликозилаз hOGG1 и hUNG2. В то же время активность полиморфных вариантов APE1 R221C и R274Q не зависела от присутствия ДНК-гликозилаз. Полученные данные указывают на взаимное влияние APE1 и ДНК-гликозилаз в ходе ферментативного процесса и согласованное действие данных ферментов в пути эксцизионной репарации оснований. *Данная работа была выполнена при частичной поддержке стипендией Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов СП-1430.2019.4 и грантом МД-3775.2019.4.*

ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ AKT/MTOR / NF-KB / STAT3 – СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (MCF7) ПРИ ДЕЙСТВИИ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК, СОДЕРЖАЩЕЙ ТРАНСКРИБИРУЕМУЮ ОБЛАСТЬ РИБОСОМНОГО ПОВТОРА

Е.А. Кожина[1], Е.М. Малиновская[1], Е.С. Ершова[1,3], М.С. Конькова[1], В.П. Вейко[2], Л.В. Каменева[1], Н.Н. Вейко[1], С.В. Костюк[1,3]

[1]Медико-генетический научный центр; [2]Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; [3]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

Известно, что при онкологических заболеваниях, как и при многих других патологиях, уровень внеклеточной ДНК (вкДНК) в кровотоке больного возрастает в несколько раз. Было установлено, что содержание транскрибируемой области рибосомного повтора в составе вкДНК (ТОрДНК) в крови больных раком молочной железы достоверно превышает его содержание в норме. Ранее показали, что ТОрДНК в составе вкДНК способна легко окисляться, проникать в раковые клетки и локализоваться в ядрышках. Изучение биологической активности ГЦ-богатой ДНК в отношении раковых клеток необходимо для установления механизмов формирования толерантности раковых клеток к терапии. Исследовали активацию транскрипции генов сигнальных путей, участвующих в возникновении адаптивного ответа, при воздействии вкДНК на примере культуры аденокарциномы молочной железы MCF7. Создали модельную конструкцию, содержащую вектор pBR322 со вставкой ТОрДНК (пТОрДНК). В качестве контроля к MCF7 добавляли вектор pBR322. При появлении в среде культивирования MCF7 пТОрДНК возрастает транскрипционная активность генов сигнальных путей, направленных на поддержание жизнедеятельности раковой клетки: возрастает экспрессия генов MTOR, AKT1, AKT2, AKT3 Akt/mTOR –сигнального пути в 3-9 раз, генов NFKB1, MYD88, TIRAP, RELA, TNFa, IL6, IL8 IFNG NF-kB –сигнального пути в 1,5-3 раза, генов STAT3, STAT6 в 1,5-2,5 раза. Также фиксируется повышение экспрессии генов металлопротеиназ MMP2 и MMP7, транскрипция которых находится под контролем STAT3. Вектор pBR322 без вставки не активировал исследуемые сигнальные пути. Таким образом, показали, что при добавлении внеклеточной ДНК, обогащенной транскрибируемой областью рибосомного повтора к MCF7 в концентрации 10-200 нг/мл, ТОрДНК выступает в качестве DAMPs (damage-associated molecular patterns), что способствует формированию адаптивного ответа клеток линии MCF7 и повышению выживаемости раковых клеток в условиях окислительного стресса. *Работа выполнена в рамках проекта No. 0517-2018-0003 программы Президиума РАН.*

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ ТРАНСМИССИИ ВИЧ-1

Д.С. Комков[1,4], А.Ю. Масленникова[1], А.А. Зотова[1, 2], Д.В. Мазуров[1,3]

[1]Институт биологии гена РАН; [2]Биологический факультет, МГУ им. Ломоносова; [3]ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России; [4]Первый МГМУ им. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

В последние годы феномен межклеточной трансмиссии ВИЧ-1 *in vivo* интенсивно изучается. Предпосылками к этому стали данные о том, что передача вируса от инфицированной клетки к здоровой клетке при непосредственном контакте оказывается более эффективной, чем заражение свободными вирионами. Образующийся при этом вирусологический синапс защищает вирусные частицы от нейтрализующего действия антител. Кроме того, одновременное инфицирование клетки-мишени двумя и более вирионами лежит в основе рекомбинационного разнообразия ВИЧ-1, которое усиливает резистентность вируса к антиретровирусным препаратам и клеточным факторам рестрикции. Точная оценка уровней межклеточной репликации ВИЧ-1 – сложная задача, так как клетки-продуценты и клетки-мишени находятся в смеси и трудно отделимы друг от друга. В связи с этим мы создаем трехпараметрическую систему на основе трансгенных лимфоидных клеток человека, в которой методом проточной цитометрии вирусологический синапс будет оцениваться по количеству красно-голубых конъюгатов, образующихся между RFP(+) клетками-продуцентами и BFP(+) клетками-мишенями. Уровень межклеточной инфекции при этом будет оцениваться по трансдукции репортера inGFPt. Для этого в Т-клетки человека Jurkat и CEM стабильно интегрируются упаковочный вектор и репортерный вектор inGFPt, а также вектор для индуцибельной экспрессии белка оболочки ВИЧ-1 Env. В целях получения трансгенных клеток мы разработали ZFN, CRISPR-Cas9 системы, позволяющие направить интеграцию нескольких трансгенов в нейтральный локус человека AAVS1. На первом этапе работы мы получили донорскую плазмиду с упаковочным вектором ВИЧ-1, где короткий селекционный маркер CD5HA2 (Zotova et al, SciRep 2019) был слит с С-концом гена Nef через последовательность P2A. Тестирование показало, что селекционный маркер HA эффективно экспрессировался на поверхности трансфицированных клеток 293T, при этом экспрессия вирусных белков Gag и Nef сохранялась на прежнем уровне. Полученный вектор планируется использовать для интеграции упаковочного генома ВИЧ-1 в локус AAVS1 лимфоидных клеток человека с последующей селекцией методом FACS-сортировки – первого этапа создания ВИЧ-1 трансгенных клеток.

Исследование поддержано грантом РФФИ 18-04-01016.

НЕОБЫЧНАЯ СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ БЕЛКА-АРГОНАВТА ИЗ МЕЗОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ

Е.В. Кропочева[1], Д.М. Есюнина[1], А.А. Аравин[2], А.В. Кульбачинский[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН, Москва Россия; [2]Отделение биологии и биологической инженерии, Калифорнийский технологический университет, Пасадина, США

Белки, принадлежащие к семейству Аргонавтов, закодированы в геномах представителей всех трех доменов живых организмов. У эукариот они хорошо изучены как ключевые компоненты РНК-интерференции, эпигенетической регуляции и других процессов. Эти белки способны связывать короткие гидовые РНК и осуществлять расщепление комплементарных РНК-мишеней или привлекать дополнительные регуляторные факторы. Структурное разнообразие белков-Аргонавтов прокариотических организмов гораздо выше, чем эукариотических. Однако их роль в функционировании клеток бактерий и архей остается невыясненной. Мы сосредоточили свое внимание на белках-Аргонавтах, закодированных в геномах мезофильных микроорганизмов, в частности, бактерий порядка Bacillales. Для изучения субстратной специфичности один из таких белков (KmAgo) экспрессировали в клетках *E. coli* и очищали с помощью хроматографических методов. В отличие от эукариотических Аргонавтов, исследуемый фермент предпочтительно использует гидовые ДНК для расщепления ДНК-мишеней. Однако он также способен катализировать реакцию разрезания с использованием РНК как в качестве гида, так и в качестве мишени, хотя и с меньшей эффективностью. Аргонавт способен использовать гидовые нуклеиновые кислоты в диапазоне длин 12–22 нт, максимальная скорость реакции достигается с использованием гидов длиной 16 нт. Фосфорилирование гида по 5'-концу увеличивает скорость и точность разрезания мишени. При внесении однонуклеотидных замен в 5’-концевой район гидовой нуклеиновой кислоты скорость реакции изменяется незначительно. Мисмэтчи в центральной и 3’-концевой части гида, напротив, могут приводить к значительному снижению эффективности разрезания. Это отличает данный бактериальный Аргонавт от изученных эукариотических Аргонавтов. Таким образом, нами показана широкая субстратная специфичность белка-Аргонавта KmAgo, что потенциально позволяет использовать его в качестве программируемой нуклеазы для разрезания ДНК и РНК-*субстратов in vitro* и *in vivo*.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 14.W03.31.0007.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В КОНТЕКСТЕ НУКЛЕОСОМ

Т.А. Кургина[1,2], М.М. Кутузов[1,2], К.А. Белоусова[1], Р.О. Анарбаев[1,2], О.И. Лаврик[1,2]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Поли(АДФ-рибозо)полимераза 1 (PARP1) – ключевой фермент, регулирующий репарацию ДНК и ответ на генотоксический стресс. PARP1 активируется, связываясь с ДНК, которая при этом выступает в роли кофактора. Фермент катализирует синтез поли(АДФ-рибозы), используя в качестве субстрата NAD+ и осуществляя таким образом посттрансляционную модификацию различных белков, в том числе самого себя. Три препарата-ингибитора PARP1 одобрены FDA для терапии рака молочной железы. PARP1 вовлечён в развитие воспаления [1] и нейродегенеративных заболеваний [2]. Таким образом, ингибирование ферментативной активности PARP1 может оказывать влияние на течение данных заболеваний. Это делает ингибиторы PARP1 не только перспективными противоопухолевыми препаратами, но и открывает возможности применения их при терапии сепсиса, инфаркта миокарда и других неонкологических заболеваний [1]. Однако при применении ингибиторов PARP1 может возникать устойчивость раковых опухолей к терапии. Эти проблемы требуют не только разработки новых препаратов-ингибиторов, но и фундаментальных исследований PARP1 и его взаимодействия с другими белками. Мы разработали тест-систему, которая позволяет анализировать активность PARP 1 в режиме реального времени [3]. В данной работе мы модифицировали эту тест-систему для наблюдения активности PARP1 на нуклеосомах *in vitro*. Этот подход может позволить провести скрининг ингибиторов PARP1 в условиях, приближенных к структуре хроматина. Нуклеосома представляет собой ДНК-белковый комплекс, состоящий из ДНК длиной 147 п.н., «намотанной» на гистоновый октамер. Эта модель ближе к условиям *in vivo*, чем короткая модельная ДНК, использованная ранее. Предложенным методом мы изучили взаимодействие PARP1 с интактной нуклеосомой и нуклеосомой с поврежденной ДНК. Изучено действие некоторых ингибиторов PARP1 с использованием нуклеосомы и свободной ДНК. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-74-20075*

1. Kunze F.A. et.al. Regulating Immunity via ADP-Ribosylation: Therapeutic Implications and Beyond. Cell Press, 2019
2. .Klimova N. et.al. Multi-targeted Effect of Nicotinamide Mononucleotide on Brain Bioenergetic Metabolism. Neurochem.Res, 2019
3. Kurgina T.A. et.al. A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity. Anal.Biochem, 2018

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ *IN VITRO* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ БЕЛКА-АРГОНАВТА *RHODOBACTER SPHAEROIDES* НА ТРАНСКРИПЦИЮ

Л.А. Лисицкая, Д.М. Есюнина, И.В. Петушков, А.В. Кульбачинский
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

иохимические и структурные исследования белков-Аргонавтов (Ago) позволили выявить их ключевую роль в процессах РНК-интерференции у эукариот. Специфичность действия этих белков обеспечивается связыванием коротких «гидовых» молекул нуклеиновых кислот, которые служат для распознавания и расщепления комплементарных мишеней. В то же время, о функциях прокариотических белков-Аргонавтов, биогенезе «гидовых» молекул и связывании с ДНК/РНК-мишенями на сегодня известно немного. Изучение этих белков актуально для определения их роли в защите генома от чужеродных генетических элементов и в регуляции генетических процессов, таких как транскрипция, репликация и репарация ДНК в прокариотической клетке. Белок-Аргонавт (RsAgo) альфапротеобактерии *Rhodobacter sphaeroides* использует гидовые РНК для узнавания ДНК-мишеней, но не обладает нуклеазной активностью. Однако RsAgo может вызывать расщепление плазмидной ДНК in vivo за счёт действия дополнительных нуклеаз. Предполагается, что RsAgo способен подавлять транскрипцию генов-мишеней *in vivo*,

а процесс его загрузки специфическими гидовыми молекулами может быть сопряжен с транскрипцией. В связи с этим целью нашей работы было создание системы для анализа влияния RsAgo на транскрипцию *in vitro*. Для проверки взаимодействия с RsAgo была выделена нативная РНК-полимераза *R. sphaeroides*. Получены синтетические транскрипционные матрицы, которые содержат сильные промоторы PR фага λ и galP1 *Escherichia coli*, подобраны гидовые РНК для RsAgo, комплементарные матрице ДНК. Активность РНК-полимеразы на данных матрицах протестирована в различных условиях, с разными составами реакционного буфера и при разных температурах. Разработаны методики загрузки RsAgo, связанного с гидовыми РНК, на двунитевую ДНК. Начаты эксперименты по транскрипции ДНК-матриц, содержащих загруженный белок-Аргонавт в различных позициях. Предполагается, что разработанная система позволит определить влияние RsAgo на прохождение РНК-полимеразы *in vitro*. *Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор 14.W03.31.0007).*

ГЕНОТЕРАПИЯ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ GPI-ЗАЯКОРЕННЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ GP41

А.К.Ю. Масленникова[1], А.А. Зотова[1,2], Д.В. Мазуров[1,3]
[1]Институт биологии гена РАН; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Современная антиретровирусная терапия (АРТ) не позволяет добиться полной эрадикации ВИЧ, поэтому ВИЧ-инфицированные люди пожизненно получают АРТ. Длительный прием АРТ вызывает развитие резистентности и осложнений, связанных с токсичностью препаратов. На фоне указанных проблем развиваются альтернативные способы лечения, к которым можно отнести пептиды, ингибирующие слияние вируса с клеткой. В настоящее время только один препарат такого класса энфувиртид (T-20) из оболочечного белка вируса gp41 разрешен для клинического применения. Он используется в комбинации с АРТ и позволяет снизить вирусную нагрузку. Однако к нему также развивается резистентность, а курс лечения дорогостоящий. Ранее мы разработали способ изоляции клеток с редактированным геном с помощью CRISPR/Cas9 и метода SORTS (Surface Oligopeptide knock-in for Rapid Target Selection) (Zotova et al., Sci.Rep. 2019) и показали возможность его применения для эрадикации ВИЧ-1. В рамках данного проекта предполагается модифицировать SORTS путем замены эпитопного тага HA на один из gp41 пептидов – ингибиторов слияния ВИЧ с клеткой. Такой подход позволит добиться эрадикации ВИЧ-1 с одновременным созданием защиты клеток от повторного заражения. На первом этапе проекта мы создали клеточную линию HEK293T/CD4/R5, пермессивную к заражению ВИЧ-1 с разным тропизмом. Далее были сконструированы лентивирусные векторы, кодирующие флюоресцентный белок mClover и одни из gp41 пептидов C34, T-20, MT-C34, MT-C34-R, HP23L, MT-WQ-IDL, p52 или MT34-15D в контексте короткого GPI-белка CD52, который доставлял его в липидные рафты на поверхность клетки, важные для слияния ВИЧ. Пептиды кроме T-20 (возможная причина в его гидрофобности) были стабильно экспрессированы на поверхности пермессивных клеток. Инфекционные тесты с X4-тропным (NL4-3) и двумя R5-тропными (JRFL, ZM135) ВИЧ-1 показали, что наиболее активными оказались пептиды на основе MT-C34, которые защищали клетки HEK293T/CD4/R5 от всех разновидностей вируса на уровне свыше 98%. Таким образом, нами впервые было показано, что пептиды из gp41 могут эффективно ингибировать слияние ВИЧ-1 с клеткой, если экспрессируются на плазматической мембране в результате GPI-заякоревания. *Работа поддержана грантом РФФИ 18-29-07052.*

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 КАК ПОДХОД К ФУНКЦИОНАЛЬНОМУ АНАЛИЗУ АКТИВНОСТИ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК

А.М. Матвеева[1,2], Ю.А. Филиппова[1], Е. С. Журавлев[1], Д.В. Семенов[1], В.В. Власов[1], Г.А. Степанов[1,2]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины, СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

В качестве модели исследований в данной работе выбраны малые ядрышковые РНК (мяоРНК), а именно, подкласс C/D-бокс-мяоРНК, которые за счет наличия в структуре консервативных элементов осуществляют 2'-O-метилирование нуклеотидов рРНК. Разработка подходов к функциональному анализу подобных представителей классов некодирующих РНК (нкРНК) может помочь охарактеризовать как изученные функции, так и новые, ранее не описанные. В качестве инструмента регуляции активности была выбрана система CRISPR/Cas9 как эффективный метод изменения экспрессии гена-мишени, конечной структуры и функции его продукта. На основе культуры клеток человека 293FT с помощью системы CRISPR/Cas9 были получены моноклональные линии с мутациями в ряде C/D-бокс-мяоРНК, закодированных в интронах модельного гена GAS5 (Growth Arrest Specific 5). Анализ изменений в экспрессии мяоРНК-мишеней проводили методом ОТ-ПЦР и с помощью массового параллельного секвенирования коротких форм РНК. Функциональную активность мяоРНК-мишеней оценивали по изменению уровня 2'-O-метилирования соответствующего сайта рРНК с помощью специально разработанного подхода, основанного на терминации обратной транскрипции. Полученные данные позволили заключить, что возможна селективная регуляция активности мяоРНК-мишени путем точечного редактирования кодирующего ее интрона. Важно отметить, что уровень других мяоРНК, в том числе и закодированных в интронах того же гена-хозяина GAS5, в модифицированных клетках значительно не изменяется, что позволяет проводить выборочный функциональный анализ. На примере данных клеточных линий продемонстрировано, что мутации в D-боксе U74 и U80 мяоРНК и D'-боксе U75 мяоРНК сопровождаются снижением уровня зрелых форм мутантных РНК-мишеней, а также падением глубины 2'-O-метилирования природного нуклеотида-мишени. Интересно отметить, что даже минимальное нарушение геометрии характерной структуры K-turn, наблюдаемое на примере линии, содержащей мутации в C-боксе U77 мяоРНК, также приводит к снижению уровня зрелых форм мутантных РНК-мишеней. Описанные клеточные линии могут использоваться как интересная модель для изучения неканонических функций мяоРНК, исследования процессов пост-транскрипционного созревания рибосомных РНК и сборки рибосом. *Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-29-07073.*

НОВЫЙ БЕЛОК-АРГОНАВТ ИЗ МЕЗОФИЛЬНОЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCOCCUS ELONGATUS*

А.В. Олина[1], М. Нинова[2], А.А. Аравин[1,2], А.В. Кульбачинский[1], Д.М. Есюнина[1]
[1]Институт молекулярной генетики, РАН, Москва, Россия; [2]Калифорнийский технологический институт, Пасадена, Калифорния, США

Белки-аргонавты – ключевые игроки процессов РНК-интерференции в клетках эукариот. Эукариотические аргонавты связывают короткие РНК и используют их в качестве гидов для распознавания РНК-мишеней. Гены аргонавтов также были обнаружены в геномах бактерий и архей, однако прокариотические аргонавты более разнообразны по доменному составу, часто ассоциированы в геноме с нуклеазами или хеликазами и способны связывать в качестве гида не только РНК, но и ДНК. Функции аргонавтов в клетках прокариот до сих пор не известны. Возможно, прокариотические аргонавты способны действовать как специфические эндонуклеазы, защищая клетки от чужеродных генетических элементов. В данной работе мы исследовали аргонавт SynAgo из мезофильной цианобактерии *Synechococcus elongatus*. SynAgo, как и аргонавты эукариот, состоит из четырех доменов (PAZ, MID, PIWI и N-концевой) и имеет каталитический сайт в домене PIWI. Нами был создан штамм S. elongatus, экспрессирующий SynAgo с аффинным тагом, который использовали для выделения SynAgo и анализа ассоциированных нуклеиновых кислот и белков. Показано, что SynAgo связан с короткими гидовыми ДНК, последовательности которых соответствуют полному геному без каких-либо предпочтений. Среди белков-партнеров SynAgo доминируют SSB-белки. Методом RT-qPCR было установлено, что экспрессия SynAgo в клетках *S. elongatus* на разных стадиях роста имеет одинаково низкий стабильный уровень. Кроме того, SynAgo экспрессировали в гетерологичной системе *E. coli*, очищали и затем использовали для анализа ассоциированных нуклеиновых кислот и экспериментов in vitro. Показано, что SynAgo в клетках E. coli также загружен короткими ДНК, что указывает на его независимость от дополнительных факторов при загрузке гидами. Очищенный SynAgo также может быть искусственно загружен короткими ДНК и способен с их помощью специфически разрезать ДНК-мишени. Таким образом, SynAgo – ДНК-зависимая ДНК-нуклеаза, функции которой в клетках S. elongatus пока до конца не выяснены. Чтобы выявить роль SynAgo, мы планируем проанализировать его экспрессию в стрессовых условиях, изучить свойства штаммов *S. elongatus* с мутациями в гене аргонавта и определить влияние SynAgo на устойчивость бактериальных клеток к бактериофагам. *Работа выполнена при поддержке грантов РНФ 16-14-10377 и РФФИ № 18-29-07086.*

ЭВОЛЮЦИЯ КОРОТКИХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ (STR) РЫБ СЕМЕЙСТВА КАРПОВЫЕ (CYPRINIDAE)

М.А. Орлов[1], А.Ю. Тихонов[2]
[1]Институт биофизики РАН, [2]Группа компаний «Аква Лого», Россия

Короткие тандемные повторы (short sequence repeats, SSR) представляют собой участки ДНК длиной в несколько нуклеотидов, которые повторяются непосредственно друг за другом от нескольких до десятков и более раз. Длина SSR в находящихся под давлением селекционного отбора генов может быстро изменяться, а также коррелировать с выраженностью кодируемого признака [1]. Более того, способность SSR к экспансиям и сокращениям связана с изменением скорости мутационного процесса ДНК [2]. Для корюшки (*Gasterosteus aculeatus*) установлено, что подвергающиеся активным эволюционным преобразованиям гены обогащены протяженными TG-повторами [2]. Нами рассмотрены полные наборы SSR 29 рыб семейства карповых (Cyprinidae), полученных главным образом из базы данных FishMicrosat [3]. Cyprinidae интересны в связи со сложной картиной полиплоидности, образованием межвидовых и межродовых гибридов и хромосомными перестройками [4]. Для наборов SSR проведен статистический анализ размеров и нуклеотидной последовательности. Несколько геномов включают заметно выделяющиеся по протяженности SSR. Далее для каждого набора повторов рассчитана представленность олигонуклеотидов (ди-, три- и тетра-), для которых проведен иерархический кластерный анализ. Полученные в результате два кластера хорошо согласуются с тем, разводятся ли соответствующие виды в неволе. При визуализации первичной структуры соответствующих им SSR выявлено, что включающий большинство культивируемых рыб кластер отличает большее количество TG-(CA-)богатых последовательностей его обеднении AG-(TC-)динуклеотидами. Таким образом, разведение представителей Cyprinidae в неволе оказалось связанным с преобладанием пар TG. Кластеризация частоты встречаемости олигонуклеотидов в наборах SSR успешно выделила две группы – дикие/разводимые рыбы. Описанное может быть связана с активным искусственным отбором, направленным на важные для разведения в неволе признаки.

1) Fondon J. W., Garner H. R. // 2004, V. 101(52), P. 18058–18063.
2) K. T. Xie, G. Wang, A. C. Thompson et al. // Science. 2019. V. 363. P. 81–84. DOI: 10.1126/science.aan1425.
3) Nagpure N.S., Rashid I., Pati R. et al. // BMC Genomics. 2013, V. 14, P. 630. 4) Boron A., Spoz A., Porycka K. et al. // Comparative Cytogenetics. 2014, V. 8(3), P. 233–248.

РОЛЬ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ тРНК В РЕАКЦИЯХ ЦИКЛА ЭЛОНГАЦИИ

О.А. Толичева[1], Д.А. Трескова[1], Е.В. Полесскова[1,2], А.Л. Коневега[1,2,3]
[1]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

В биосинтезе белка транспортные РНК в аминоацилированной форме (аа-тРНК) обеспечивают корректный перевод последовательности триплетов мРНК в аминокислотную последовательность растущего полипептида. Важным этапом, предшествующим образованию пептидной связи, является аккомодация аа-тРНК, в результате которой заряженный аминокислотой акцепторный стебель тРНК релаксирует в пептидилтрансферазный центр рибосомы. Ряд посттранскрипционных модификаций нуклеотидов тРНК участвует в формировании её третичной структуры, предположительно обеспечивая правильные пространственные контакты между тРНК и рибосомой в ходе её движения внутри рибосомного комплекса. Целью данной работы является изучение влияния таких модификаций на этап аккомодации. Для этого точечные модификации вносятся в структуру

тРНК *in vitro* изолированными индивидуальными ферментами по разработанной нами процедуре. Единичные модификации в транскриптах тРНК являются инструментом как для непосредственного анализа вклада конкретной модификации в кинетику аккомодации, так и для направленного внесения флуоресцентных меток. Полученные флуоресцентномеченые нативные тРНК, а также частично модифицированные и полностью немодифицированные транскрипты тРНК использовались для анализа кинетики связывания в рибосомный А сайт в реконструированной системе in vitro трансляции из *Escherichia coli* методом остановленного потока.

Эксперименты по динамике взаимодействия тРНК с рибосомами частично поддержаны грантом РНФ 17-14-01416.

ТРАНСКРИПТОМИКА ИНСУЛЬТА. ВЗГЛЯД НА РЕГУЛЯЦИЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ИШЕМИИ МОЗГА В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МРНК, МИКРОРНК, ЦИКЛОРНК И ИХ ВОЗМОЖНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

И.Б. Филиппенков[1], В.В. Ставчанский[1], А.Е. Денисова[2,3], Л.В. Валиева[4], Л.В. Губский[2,3], С.А. Лимборская[1], Л.В. Дергунова[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ; [3]Федеральный центр цереброваскулярной патологии и инсульта МЗ РФ; [4]Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Ишемический инсульт головного мозга относится к числу самых тяжелых социально значимых заболеваний. Анализ транскриптома является перспективным подходом к изучению механизмов функционирования мозга как в норме, так и при ишемии. Помимо мРНК, направляющих синтез белка, изучение роли регуляторных РНК при ишемии имеет исключительное значение для разработки новых стратегий нейропротекции. Наибольший интерес представляют микроРНК и циклические РНК (циклоРНК). ЦиклоРНК имеют замкнутую структуру и преимущественную мозго-специфическую экспрессию. Они могут взаимодействовать с микроРНК, нивелировать их активность и тем самым препятствовать микроРНК-опосредованной репрессии мРНК. В последнее время становится очевидным, что анализ циклоРНК-микроРНК-мРНК взаимодействий является важной составляющей для детального изучения механизмов повреждения и регенерации при ишемии.

Использование моделей ишемии на основе малых лабораторных животных, наилучшим образом отражающих те или иные особенности развития ишемического процесса у человека, а также развитие методов высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-Seq) сделало возможным единовременное изучение экспрессии мРНК, микроРНК и циклоРНК при инсульте в масштабах всего генома. Проведенный нами RNA-Seq анализ подкорковых структур мозга крыс, содержащих очаг ишемического повреждения, выявил 1939 мРНК, 528 микроРНК и 395 циклоРНК, достоверно изменивших свою экспрессию (>1,5 раза, Padj<0,05) через 24 ч после транзиторной окклюзии средней мозговой артерии (tMCAO). Мы обнаружили активацию генов, кодирующих белки, участвующие в воспалительных и иммунных реакциях. Наряду с этим было показано массированное угнетение генов, обеспечивающих работу нейротрансмиттерных систем клетки. Мы выяснили, что многие гены, участвующие в работе нейромедиаторных сигнальных путей, кодируют дифференциально представленные циклоРНК. На основе полученных данных предсказаны сети циклоРНК-микроРНК-мРНК взаимодействий, связанные с регуляцией нейротрансмиссии.

Полученные результаты позволяют по-новому взглянуть на циклоРНК как на регуляторы систем нейротрансмиссии в клетках мозга крыс после ишемии-реперфузии на основе циклоРНК-микроРНК-мРНК взаимодействий. *Работа выполнена при частичной поддержке грантов РНФ (17-74-10189) и РФФИ (19-04-00397).*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ТРЕТЬЕГО ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ТРАНСЛЯЦИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ.

И.В. Чичерин[1,2], М.В. Балева[1], С.А. Левицкий[1], Э.Б. Дашинимаев[3,4], И.А. Крашенинников[1]
МГУ им. М.В.Ломоносова; [2]Институт функциональной геномики, МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН; [4]Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Митохондрии – важнейшие органеллы эукариотической клетки, обеспечивающие дыхание посредством работы электронтранспортной цепи. Экспрессия генов в митохондриях организована по образцу бактериальных систем, однако между ними существует множество эволюционных различий. Одним из них является организация процесса инициации трансляции. Синтез белка в митохондриях организован по классической схеме, изученной у бактерий, и включает в себя несколько универсальных этапов, таких как инициация, элонгация, терминация и рециклинг. При этом, некоторые значительные различия в компонентах системы позволяют выделить митохондриальную трансляцию в отдельную группу. Особенно впечатляющие различия можно найти на этапе инициации трансляции. Хорошо известно, что данный процесс управляется тремя каноническими факторами: IF1, IF2 и IF3. Однако, митохондрии млекопитающих располагают только двумя из них, а именно mtIF2 (выполняет роль IF1 и IF2) и mtIF3. Данный проект посвящен анализу молекулярных эффектов делеции гена MTIF3 в клетках человека. В ходе нашей работы мы получили линии клеток человека с данной делецией в геноме и изучили ее фенотипические проявления.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКВОЗНОГО ЧТЕНИЯ СТОП КОДОНОВ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ ТРАНСЛЯЦИИ

Е.Ю. Шувалова[1], А.В. Шувалов[1], Т.В. Егорова[1], И.М. Теренин[2], Е.З. Алкалаева[1]
[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Биосинтез белка на мРНК может прерываться с появлением преждевременного терминирующего кодона (ПТК) в открытой рамке считывания. Известно, что около 10% всех наследственных заболеваний вызваны такими нонсенс мутациями, так как они приводят к образованию нефункционального укороченного полипептида. Кроме того, многие приобретенные изменения в ДНК при раке также являются нонсенс мутациями. Однако, в некоторых случаях рибосома проходит через ПТК, считывая

его как смысловой кодон (т.е. кодирующий аминокислоту), в результате чего синтезируется полноразмерный функциональный белок. Поэтому современные терапевтические подходы при заболеваниях, связанных с возникновением ПТК, нацелены на усиление их сквозного чтения. Мы разработали метод, позволяющий оценить эффективность сквозного чтения стоп кодонов в бесклеточной системе трансляции на основе S30 лизата из клеток асцитной карциномы мышей Krebs-2. В качестве матриц использовали мРНК, кодирующую светлячковую люциферазу с кэппированным 5' концом и полиаделинированным 3' концом. Сравнение скоростей трансляции белка с мРНК, несущей последовательность люциферазы дикого типа, и мРНК, несущей такую же последовательность с ПТК в кодирующей части, позволяет определить процент сквозного чтения ПТК. Такая система позволяет добавлять различные компоненты, стимулирующие или ингибирующие сквозное чтение ПТК, которые потенциально могут быть использованы для терапии заболеваний, вызванных нонсенс мутациями. Так, например, нами было протестировано влияние белков, связывающих PABP (PAIP1/2) на сквозное чтение стоп кодонов и описан молекулярный механизм их участия в терминации трансляции человека.

Данная работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-14-00349.

БЕЛКИ КОМПЛЕКСА ORC ВЗАИМОДЕЙСТВУЮТ С мРНП ГИСТОНОВ, ORC5 УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ДЕГРАДАЦИИ мРНК ГИСТОНОВ

М.М. Куршакова, Д.В. Копытова
Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

В последнее время было показано, что белки ORC комплекса взаимодействуют с различными мРНК. Ранее нами было продемонстрировано, что белки ORC *Dr. melanogaster* взаимодействуют с комплексом TREX-2, регулирующим экспорт мРНК из ядра, ассоциированы с мРНП частицей и участвуют в организации экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Было показано, что субъединицы ORC ассоциированы с мРНК генов гистонов и входят в состав мРНП частицы гистона H3. мРНК гистонов содержат уникальную структуру на 3'-конце, шпильку, с которой связываются белки, регулирующие специфические для мРНК гистонов процессинг и деградацию мРНК. При помощи совместного иммуноокрашивания антителами против Orc5 и FISH *in situ* гибридизации с пробой к последовательности гистона H3 показано, что Orc5 присутствует в HLB тельцах (histone locus body), характеризующихся высокой концентрацией факторов процессинга. Было определено, что субъединицы ORC комплекса связываются с мРНК гистона H3 в области, расположенной выше шпильки. Уменьшение уровня экспрессии белков Orc3 и Orc5 в результате РНК-интерференции привело к уменьшению уровня мРНК генов гистонов в тотальных экстрактах S2 клеток *Dr. melanogaster*. Известно, что регуляция уровней мРНК гистонов в клетках осуществляется в значительной степени за счет деградации мРНК в конце S фазы клеточного цикла. Обработка клеток ингибиторами репликации, в частности, гидроксимочевиной, также вызывает деградацию мРНК гистонов. Уменьшение уровня экспрессии белка Orc5 в результате РНК-интерференции привело к снижению эффективности деградации мРНК гистонов, вызванной обработкой гидроксимочевиной. В экспериментах по соосаждению РНК антителами к субъединицам ORC обнаружено, что при активации деградации мРНК гистонов Orc5 рекрутируется на мРНК. Можно предположить, что Orc5 участвует в регуляции деградации мРНК гистонов. *Работы выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-04-00861.*

КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ» ПОВРЕЖДЕННОЙ ДНК, ОПОСРЕДОВАННАЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА FUS С ПОЛИ(ADP-РИБОЗОЙ)

А.Ш. Сингатулина[1], М.В. Суханова[1], Л. Хамон[2], А.Бош[2], 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

Поли(ADP-рибозил)ирование белков является одним из самых быстрых клеточных ответов на повреждение ДНК. Поли(ADP-рибозо) полимераза 1 (PARP1) является одним из наиболее распространённых представителем семейства PARPs. 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 полимера осуществляется за счет ферментативной активности поли(АДФ-рибоза)гликогидролазы (PARG). Относительно недавно был идентифицирован ряд мРНК-связывающих белков, которые колокализуются с PARP1 на сайтах повреждения ДНК. Белок FUS (fused in sarcoma) является одним из таких белков, которые наряду с белками репарации привлекается к сайтам повреждения ДНК при активации PARP1 и синтезе PAR полимера. В связи с этим возникает вопрос о возможной функции FUS в репарационном процессе. Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) было исследовано взаимодействие FUS с PAR полимером, синтезируемым PARP1 в районе сайта повреждения ДНК. Для исследования образования комплексов FUS с PAR на уровне отдельных молекул методом АСМ мы использовали реконструированную систему, содержащую, поврежденную и неповрежденную ДНК, мРНК, PAR полимер и белки (PARP1, PARG, FUS и его делеционные мутанты). Мы обнаружили, что FUS привлекается к сайтам повреждения ДНК посредством его связывания с PAR при активации PARP1, что индуцирует формирование мультимолекулярных комплексов, содержащих поврежденную ДНК. Было установлено, что неструктурированный домен (LCD) и РНК-связывающие домены (RGG) белка FUS играют ключевую роль в образовании мультимолекулярных комплексов и «компартментализации» поврежденной ДНК. Кроме того, было продемонстрированно, что PARG-зависимый гидролиз PAR приводит к разрушению этих комплексов и способствует высвобождению FUS. Мы предполагаем, что FUS стимулирует репарационный процесс, индуцируя временную «компартментализацию» повреждённой ДНК и «концентрирование» сайтов повреждения. *Работа выполнена в рамках проекта РФФИ (18-04-00882).*

КОАКТИВАТОРНЫЙ КОМПЛЕКС SAGA УЧАСТВУЕТ В ТРАНСКРИПЦИИ мяРНК

Д.В. Копытова, М.М. Куршакова, Ю.Н. Николенко, Е.Н. Набирочкина, С.Г. Георгиева
Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Аппарат общей транскрипции генов мяРНК был тщательно изучен. Однако роль коактиваторов в этом процессе оставалась неясной. Мы показали, что комплекс SAGA дрозофилы взаимодействует с комплексом SNAP (PBP), ключевым компонентом аппарата транскрипции генов мяРНК, и присутствует в промоторных областях генов мяРНК, транскрибируемых как РНК-полимеразой II, так и РНК-полимеразой III (U6 мРНК). Мы также показали, что SAGA комплекс взаимодействует с транскрипционным фактором Brf1, входящим в состав транскрипционного аппарата РНК-полимеразы III и присутствующим в промоторах генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III. Мутации, инактивирующие несколько генов SAGA-субъединиц, приводили к снижению уровня содержания мяРНК у взрослых мух. Транскрипция генов мяРНК, транскрибируемых как РНК-полимеразой II, так и РНК-полимеразой III уменьшалась во всех линиях мутаций субъединиц SAGA: как субъединиц деубиквитиназного модуля, так и ацетилтрансферазного модуля SAGA. Данные результаты указывают на то, что весь комплекс SAGA необходим для транскрипции генов мяРНК, SAGA является коактиватором их транскрипции и, как следствие, участвует в поддержании клеточного гомеостаза. *Работа выполнена при поддержке гранта «Российский фонд фундаментальных исследований» №18-04-00514 А.*

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ
Пленарная сессия 2 октября, 8:00 – 10:00

CHALLENGES OF THE HUMAN PROTEOME PROJECT: 10-YEAR EXPERIENCE OF THE RUSSIAN CONSORTIUM

Alexander I. Archakov[1*], Ekaterina V. Ilgisonis[1], Yuri D. Ivanov[1], Andrey V. Lisitsa[1], Elena A. Ponomarenko[1], Victor G. Zgoda[1]
V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

Thanks to the tremendous effort of the Chromosome-centric Human Proteome Project (C-HPP), various forms of individual proteins have been characterized. However, 11% of proteome are still “missing” as well as different proteoforms of the same gene, arising from alternative splicing or other molecular events. Variety of proteoforms with different amino acid sequences and different statuses of post-translational modifications dramatically expands human proteome complexity. This research collects all the efforts of Russian Consortium in the course of the C-HPP, revealed bottlenecks of technologies and ways of their overcoming.

The improved analytical sensitivity of proteomic technologies and the combined results from transcriptomic and proteomic analyses of a single sample has already facilitated the study of proteoforms. To increase proteome coverage, a combination of shotgun technology and selected reaction monitoring with two-dimensional alkaline fractionation has been recently developed. To detect proteoforms that cannot be identified by such technologies, nanotechnologies such as combined atomic force microscopy with molecular fishing and/or nanowire detection may be useful. Both technologies provide a powerful tool for single molecule analysis, by analogy with nanopore sequencing during genome analysis. Such integrative approach could be fruitful for detection of the “missing” proteins in the frameworks of the C-HPP.

60+ ЛЕТ САМООРГАНИЗАЦИИ СТРУКТУР БЕЛКОВ

А.В. Финкельштейн[1], С.А. Гарбузинский[1], Н.С. Богатырева[1,2,3], Д.Н. Иванков[3,4,5]
[1]Институт белка РАН, Пущино, Россия; [2]Программа по биоинформатике и геномике, Центр геномной регуляции (CRG), Барселона, Испания; [3]Университет Помпео Фабра (UPF), Барселона, Испания; [4]Институт науки и технологии, Клостернейбург, Австрия; [5] Сколтех, Москва, Россия

Самоорганизация белка – физический процесс, при котором белковая цепь «сама собой» приобретает свою нативную (биологически-функциональную) трехмерную структуру. Таинственная способность белковых цепей, исходно неупорядоченных, самопроизвольно и быстро складываться в свою уникальную глобулярную пространственную структуру долго служила увлекательной головоломкой для тех, кто занимался молекулярной биологией.

В этом докладе мы опишем физическую теорию, используемую для получения базовой оценки времени самопроизвольной самоорганизации глобулярных белков, определяемого преодолением свободно-энергетического барьера, разделяющего неупорядоченные и нативно-свернутые состояния белковых цепей, и использование биоинформатики для уточнения полученной базовой оценки. *Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда.*

ГОВОРЯТ ЛИ МЕМБРАНЫ БЕЛКАМ, КАК ПРАВИЛЬНО СВЕРНУТЬСЯ? ЛИПОШАПЕРОНЫ И БЕЛКИ-ПЕРЕВЕРТЫШИ, КУВЫРКАЮЩИЕСЯ (“FLIP-FLOPPING”) В МЕМБРАНАХ

Михаил Богданов
[1]Кафедра биохимии и молекулярной биологии, Научно-медицинский центр Техасского университета в Хьюстоне, Медицинская школа МакГоверна, Хьюстон, Техас, США; [2]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Мембранные белки, в соответствии со своей структурой и своим гетерогенным липидным окружением, должны следовать особым правилам фолдинга и топогенеза. Если это действительно так, то какие именно химические и физические свойства липидного бислоя являются необходимыми для фолдинга мембранных белков *in vivo*? Существует ли «конформационная белковая память»? Должны ли молекулярные шапероны быть исключительно белками? Действительно ли липидный бислой является зоной, в которой невозможно переворачивание интегральных мембранных белков? Применение метода рентгеновской кристаллографии недоступно для определения динамической организации мембранных белков. Поэтому мы разработали и применили новые методы (манипуляции с эндогенными и «чужеродными» «липидными» генами, систему сопряжённого бесклеточного синтеза белка и липидного биосинтеза, технику Eastern-Western блоттинга и флипосом). Это привело к открытию новых функций фосфолипидов, действующих как молекулярные шапероны (липошапероны) обратимо взаимодействующие со своими белковыми субстратами во время или после встраивания в мембрану и регулирующие фолдинг путём программирования «конформационной белковой памяти». Применение Substituted Cysteine Accessibility Method (SCAMTM) впервые позволило установить, что топология интегральных мембранных белков может быть обратимо изменена просто путём изменения липидного состава мембраны in vivo и in vitro в соответствии с недавно сформулированным нами Правилом Баланса Зарядов. В соответствии с этим Правилом характер заряда внемембранных доменов и общий заряд поверхности мембраны совместно определяют ориентацию и реориентацию трансмембранного домена белка. Для этого не требуется никаких других белков, оно определяется исключительно составом окружающих его липидов. Новый биологический механизм для генерации функциональной и структурной конформационной гетерогенности белка позволит установить молекулярную основу наследуемых нарушений фолдинга мембранных белков, а также изменений иммуногенности раковых клеток. *Работа выполнена за счёт средств NIH, NATO, фонда Marie Skłodowska-Curie и субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.*

МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ: МЕТОДЫ, СТРУКТУРА, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ПРИМЕНЕНИЯ

Valentin Gordeliy[1,2]
[1]Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, Université Grenoble Alpes-CEA-CNRS, Grenoble, France; [2]Institute of Complex Systems (ICS), ICS-6: Structural Biochemistry, Research Centre Juelich, Germany

Мембранные белки – ключевые молекулы клеток. Их биомедицинская важность делает их идеальными мишенями для лекарств. Не случайно более 60% имеющихся на рынке лекарств имет своими мишенями мембранные белки. Многие специфические дефекты этих беков ассоциированы с различными тяжелыми заболеваниями. Несмотря на важность мембранных белков их трудно исследовать. Особенно трудными являются структурные исследования.

В настоящей презентации будет показано современное состояние и проблемы в настоящей области.

Одним из основных объектов презентации будут родопсины. Будет показано, что в течение многих лет эти белки были драйверами исследований мембранных белков и развития соответсвующих методов. Будет также показано? насколько драматической является история исследований этих белков: от взлета после открытия бактериородопсина, первого такого белка, до угасания в конце XX века и затем нового фантастического взлета в начале 2000х, взлета глобальной значимости.

[1] Gordeliy V., Labahn J., Moukhametzianov R., Efremov R, Granzin J., Schlesinger R., Bueldt G.,Savopol T., Scheidig A.J., Klare J. and M. Engelhard. Molecular basis of transmembrane signaling by sensory rhodopsin II– transducer complex. Nature (2002) 419, 484-487.
[2] Moukhametzianov R.E., Klare J.P., Efremov R.G., Baeken C., Göppner A., Labahn J., Engelhard M. ,Büldt G. and V. Gordeliy. Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the related transducer. Nature (2006) 440, 115-119.
[3] Gushchin I., Melnikov P., Polovinkin V., Ishchenko A., Yuzhakova A., Buslaev P., Bourenkov G., Grudinin S., Round E., Balandin T, Borshchevskiy V., Leonard,, Wilbold D., G., Büldt G., Popov A. and V. Gordeliy. Mechanism of transmembrane signaling by sensor histidine kinases. Science (2017) 356(6342):eaah6345
[4] Gushchin, I., Chervakov, P., Kuzmichev, P., Popov, A. N., Round, E., Borshchevskiy, V., Ishchenko, A., Petrovskaya, L., Chupin, V., Dolgikh, D. A., Arseniev, A. S., Arseniev, A. A., Kirpichnikov, M. and V. Gordeliy. Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. (2013) 110(31),12631-6
[5] Gushchin I. , Schevchenko V. , Polovinkin V. , Kovalev K., Alekseev A., Round E., Borshchevskiy V., Balandin T., Popov A., Gensch T., Fahlke C., Bamann K., Willbold D., Büldt G., Bamberg E. and V. Gordeliy Crystal structure of a light-driven sodium pump Nature Structural and Molecular Biology (2015) doi:10.1038/nsmb.3002
[6] I. Melnikov, V. Polovinkin, K. Kovalev, I. Gushchin, M. Shevtsov, V. Shevchenko, A. Mishin, A. Alekseev, F. Rodriguez-Valera, V. Borshchevskiy, V. Cherezov, G.A. Leonard, V. Gordeliy and A. Popov. Fast iodide-SAD phasing for high-throughput membrane protein structure determination Science Advances (2017) 3(5):e160295
[7] Shevchenko V., Mager T., Kovalev K., Polovinkin V., Alekseev A., Juettner J., Chizhov I., Bamann C., Vavourakis C., Ghai R., GushchinI., Borshchevskiy V., Rogachev A., Melnikov I., Popov A., Balandin T.,Rodriguez-Valera F., Manstein D.J., Bueldt G.,Bamberg E. and V. Gordeliy. Inward H+ pump xenorhodopsin: mechanism and alternative optogenetic approach. Science Advances (2017) 3, e1603187
[8] Kovalev K., Polovinkin V., Gushchin I., Alekseev A., Shevchenko V., Borshchevskiy V., Astashkin R., Balandin T., Bratanov D., Vaganova S., Rhyzhikov Yu, Kuklin K., Popov A., Chupin V., Büldt G., Bamberg E. and V. Gordeliy. Structure and Mechanisms of Sodium Pumping State of KR2 Rhodopsin. Science Advances (2019) 5, eaav2671.

УЛЬТРАВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ СКРИНИНГ И РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН В СОЗДАНИИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

И.В. Смирнов[1,2], С.С. Терехов[1,2], Ю.А. Мокрушина[1,2], А.О. Залевский[1,2], А.С. Злобин[1,2], А.В. Головин[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; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова", Москва, Россия

В настоящее время рост числа инфекционных штаммов микроорганизмов, обладающих множественной резистентностью, является серьёзной проблемой современной медицины. Решение этой проблемы требует создания новых методов и подходов для поиска новых лекарственных препаратов. Для достижения этой цели нами были разработаны инновационные микрофлюидные технологии и методы синтетической биологии для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антибиотической активности на уровне единичных живых клеток, а также широкомасштабного профилирования спектра активности для оценки эффективности и направленности воздействия препарата, в том числе и на такие сложные системы как клеточные сообщества микроорганизмов. Было показано, что данная методология может быть использована для направленной эволюции ферментов, поиска новых антибиотиков, а также выявления профиля активности препаратов и изучения резистома. Универсальность разработанных технологий позволяет расширить потенциальные области их применения для решения скрининговых задач современной биотехнологии, синтетической биологии, микробиологии и онкологии. Абсолютно инновационной является наша идея использовать микробиоту диких животных для поиска новых антибактериальных средств. В результате, используя такой экзотический источник микробиоты, как ротовая полость Сибирского бурого медведя, была отобрана уникальная популяция бактерий *Bacillus pumilus*, высокоэффективно ингибирующих рост патогенных бактерий *Staphylococcus aureus*. Использование сочетания высокопроизводительного секвенирования, геномного майнинга, протеомики и метаболомики позволило идентифицировать новый генетический кластер биосинтеза антибиотика амикумацина А, а также определить молекулярный механизм его активации в процессе биосинтеза и механизм, обуславливающий резистентность бактерий рода *Bacillus* к нему. Таким образом, комбинация методов ультравысокопроизводительного скрининга и подходов рационального дизайна в том числе и на основе биоинформатических расчетов открывает широкие перспективы в создании новых лекарственных средств. *Работа выполнена в рамках проекта гранта РФФИ-мк 18-29-08054.*

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ
Поиск, выделение и синтез новых природных пептидов и белков
Устные доклады

THE FIRST FIXA ANTAGONIST OF A SERINE PROTEASE STRUCTURE OFFERS A NEW PERSPECTIVE IN VENOUS THROMBOEMBOLISM THERAPY

Igor Križaj
Department of Molecular and Biomedical Sciences, Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia

Venous thromboembolism (VTE) is the pathological process behind two very serious cardiovascular diseases (CVD), deep vein thrombosis and pulmonary embolism. VTE is the third leading cause of CVD-related mortality, also because no adequate therapy is available. Consequently, there is an enormous need for new anticoagulants to cure VTE, which would not impose high risk of bleeding on patients. Components of the intrinsic blood coagulation pathway, among them factor VIIIa (FVIIIa), have been recognized as the most suitable therapeutic targets to treat VTE. Recently, we described a glycoprotein from the nose-horned viper (*Vipera a. ammodytes*; *Vaa*) venom, *Vaa*SPH-1, structurally a serine protease but without an enzymatic activity, which expresses a potent anticoagulant action in human blood [1]. We demonstrated that its major target in the blood coagulation system is FVIIIa. *Vaa*SPH-1 antagonizes the binding of FIXa to FVIIIa so preventing the formation of the intrinsic tenase complex. Anticoagulants with such characteristics are intensively sought as they would be much safer for medical application than contemporary drugs, which frequently induce excessive bleeding and other complications. In this lecture, our journey towards original *Vaa*SPH-1-based new generation of anticoagulants to attenuate thrombus formation and propagation without increasing the risk of bleeding will be described.

[1] Latinović, Z., Leonardi, A., Kovačič, L., Koh, C.Y., Šribar, J., Trampuš Bakija, A., Venkateswarlu D., Kini, R.M. and Križaj, I. (2018): The first intrinsic tenase complex inhibitor with serine protease structure offers a new perspective in anticoagulant therapy. *Thrombosis and Haemostasis* 118, 1713–1728.

НОВЫЕ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ ЛИГАНДЫ ИЗ ЯДОВ ЗМЕЙ

Ю.Н. Уткин[1,2], Е.А. Вульфиус[3], И.Е. Кашеверов[1], Е.В. Крюкова[1], А.В. Осипов[1], В.Г. Старков[1], Р.Х. Зиганшин[1], В.И. Цетлин[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; [3]Институт биофизики клетки РАН, Москва, Россия

Яды животных, и змей, в частности, являются источником соединений, используемых в качестве инструментов исследований и основы для создания новых лекарственных препаратов. В результате поиска таких соединений в ядах змей нами были обнаружены новые пептидные и белковые нейротоксины. Некоторые из этих соединений являются структурными аналогами трех-петельных токсинов, другие принадлежат к иным семействам змеиных токсинов, или же представляют собой совершенно новые соединения. При поиске новых лигандов никотиновых холинорецепторов (нХР) в яде крайта *Bungarus candidus*, мы обнаружили новый тип трех-петельных токсинов, названных αδ-бунгаротоксинами (αδ-Бгт). Эти токсины содержат 73 аминокислотных остатка и 5 дисульфидных мостиков и являются гомологами α-бунгаротоксина (α-Бгт), классического блокатора нХР мышечного и нейрональных α7, α8 и α9α10 типов. αδ-Бгт, аналогично α-Бгт, обладают высоким сродством к нХР α7 и мышечного типа. Однако основное отличие αδ-Бгт от α-Бгт заключается в том, что αδ-Бгт различают два сайта связывания в рецепторах мышечного типа, демонстрируя более высокое сродство к сайту, образованному субъединицами α и δ по сравнению с сайтами α-ε или α-γ. Нами также установлено, что фосфолипазы А2 (Фла) из ядов змей в дополнение к своим многочисленным функциям способны ингибировать нХР различных типов. Поскольку нХР вовлечены в постсинаптические и пресинаптические эффекты, мы исследовали также Фла, обладающие сильным пресинаптическим действием, а именно β-бунгаротоксин из B. multicinctus и кротоксин из *Crotalus durissus terrificus*. Было обнаружено, что β-бунгаротоксин блокировал токи, опосредованные нХР в нейронах Lymnaea, а кротоксин конкурировал с радиоактивным α-Бгт за связывание с нХР Torpedo и α7 человека. Интересно, что Фла поджелудочной железы также обладала способностью блокировать различные подтипы нХР. Эти и наши более ранние результаты свидетельствуют о том, что такое взаимодействие может быть общим свойством всех Фла. Таким образом, даже очень хорошо изученные змеиные токсины могут демонстрировать новые неожиданные свойства, а изученные яды могут содержать токсины с новыми свойствами.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 18-04-01075 и 18-54-00031.

ПЕПТИДНЫЕ И БЕЛКОВЫЕ ТОКСИНЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИДОСЕЛЕКТИВНОСТИ НИКОТИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ

И.Е. Кашеверов[1], Д.С. Кудрявцев[1], Д. Ю[2], С. Жу[2], Д. Жангсун[2], С. Луо[2], В.И. Цетлин[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [2]Университет Хайнаня, Хайкоу, КНР

Одними из лучших инструментов в исследовании никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР) до сих пор остаются пептидные и белковые нейротоксины. Например, с непосредственным использованием пептидных α-конотоксинов из яда морских моллюсков Conus детально охарактеризованы лиганд-связывающие участки многочисленных подтипов этих рецепторов и во-многом выяснен механизм их функционирования при связывании агонистов и конкурентных антагонистов. В данном исследовании серия конотоксинов была использована для решения еще одной проблемы – существования видоселективности для некоторых подтипов нАХР. Наиболее важную роль в этом исследовании сыграли два аналога конотоксинов - [K11A]TxIB

и [H5D]RegIIA, которые обладают существенным различием в сродстве к α7 подтипу рецептора мыши и человека. Для выявления ключевых аминокислотных остатков (а.о.), ответственных за это различие, мы в содружестве с китайскими коллегами экспрессировали в ооцитах Xenopus набор мутантных рецепторов α7 нАХР крысы с заменами всех десяти а.о. в лиганд-связывающем домене, отличающихся от таковых у рецептора человека. Проверка активности полученных мутантов показала, что только K185R мутация снижала сродство к α-конотоксинам [K11A]TxIB и [H5D]RegIIA (и в меньшей степени к другим пептидным и белковым нейротоксинам) до уровня их сродства к рецептору человека. С другой стороны, обратная мутация R185K в α7 нАХР человека приводила к существенному увеличению сродства, а двойная мутация [S183N, R185K] к полному восстановлению «аффинности» крысиного рецептора. Проведенное нами молекулярное моделирование дало возможное объяснение высокой видовой селективности [K11A]TxIB и [H5D]RegIIA по отношению к α7 нАХР, открыв новый путь для разработки их аналогов с улучшенным сродством к рецептору человека.

ПОЛИАРГИНИНЫ КАК НОВЫЙ КЛАСС ИНГИБИТОРОВ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Е.В. Крюкова, Д.С. Лебедев, И.А. Иванов, Н.В. Егорова, Д.С. Кудрявцев, И.Е. Кашеверов, В.И. Цетлин
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) принимают участие в нервно-мышечной передаче, в нейропатическом болевом синдроме, в модулировании секреции нейромедиаторов (глутамата, дофамина, серотонина и др.). Многие пептидные лиганды нАХР содержат в своем составе большое количество положительно заряженных аминокислотных остатков. К ним относятся блокатор мышечных нАХР линейный пептид аземиопсин из яда бирманской гадюки Azemiops feae, а также α-бунгаротоксин и конотоксины RgIA и GeXIVA. Последние содержат 4 и 9 остатков аргинина, соответственно, причем GeXIVA включает в себя последовательность из четырех остатков аргинина. Целью настоящей работы явилась проверка активности пептидов состоящих только из аминокислотных остатков аргинина, в отношении различных типов нАХР. Методом твердофазного пептидного синтеза были получены полиаргининовые пептиды R3, R6, R8 и R16 и содержащие триптофан WR2 и W2R4. С помощью конкурентного радиолигандного анализа с использованием 125I-α-бунгаротоксина определены параметры связывания пептидов с нАХР мышечного и α7 нейронального типов, а также с экстрацеллюлярным доменом α9 нАХР (α9 LBD). Трипептиды R3 и WR2 не проявили активности до концентрации 40μM. Гекса-пептиды конкурировали с бунгаротоксином за связывание с мышечным нАХР и α9 LBD с микромолярной аффинностью и более длинные пептиды – R8 и R16 с низкой микромолярной и наномолярной. Функциональная активность синтезированных компонентов оценивалась электрофизиологически методом двух-электродной фиксации потенциала на ооцитах и с помощью кальциевого имиджинга на клетках линии Neuro2a экспрессирующих α7 нАХР. Все пептиды проявили ингибирующее действие на исследуемые рецепторы. Наиболее эффективное ингибирование нАХР мышечного типа было обнаружено для R8 и R16 (IC50 7,4 и 0,33 μM) и нейронального α9α10 (IC50 75 и 120 нМ, соответственно). Особая активность как негативного аллостерического модулятора α7 нАХР была обнаружена для пептида W2R4. Показано, что пептиды обладают значительно большей аффинностью по отношению к мышечному и нейрональному α9, чем к α7 нАХР. Таким образом, полиаргининовые пептиды представляют собой новый класс лигандов и модуляторов нАХР, а их специфичность и сродство к рецепторам растет с увеличением длины цепи.

ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ ЛИГАНДОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ИОННЫХ КАНАЛОВ ASIC

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

Кислоточувствительные ионные каналы, которые в английской аббревиатуре принято называть ASIC, несмотря на их давнее открытие в 1980 году, до сих пор охарактеризованы фармакологически не столь полно, как другие ионотропные рецепторы. Это связано прежде всего с тем, что долгие годы непосредственными активаторами этих каналов считалась кислота, вернее быстрое падение значения pH во внеклеточном пространстве. И хотя в классификации каналов рецепторы отнесены к классу лиганд-управляемых ионных каналов, по сути взаимодействие рецептора с кислотой не позволяет точно определить сайт связывания лиганда. Работы по рентгеноструктурному анализу позволили вычленить в структуре канала область «кислотного кармана», где располагаются многочисленные остатки кислот, способные протонироваться при закислении. Обнаружено достаточное количество модуляторов, способных ингибировать и потенцировать ответ ASIC на кислотный стимул. Эти молекулы сдвигают кривые активации протонов в ту или иную сторону, что приводит к наблюдаемому эффекту. Проводя эксперименты на гетерологически экспрессированных каналах мы смогли идентифицировать в природных источниках экзогенные модуляторы ASIC. В дальнейшем анализ структурной гомологии позволил нам предсказать активность некоторых эндогенных молекул. Эндогенные молекулы оказывали порой совершенно противоположное действие на изучаемые каналы и имели более высокие действующие константы. Некоторые эндогенные лиганды способны активировать ASIC при физиологических значениях pH, но не так эффективно, как протоны, поэтому их можно рассматривать как частичные агонисты. Воздействие на различные фармакологические характеристики ASIC было изучено для эндогенных и экзогенных лигандов на ооцитах лягушки. Как итог, было сделано предположение о важной модулирующей роли некоторых лигандов и возможной вовлеченности определенных модуляторов в процессы передачи сигнала через ASIC содержащие нейроны.

Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ No 18-14-00138.

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ И ПОИСК ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ ПЕПТИДОВ КУНИТЦ-ТИПА МОРСКИХ АНЕМОН

Е.В. Лейченко[1,2], А.Н. Кветкина[1], И.Н. Гладких[1], О.В. Синцова[1], В.Е. Чаусова[1], Е.А. Зелепуга[1], М.М. Монастырная[1], М.П. Исаева[1], Э.П. Козловская[1]
[1]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; [2]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Хроническое воспаление лежит в основе многих серьезных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, артрит, панкреатит, рак и многих других. Известно, что для лечения и предупреждения процессов воспаления используют соединения, способные подавлять активность протеаз и медиаторов воспаления, индуцирующих развитие воспалительных процессов, или ингибировать вовлеченные в них ионные каналы и рецепторы. Морские анемоны, ядовитые кишечнополостные животные, продуцируют большой репертуар биологически активных пептидов, включая ингибиторы протеаз Кунитц-типа. Установлено, что эти пептиды кодируются мультигенными семействами и образуют природные комбинаторные библиотеки. Недавно нами было найдено новое уникальное подсемейство IQ-пептидов. Отличительной особенностью их предшественников является наличие короткого пропептида, который оканчивается сайтом Lys-Arg, характерным для нейро- и цитотоксинов, но отсутствующим в предшественниках пептидов других подсемейств Кунитц-типа морских анемон Heteractis crispa и Heteractis magnifica, что может указывать на рекрутирование этих пептидов в яд в ходе эволюционных событий. Основной мишенью пептидов Кунитц-типа являются сериновые протеазы: все исследуемые нами пептиды ингибируют трипсин и химотрипсин, некоторые взаимодействуют с протеазами воспаления и протеазами каскада коагуляции. Кроме того, нами найдены пептиды, которые способны блокировать потенциал-зависимые калиевые каналы, а также взаимодействовать с TRPV1 и TRPA1 рецепторами. Исследована биологическая активность более чем 20 пептидов Кунитц-типа на различных моделях. Показано, что некоторые пептиды ингибируют действие гистамина на макрофаги костного мозга мыши, снижают уровень активных форм кислорода, оксида азота II и цитокинов (проИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α), продуцируемых в макрофагах при добавлении бактериального ЛПС. Кроме того, некоторые пептиды повышают жизнеспособность клеток нейробластомы Neuro2a в присутствии бета-амилоида (модель болезни Альцгеймера) и в модели 6-OHDA-индуцированной нейротоксичности (модель болезни Паркинсона). *Изучение взаимодействия пептидов с TRPV1 рецептором поддержано грантом РНФ № 19-74-20088.*

АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ МОРСКИХ АНЕМОН, ДЕЙСТВУЮЩИЕ НА TRPA1 КАНАЛ

Я.А. Андреев[1,2], Ю.А. Логашина[1,2]
[1]Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

Канал 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, TRPA1 канал является потенциальной мишенью для новых противовоспалительных и обезболивающих препаратов.

Из экстрактов морских анемон были выделены два структурно непохожих друг на друга пептида, но имеющие схожий механизм действия. Оба пептида усиливают активацию TRPA1 канала при действии прямых агонистов, таких как AITC и диклофенак, в тестах *in vitro*. В различных тестах *in vivo* на мышах введение пептидов в дозах 0,10,3 мг/кг имеет значительный анальгетический и противовоспалительный эффекты, при этом сами пептиды не вызывают ни болевые ощущения, ни тепловую гиперчувствительности. Селективный антагонист TRPA1, A-967079, полностью блокирует эффекты у мышей в модели воспаления. Следовательно, активация TRPA1 является обязательным условием анальгетического эффекта пептидов. Наиболее вероятно, обезболивающие и противовоспалительные эффекты пептидов связаны с тем, что, потенцируя активацию TRPA1, пептиды тем самым способствуют уменьшению чувствительности (десенситизации) TRPA1-экспрессирующих нейронов на другие эндогенные раздражители, такие как, например, медиаторы воспаления.

Полученные пептиды обладают значительными анальгетическими и противовоспалительными свойствами и могут быть основой для создания новых лекарственных препаратов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00167).

ПУРОТОКСИН ПАУКА *THOMISUS ONUSTUS* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ АНАЛЬГЕТИК НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

П.Б. Опарин[1,2], К.Д. Надеждин[1], Ю.А. Паликова[3], В.А. Паликов[3], О.Н. Хохлова[3], И.А. Дьяченко[3], О.А. Крышталь[4], А.А. Василевский[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]ООО «Анальгетики будущего», Москва; [3]Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия; [4]Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

P2X3 является членом семейства пуринергических рецепторов, участвующих в распознавании внеклеточной АТФ, и в настоящее время считается одной из наиболее значимых молекулярных мишеней при болевых синдромах различного генеза. К сожалению, на сегодняшний день известно всего несколько селективных блокаторов P2X3, большинство из которых имеют значительные ограничения в качестве терапевтических агентов. Пуротоксины – небольшая группа нейротоксинов, обладающих структурой типа «цистинового узла», которые воздействуют на пуринергические рецепторы и, по-видимому, являются перспективными анальгетическими соединениями. В библиотеке кДНК из ядовитых желез паука-бокохода (*Thomisus onustus*) нами был обнаружена последовательность, кодирующая новый токсин, названный PT6, который гомологичен ранее описанному PT1, модулятору рецепторов P2X3. PT6 обладает более компактной в сравнении с PT1 структурой и содержит на одну

дисульфидную связь меньше. Мы синтезировали PT6 в бактериальной системе экспрессии и исследовали его пространственную структуру методами ЯМР-спектроскопии. Функциональные исследования показали, что PT6 эффективно блокирует токи через каналы P2X3, но не через каналы P2X2 или P2X2/3. Используя несколько животных моделей (ПАФ-индуцированная воспалительная боль, уксусные корчи, формалиновый тест и йодацетат-индуцированный остеоартрит), мы исследовали его анальгетические свойства. Во всех тестах PT6 имел выраженный анальгетический эффект, сопоставимый или превосходящий эффект классических НПВС и PT1. Чтобы определить влияние структуры пуротоксинов на их устойчивость к различным факторам, мы провели сравнительное исследование стабильности PT1 и PT6. Оба пуротоксина были крайне устойчивы к протеолизу, в плазме крови, при нагревании и в присутствии хаотропных агентов. Они также обладали значительной стабильностью в широком диапазоне pH, при этом более компактный PT6 был в меньшей степени подвержен деградации. *Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 17-74-1023). Работы с животными моделями выполнены в рамках исполнения Государственного контракта № 14.N08.11.0147 (программа «Фарма-2020»).*

ГАУЗЕМИЦИНЫ – ПЕРВЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ НОВОГО КЛАССА ЛИПОГЛИКОПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ

В.А. Алферова[1], А.П. Тюрин[1,2], М.В. Шувалов[1,3], Е.А. Рогожин[1,2], И.А. Прохоренко[1,2], А.С. Парамонов[2], О.А. Лапчинская[1], З.О. Шенкарев[2], В.А. Коршун[1,2]
[1]НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [3]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

При изучении штамма *Streptomyces* sp. INA Ac 5812 было обнаружено, что антибактериальная активность этого штамма связана со сложным антибиотическим комплексом, содержащим более 30 индивидуальных липогликопетидов [1], обладающих одинаковой флуоресценцией, обусловленной наличием редкой аминокислоты – 4-хлоркинуренина [2]. Выделены два индивидуальных липогликопептида, названные гауземицинами, проявляющие высокую антибактериальную активность. Эти соединения содержат ряд уникальных структурных мотивов (редкие аминокислоты 4-хлоркинуренин и фенилгомосерин, гликозилирование тирозина арабинозой). Пептидное ядро этих антибиотиков сильно отличается от известных природных липогликопептидов и в некоторой степени напоминает по строению семейство анионных кальций-зависимых липопептидов, однако не содержит консервативных структурных мотивов этого семейства. Антибактериальная активность гауземицинов находится на уровне наиболее коммерчески успешного липопептидного антибиотика даптомицина, и практически во всех случаях превосходит активность гликопептидного антибиотика резерва ванкомицина.

1. Lapchinskaya O.A., Katrukha G.S., Gladkikh E.G. et al. Russ. J. Bioorg. Chem. 2016, 42, 664–671.
2. Alferova V.A., Shuvalov M.V., Suchkova T.A. et al. Amino Acids 2018, 50, 1697–1705.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ВИРУСНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Л.В. Кордюкова[1], М.В. Серебрякова[1], М. Файт[2], Х. Нускова[3,4], А.А. Телеман[3,4]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [2]Институт вирусологии, Факультет ветеринарной медицины, Свободный Университет г. Берлин, Германия; [3]Центр исследования рака, Гейдельберг, Германия; [4]Университет г. Гейдельберг, Германия

Ковалентные липидные модификация мембранных и мембран-ассоциированных белков могут влиять на их топологию в мембране, локализацию в рафтовых доменах и играть регуляторную роль в сигнальных каскадах в клетке. Гетерогенность этих модификаций стало возможным детально исследовать только на базе привлечения методов масс-спектрометрии. Мы разработали ряд подходов MALDI-TOF MS анализа для детекции пост-трансляционного/ ко-трансляционного присоединения остатков жирных кислот разного типа у вирусных и клеточных белков. В докладе будут представлены данные о гетерогенности и предполагаемой структурной роли S-ацилирования остатками пальмитатов (C16:0) и стеаратов (C18:0) остатков цистеина, полученные нами для трансмембранных белков оболочечных вирусов, в частности, гемагглютинина (HA) вируса гриппа разных штаммов, выращенных в разных типах клеток. Будут рассмотрены примеры влияния мутаций в C-концевой области HA (в зоне холестерин-связывающих консенсусных последовательностей) на паттерн S-ацилирования, а также представлены первые данные по поиску ацилтрансфераз, переносящих остатки жирных кислот в клетке из конъюгатов с ацил-CoA на субстрат – HA вируса гриппа, полученные после нокаутирования кандидатных ферментов. Другой пример модифицированного белка, изученного нами с помощью MALDI-TOF MS – рекомбинантный клеточный белок GNAI3-GFP (G protein subunit alpha i3, конъюгированный с зеленым флуоресцентным белком). Обнаружено, что помимо модификации N-концевого остатка Gly2 остатком миристата (C14:0), остаток Cys3 конкурентно связывает либо пальмитат, либо олеат (C 18:1). MS-анализ белка GNAI3-GFP, выделенного из клеток, выращенных на среде с «тяжелым» стеаратом 13C18:0, показал, что в клетке стеарат до или (наиболее вероятно) после присоединения к белку превращается в олеат. Совокупные данные позволили выдвинуть гипотезу о механизме противоопухолевого действия экзогенного стеарата, обнаруженного ранее. В то время как модифицированный пальмитатом GNAI3 локализован в липидных рафтах, модифицированный олеатом белок выходит из этих доменов, прерывая таким образом Akt (protein kinase B) – зависимый каскад пролиферации. *Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 18-54-00019 и БРРФИ № B18R-113.*

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ МУТАГЕНЕЗ АНТИФУНГАЛЬНОГО ХАРПИНО-ПОДОБНОГО ПЕПТИДА ECAMP1 СЕМЯН ЕЖОВНИКА (*ECHINOCHLOA CRUSGALL* L.)

Е.А. Рогожин[1,2,3], А.С. Барашкова[1], С.К. Завриев[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва; [3]Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (XBio), Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

Антимикробные пептиды врожденного иммунитета растений представляют собой один из наиболее эффективных инструментов для борьбы с патогенными микроорганизмами - возбудителями болезней. По степени функциональности все известное на текущий момент разнообразие таких молекул можно разделить на две больших группы - фунгицидные/бактерицидные и фунгистатические/бактериостатические. Семейство харпино-подобных защитных пептидов, или альфа-харпининов, принадлежит ко второй группе и насчитывает молекулы, обладающие, помимо антимикробной функции, также активностью ингибиторов трипсина и трипсино-подобных протеиназ, и рибосоминактивирующей. Пептид EcAMP1 является успешным примером фунгистатического вещества, для которого не показано наличие двух других активностей. Его трехмерная структура, как и у других альфа-харпининов, согласно данным ЯМР-спектроскопии, представляет собой две антипараллельные альфа-спирали, соединенные подвижной бета-шпилькой, которая предположительно определяет биологическую активность пептидов данного структурного типа. Методом гетерологической экспрессии в прокариотической системе было получено 5 мутантных аналогов EcAMP1, каждый из которых содержал единственную замену аминокислотного остатка Glu16Ala, Asp17Ala, Glu18Ala, Trp20Ala и с удаленными шестью С-концевыми остатками, "поли-Gly/поли-Arg"-типа. Сравнительное определение антифунгальной активности полученных молекул по отношению к наиболее восприимчивому модельному фитопатогенному грибу Fusarium solani позволило идентифицировать критическую замену Trp20Ala, приводящую к значительному количественному снижению степени задержки скорости нарастания мицелия по сравнению с контрольным вариантом. Замены других аминокислотных остатков, хотя и приводили к некоторому увеличению расчетного значения поверхностного заряда молекулы, достоверно не обеспечивали изменение уровня антифунгального действия исследуемой молекулы. *Данная работа поддержана грантом РНФ №18-74-10073*.

МАГНИФИКАМИД – НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНГИБИТОР ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ А-АМИЛАЗЫ

О.В. Синцова, Е.В. Лейченко, И.Н. Гладких, М.М. Монастырная, Э.П. Козловская
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Сахарный диабет второго типа развивается в результате снижения восприимчивости тканей к действию инсулина, которое часто возникает как следствие переедания, несбалансированного рациона и отсутствия физической активности. Данное заболевание широко распространено среди населения планеты (около 8% взрослых), и все чаще фиксируются случаи заболевания среди детей и подростков. На стадии преддиабета и ранних стадиях сахарного диабета второго типа для лечения применяются пероральные сахароснижающие препараты. Одной из разновидностей таких препаратов являются ингибиторы панкреатической α-амилазы, позволяющие эффективно контролировать поступление глюкозы в кровь из тонкого кишечника. К сожалению, использующиеся в настоящее время в качестве фармакологических препаратов низкомолекулярные соединения являются малоселективными ингибиторами, и их применение сопровождается побочными эффектами. Поэтому поиск новых ингибиторов панкреатической α-амилазы и изучение их свойств является актуальной научной задачей, решение которой позволит создать новые сахароснижающие средства, обладающие большей эффективностью и меньшими побочными эффектами. В результате протеомного анализа нами было установлено, что в ядовитом секрете актинии *Heteractis magnifica* наряду с разнообразными токсинами, широко представлены пептидные ингибиторы α-амилаз. Один из них, магнификамид, был выделен и охарактеризован. Методами генной инженерии был получен рекомбинантный аналог магнификамида. Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC50) активности панкреатической α-амилазы рекомбинантного пептида оказалось на два порядка ниже (4,1 нМ), чем IC50 акарбозы (374 нМ) – действующего вещества лекарственных препаратов PrecoseTM и GlucobayTM. Способность эффективно ингибировать панкреатическую α-амилазу позволяет рассматривать магнификамид в качестве потенциального препарата для коррекции нарушений обмена веществ и лечения сахарного диабета второго типа. *Работа поддержана грантом РФФИ № 18–38–00389.*

FAST SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS METHOD DEVELOPMENT FOR COMPLEX PEPTIDES

Andrew Kennedy,[1] Daniel Martinez,[2] James Cain,[2] Cyf Ramos-Colon,[2]
[1]Gyros Protein Technologies, Uppsala, Sweden; [2]Gyros Protein Technologies, Tucson, AZ, United States

With the advancement of peptides into the clinic the complexity of peptide sequences has continued to increase. With more complex sequences, synthesis difficulties arise, for example, sterically hindered coupling reactions, increased hydrophobicity, among others. Parallel synthesis optimization with induction heating was performed on the Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) of peptides with sterically hindered sequences looking for improvements in crude peptide purity. Several conditions were tested in parallel, including different temperatures, reaction times, and different coupling reagents. For example, the crude purity for Aib-ACP (VQ-Aib-Aib-IDYING-NH_2) was improved from 7.8% using HCTU to 91% by changing the coupling reagent from HCTU to COMU and increasing the reaction temperature to 75 °C using short reaction times (2 x 3 min). Other examples including cyclic peptides like APY-d4 (b-Ala-PYCVYR-b-Ala-EWEC-NH_2) peptide being studied for treatment of ALS and Alzheimer's disease [1], will be discussed.

[1] Olson EJ, et al. *ACS Med. Chem. Lett.* 2016; **7**: 841–846.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТОКСИНОВ ПАУКООБРАЗНЫХ С ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ ДОМЕНАМИ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ

М.Ю. Мышкин, Д.С. Кульбацкий, А.О. Чугунов, А.А. Беркут, А.С. Парамонов, Е.Н. Люкманова, А.А. Василевский, З.О. Шенкарев
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Потенциал-чувствительные Na+ (Nav) каналы имеют модульную организацию и включают в себя несколько мембранных доменов. Центральный поровый домен обеспечивает селективное прохождение ионов, а периферийно расположенные четыре потенциал-чувствительных домена (ПЧД-I/IV) отвечают за управления воротами канала в ответ на изменение трансмембранного (ТМ) потенциала. Некоторые мутации приводят к возникновению токов утечки через ПЧД, в результате чего могут развиваться различные заболевания. Например, гипокалиемический и нормокалемический периодический параличи вызываются мутациями в ТМ сегментах S4 ПЧД канала скелетных мышц человека Nav1.4. Недавно было показано, что токсин Hm-3 (паук Heriaeus melloteei), влияющий на потенциал-зависимую активацию каналов Nav, также способен ингибировать токи утечки через мутантные варианты Nav1.4 [1]. Таким образом, токсины пауков могут рассматриваться в качестве прообраза новых лекарственных препаратов для лечения нейромышечных заболеваний. Для исследования молекулярного механизма взаимодействия токсина Hm-3 с Nav1.4, мы использовали отдельные фрагменты канала, соответствующие ПЧД-I и ПЧД-II, полученные в бесклеточной системе синтеза белка. Методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии в окружении, моделирующем липидную мембрану, было показано, что Hm-3 может взаимодействовать как с ПЧД-I, так и с ПЧД-II. При этом положительно заряженная бета-шпилька токсина взаимодействует с различными сайтами на поверхности ПЧД. На ПЧД-I Hm-3 взаимодействует со спиралью S3b и внеклеточной петлей S3-S4, образуя два солевых мостика с консервативными остатками E208 и D211, в то время как на VSD-II токсин связывается с внеклеточной петлей S1-S2, образуя ионные связи с остатками E604 и D606. Вероятно, в обоих случаях аллостерические изменения конформации спирали S4, вызванные связанным токсином, приводят к блокировке токов утечки. Наблюдаемые стабилизирующие контакты между молекулой токсина и липидами, окружающими ПЧД, указывают на мембранно-опосредованный механизм взаимодействия Hm-3/Nav1.4.

Работа выполнена при поддержке РНФ (№ 16-14-10338) и программы «Молекулярная и клеточная биология» РАН.

[1] Männikkö R, Shenkarev ZO, et al, Spider toxin inhibits gating pore currents underlying periodic paralysis. PNAS (2018) 115(17):4495-4500

ТОКСИН СКОРПИОНА СЕНСИБИЛИЗИРУЕТ СЕНСОРНЫЕ НЕЙРОНЫ ПУТЕМ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ

А.И. Кузьменков[1], М. Ван Канн[2], А.А. Андреев-Андриевский[3], С. Пеньёр[4], Г.А. Хусаинов[1], А.А. Беркут[1], Я. Титгат[4], Й. Исенси[2], Т. Хухо[2], А.А. Василевский[1,5]
[1]Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [2]Кафедра анестезиологии и интенсивной терапии, Университетская больница Кёльна, Германия; [3]Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [4]Лаборатория токсикологии и фармакологии, Лёвенский университет, Лёвен, Бельгия

Яды животных выступают в качестве богатых источников высокоспецифичных токсинов, которые позволяют идентифицировать новые терапевтические мишени. В настоящей работе была проанализирована коллекция ядов и отдельных фракций на способность активировать сигнальные каскады, опосредованные протеинкиназой A (PKA) и классическими MAP-киназами ERK. Было обнаружено, что токсин MeuNaTx-1 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*, воздействующий на натриевые каналы, вызывал запуск сигнальных каскадов как PKA-II, так и ERK1/2. Рекомбинантный MeuNaTx-1 был получен в бактериальной системе экспрессии и показал идентичную с природным токсином активность. Сила эффекта MeuNaTx-1 на сенсорные нейроны зависела от дозы и снижалась при совместном действии с тетродотоксином. Использование разнообразных ингибиторов ионных каналов и токсинов с различной селективностью к изоформам потенциал-чувствительных натриевых каналов показало, что инициация сигнализации может осуществляться вследствие активации изоформы $Na_v1.2$.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты №№ 15-54-12363 и 19-54-12015).

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ
Биологические функции и механизмы действия пептидов и белков
Устные доклады

РОЛЬ БЕЛОК-ЛИПИДНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ БИТОПНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Э.В. Бочаров[1,2], Д.М. Лесовой[1], К.С. Минеев[1,2], О.В. Бочарова[1,2], А.С. Урбан[1,2], Я.В. Бершацкий[1,2], К.Д. Надеждин[1,2], П.Е. Волынский[1], Р.Г. Ефремов[1,2], А.С. Арсеньев[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Московский физико-технический институт (Государственный университет), Москва, Россия

Биологическая функция битопных мембранных белков, имеющих только один трансмембранный (ТМ) сегмент, обеспечивается сетью разнообразных межмолекулярных взаимодействий в клеточной мембране. К этому классу белков принадлежат, например, рецепторы типа I, которые принимают непосредственное участие в развитии и поддержании гомеостаза тканей организма человека. Рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR/HER) и гормона роста (GHR) служат удобными моде-

лями рецепторов типа I, чтобы показать, как лиганд-индуцированные конформационные перестройки и специфическая димеризация внеклеточных и ТМ доменов приводят к аллостерической активации цитоплазматических доменов при передаче сигнала через мембрану клетки. Нарушения функционирования данных рецепторов приводят к развитию ряда патологий, при том что их ингибиторы являются одними из самых успешных примеров таргетной терапии онкологических заболеваний на сегодняшний день. В тоже время, например, болезнь Альцгеймера представляет собой возрастную патологию, связанную с накоплением β-амилоидных пептидов, продуктов ферментативного расщепления внутри- и примембранными секретазами битопного белка-предшественника β-амилоида (APP). В течение ряда лет мы экспериментально определили альтернативные конформации примембранных участков и ТМ доменов белков EGFR/HER, GHR и APP в имитирующих мембрану средах, используя ЯМР-спектроскопию высокого разрешения в сочетании с МД-релаксацией в явно заданном липидном бислое. В свете недавно полученных биофизических и биохимических данных показано, что функционирование данных битопных белков обуславливается не только специфическими белок-белковыми и белок-липидными взаимодействиями, но и физическим состоянием липидного окружения, как одного из главных компонентов самосогласованной системы биологической мембраны. Это позволило нам предложить новые принципы, лежащие в основе передачи сигнала через мембрану клетки и распознавания субстрата мембранными белками, а также механизмы действия ряда патогенных мутаций в ТМ доменах белков. *Работы по биоинженерии и ЯМР исследованиям поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 17-00-00489, 17-04-02045, 18-54-74001 и 18-04-01289). Работа по молекулярному моделированию выполнена при поддержке Российским научным фондом (проект 18-14-00375).*

СТРУКТУРА, КОНФОРМАЦИОННАЯ ДИНАМИКА И МЕМБРАНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ. СПЕКТРОСКОПИЯ И КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Ю.Ф. Зуев, Б.И. Хайрутдинов, Е.А. Ермакова
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Антимикробные пептиды (АМП) - важные компоненты иммунных систем. Одним из семейств АМП являются небольшие катионные, цистеиносодержащие пептиды млекопитающих, насекомых и растений. В данной работе для изучения структуры, конформационной динамики и мембранотропных свойств растительного дефензина сосны обыкновенной PsDef1 и ряда пептидов на его основе применен комплекс спектроскопических методов (ЯМР, ИК, КД) и компьютерного моделирования (структурное моделирование, молекулярный докинг, крупно-зернистая молекулярная динамика (CGMD)). Механизм действия АМП – сложный многоступенчатый процесс, одной из основных стадий является взаимодействие АМП с клеточными мембранами. Методом крупно-зернистой молекулярной динамики показано, что дефензин не образует пор в исследованных модельных мембранах. Его молекулы локализуются на поверхности мембран по принципу “ковровой” модели, образуя устойчивые комплексы с комбинированными мембранами, содержащими анионные липиды, и взаимодействует с мембранами согласно “ковровой” модели. Связывание дефензина на поверхности мембраны приводит к изменению распределения липидов в мембране и изменению электростатического потенциала мембраны. Деформация электростатического потенциала мембраны может быть причиной образования дефектов в структуре мембраны и служить причиной гибели клетки. Сравнительно небольшие размеры АМП позволяют использовать молекулярное конструирование их структурных аналогов для поиска механизмов действия. В качестве модельного аналога АМП на основе аминокислотной последовательности дефензина сосны PsDef1 был построен катионный β-пептид с последовательностью RMCKTPCGKFYCYKPCP и изучено его взаимодействие с многокомпонентными мембранами. Методом CGMD показано, что, в отличие самого дефензина, модельный пептид может встраиваться в мембрану и образовывать в ней стабильные поры. Наблюдаемые поры не имеют центрального водного канала, а молекулы воды проникают через мембрану через узкие щели между пептидами или между пептидами и заряженными головными группами анионных липидов. Показано, что олигомеризация пептидов является необходимым условием для образования и стабилизации пор. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и правительства республики Татарстан № 18-415-160011.*

ЭНДОЛИЗИНЫ, ХОЛИНЫ И СПАНИНЫ КОЛИФАГОВ T5, RB43 И RB49 В МОДЕЛИ ЛИЗИСА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Г.В. Микулинская[1], С.В. Чернышов[1], А.О. Коваленко[1], Д.А. Прохоров[2], В.П. Кутышенко[2], И.С. Масулис[3]
[1]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН; [3]Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

Литические фаги, инфицирующие грамотрицательные бактерии, для выхода потомства индуцируют синтез ряда белков, обеспечивающих разрушение клеточной стенки изнутри. Среди них холин, образующий поры во внутренней мембране, фермент эндолизин, чьим субстратом является пептидогликан, а также белки, обеспечивающие слияние внутренней и наружной мембран – i-спанин и o-спанин. Объектами нашего исследования являются белки лизиса бактериофагов, инфицирующих кишечную палочку – T5 (Siphoviridae), RB43 и RB49 (псевдо T-четные Myoviridae).

Эндолизины этих фагов, относящихся к разным таксономическим группам, – гомологичные L-аланил-D-глутаматпептидазы семейства M15. В активном центре все они содержат цинк, но только эндолизин бактериофага T5 нуждается также в активации кальцием. Структура этого фермента установлена методом ЯМР высокого разрешения. Сайт-направленный мутагенез показал, что кальций связывается в молекуле EF-подобной петлей с низким сродством, что позволило предложить механизм периплазматической активации.

Холины исследуемых бактериофагов также гомологичны и относятся к холинам T4-типа – с одним N-концевым трансмембранным доменом и крупным периплазматическим доменом. Холины бактериофагов RB43 и RB49 – поздние белки, а присутствие в геномах этих фагов гомологов антихолина бактериофага T4 - белка RI – предполагает их участие в регуляции тайминга

лизиса. У бактериофага T5 гомологов белка RI нет, а ген холина входит в состав раннего транскрипта под контролем промотора, узнаваемого немодифицированной РНК-полимеразой *E. coli*. Есть основания полагать, что накопление этого токсичного холина в мембране регулируется на трансляционном уровне за счет вторичной структуры мРНК области инициации, неканонического стартового кодона UUG и ингибирования элонгации SD-подобными участками кодирующей части мРНК.

Гены i-спанинов и o-спанинов были заново аннотированы. Продукты как первых, так и вторых обладают слабой аминокислотной и выраженной структурной гомологией. i-спанины - α-спиральные белки с одним трансмембранным доменом и С-концевым периплазматическим. o-спанины имеют N-концевую sec-последовательность для транслокации в периплазму, сайт липоилирования для удержания в наружной мембране, обогащены пролином и неструктурированы. *Работа поддержана грантом РФФИ № 18-04-00492.*

ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ КИСЛОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ

Д.И.Осмаков[1,2], С.Г. Кошелев[1], Я.А. Андреев[1,2], С.А. Козлов[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Институт молекулярной медицины, Москва, Россия

Лиганды белковой природы, благодаря своей селективности и эффективности действия, являются важными инструментами для изучения функционирования рецепторов как на молекулярном уровне, так и в масштабах целого организма. Для кислоточувствительных ионных каналов (ASIC) такими лигандами являются как эндогенные нейропептиды (пептиды, содержащие Arg-Phe-амидный мотив, опиоидные пептиды динорфины и орфанный нейропептид ноцистатин), так и пептиды экзогенной природы, выделенные из ядов безпозвоночных (псалмотоксин (PcTx1) и токсин Hi1a, ингибирующие ASIC1a; мамбалгин (Mamb), ингибирующий ASIC1a и ASIC1b; APETx2, Hcr 1b-1 и Ugr9-1, ингибирующие ASIC3; Mit-токсин, активирующий ASIC1a, ASIC1b, и ASIC3 и потенцирующий работу ASIC2a). Структурно-функциональные и физиологические исследования с использованием данных пептидов позволили локализовать участки на каналах, ответственные за их функционирование, а также продемонстрировать участие каналов в болевых и воспалительных процессах. Анальгетические свойства мы изучали для APETx2 и Ugr9-1, а для нейропептида ноцистатин мы впервые определили способность актировать ASIC каналы подобно действию кислотного pH. Эффект ноцистатина отличен от действия известных нейропептидов, которые являются положительными модуляторами работы ASIC каналов и в экспериментах *ex vivo* и *in vivo* демонстрируют нейродегенеративные и болевые эффекты, соответственно. Ноцистатин ингибирует действие самих протонов и, таким образом, конкурирует с ними за способность активировать канал, что делает его важным инструментом в структурных исследованиях по локализации участков на ASIC каналах, ответственных за их активацию. Успехи в использовании пептидных лигандов в изучении молекулярных механизмов физиологической и патологической роли таких фармакологически важных мишеней, как ASIC каналы, вносят неоценимый вклад в разработку препаратов для лечения различных болевых, воспалительных и нейродегенеративных процессов. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-14-00138.*

ПРИМЕНЕНИЕ SPR БИОСЕНСОРОВ BIACORE В МОЛЕКУЛЯРНОМ ФИШИНГЕ

А.С. Иванов
НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

В настоящее время для идентификации партнеров белок-белковых взаимодействий (ББВ) часто применяется метод молекулярного фишинга. В наших исследованиях для решения задач белковой интерактомики мы используем оригинальный вариант прямого молекулярного фишинга, основанный на комбинации технологий аффинной и гель-хроматографии, поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и масс-спектрометрической идентификации белков [1-8]. Для выделения потенциальных белков-партнеров из лизата биологического материала в качестве аффинного лиганда используется иммобилизованный на сорбенте целевой белок-наживка. SPR биосенсоры типа Biacore (GE Healthcare, США) используются для решения нескольких ключевых задач на разных этапах фишинга:

- оптимизация протокола получения целевого аффинного сорбента - схожесть химической реакции ковалентного связывания белка на сорбенте и на оптическом чипе позволяет использовать SPR для подбора оптимальных условий получения аффинного сорбента (состав и pH буфера, концентрация белка, время и скорость потока);
- контроль сохранения способности иммобилизованного белка-наживки участвовать в ББВ - путем SPR измерений взаимодействия с известными белками-партнерами;
- оптимизация протокола получения лизата биоматериала - по возрастанию сигнала биосенсора при инжекции лизата через канал с иммобилизованным белком-наживкой;
- оптимизация протокола прямого молекулярного фишинга - путем моделирования фишинга на оптическом чипе и подбора оптимальной концентрации лизата, состава рабочего буфера, времени и скорости потока, состава элюирующего буфера и времен элюции;
- SPR валидация обнаруженных потенциальных белков-партнеров - SPR анализ парных ББВ с использованием чистых препаратов белков.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 18-54-00015).

[1] Ershov P. et al. Proteomics, 2012, 12, 3295–3298.
[2] Иванов А.С. и др. Биомедицинская химия, 2013, 59(2), 171-182.
[3] Ivanov A.S. at al. Proteomics 2014, 14, 2261–2274.
[4] Иванов А.С., Медведев А.Е. Биомедицинская химия, 2015, 61(2), 231-238.
[5] Иванов А.С. и др. Биоорганическая химия, 2016, 42(1), 18-27.

[6] Florinskaya A. et al. Sensors (Basel, Switzerland), 2018;18(5):1616.
[7] Ершов П.В. и др. Биоорганическая химия, 2019, 45(2), 155-165.

ТОПОЛОГИЯ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Р.Г. Киямова[1], Л.Ф. Минигулова[1], М.В. Богданов[1,2]
[1]Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии, НИЛ Биомаркер, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия [2]Кафедра биохимии и молекулярной биологии, Научно-медицинский центр Техасского университета в Хьюстоне, Медицинская школа МакГоверна, Хьюстон, США

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b (SLC34A2, NaPi-IIb, NPT2b) принадлежит к семейству транспортеров SLC34A2 и участвует в поддержании фосфатного гомеостаза в организме человека, экспрессируясь в ряде нормальных тканей, включая тонкий кишечник, легкие, семенники, почки, слюнные железы и другие ткани и органы. Известно, что де-регуляция транспортерной функции NaPi2b в результате мутаций в гене SLC34A2 человека может привести к легочному альвеолярному микролитиазу, а его повышенная экспрессия в кишечнике к гиперфосфатемии. Аберрантная экспрессия NaPi2b была описана при некоторых злокачественных новообразованиях, включая рак яичника, легкого, молочной железы, папиллярный рак щитовидной железы и другие виды рака, однако роль фосфатного транспортера NaPi2b при раке остается до конца не выясненной. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b является интегральным мембранным белком с большим внеклеточным доменом (ВКД2), N- и C- концевыми доменами, расположенными в цитоплазме и представляет собой удобную мишень для таргетной терапии. На сегодняшний день, ряд моноклональных антител, направленных против ВКД2 NaPi2b проходят клинические испытания для лечения рака яичника и легкого. Наш проект направлен на изучение топологии натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b и особенностей его распознавания моноклональными антителами в норме и в условиях, имитирующих опухоль (гипоксия, низкий pH и мутации в гене транспортера). Нами клонирован район эпитопа для антител MX35 и L-NaPi2b и показано, что распознавание ВКД2 этими моноклональными антителами обусловлено дисульфидными связями, гликолизированием в районе эпитопа и отменяется мутацией в положении T330V. Выявлено, что топология белка претерпевает значительные изменения в условиях гипоксии и низкого pH, при этом его N-концевой фрагмент может быть локализован снаружи клетки. Полученные данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение при разработке новых таргетных препаратов против NaPi2b. *Работа выполнена за счёт субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.*

ДИПЕПТИД КАРНОЗИН КАК ЛИГАНД КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ОКСИДОМ АЗОТА

О.В. Космачевская[1], К.Б. Шумаев[1,2], И.С. Пугаченко[1], Э.К. Рууге[2], А.Ф. Топунов[1]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [2]НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва, Россия

Дипептид карнозин (бета-аланил-L-гистидин) в высоких концентрациях содержится в нервных и мышечных тканях. Среди широкого спектра функций этого дипептида отмечено антиоксидантное действие, которое обусловлено эффективным хелатированием ионов меди. Однако способность карнозина связывать железо не установлена. Наличие в молекуле карнозина имидазольных групп гистидина не исключает возможность образования тройных комплексов с железом и оксидом азота. При добавлении к раствору карнозина двухвалентного железа и донора нитроксила (HNO/NO–) был зарегистрирован синглетный сигнал ЭПР с g-фактором, равным 2,034. Аналогичный сигнал возникал в реакционной смеси, содержащей карнозин и динитрозильные комплексы железа с фосфатными лигандами (ДНКЖ-PO4). Полученные спектры ЭПР были интерпретированы как комплексы карнозина с железом и двумя молекулами оксида азота (NO) – карнозиновые ДНКЖ. При использовании PAPA/NONOate в качестве донора NO комплексы образовывались в следовых количествах. Это значит, что карнозиновые ДНКЖ образуются только при участии Fe-(NO)2 группы или HNO/NO–. Скорость формирования комплексов дозозависимо стимулировал метилглиоксаль (MG) − активное карбонильное соединение. Одним из продуктов реакции карнозина с MG являются перекрестно-сшитые основания Шиффа, образующиеся в результате взаимодействия аминогрупп двух молекул карнозина с карбонильными группами MG. Образование последних было зарегистрировано в экспериментальной системе по максимуму поглощения при 334 нм. Был сделан вывод, что перекрестно-сшитые основания Шиффа являются более эффективным лигандом при формировании ДНКЖ, чем индивидуальный карнозин. Карнозиновые ДНКЖ проявляли антиоксидантную активность, которая превышала активность входящих в их состав компонентов. Оценку антиоксидантных свойств производили по скорости восстановления оксоферрильной формы миоглобина (MbIV=O). Полученные комплексы можно рассматривать как новый класс фармакологических препаратов с синергетическим терапевтическим действием, позволяющим корректировать метаболизм оксида азота и защищать клетки при окислительном и нитрозативном стрессах.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-015-00125-а, №19-015-00444-а).

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9-НАПРАВЛЕННОГО ГЕНОМНОГО НОКАУТА

А.Б. Комиссаров[1,2], М.В. Сергеева[1,2], А.Д. Васильева[1,2], С.П. Медведев[1,3], А. А. Малахова[1,3], Е.В. Можаева[1], К.А. Васильев[2], А.-П.С. Шурыгина[2], Е.С. Журавлев[1], Е.А. Балахонова[1], А.Н. Горшков[2], М.П. Грудинин[2], В.А. Рихтер[1], Г.А. Степанов[1]

[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [2]НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург; [3]ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

Во всем мире ежегодные эпидемии гриппа приводят к 3–5 млн. случаев тяжелых форм заболевания и примерно к 250–500 тысячам случаев смерти. Ежегодно в России в эпидемический сезон заболевает до 10% населения. Вакцинопрофилактика является наиболее рациональной стратегией борьбы с гриппозной инфекцией. В настоящее время существует очевидная потребность в разработке более технологичных платформ производства вакцин. Перспективным направлением является получение противогриппозных вакцин с использованием человеческих клеточных культур. Целью работы является создание клеточных линий человеческого происхождения, обеспечивающих повышенную репликацию вируса гриппа с максимальным сохранением антигенных свойств. В качестве стратегии был выбран направленный геномный нокаут факторов устойчивости к вирусу гриппа на модели клеток человека 293FT. Первоначально было проведено исследование изменений в экспрессии генов в клетках 293FT при заражении вирусом гриппа A IVR-165 (H3N2) и PR8 (H1N1). С применением RNA-Seq и количественной ОТ-ПЦР были выявлены группы генов с наиболее выраженными изменениями в уровне экспрессии. Далее были выбраны гены для селективного нокаута: в список мишеней были включены гены регулятора метаболизма холестерина аннексина A6 и интерферон-зависимых транскрипционных факторов. Нокаут генов-мишеней проводили с помощью внесения точечных разрывов системой CRISPR/Cas9. Были получены моноклональные клеточные линии с нокаутом генов AnxA6 и IRF-7. Линии содержали мутации, обеспечивающие сдвиг рамки считывания. Далее методом титрования на клеточной культуре MDCK были получены ключевые результаты, демонстрирующие повышение уровня накопления вируса гриппа в модифицированных клеточных линиях ANXA6-/- и IRF7-/- по сравнению с исходной 293FT. Полученный результат подтверждали независимыми методами оценки уровня вирусной РНК и вирусного белка NP в зараженных клетках. Таким образом, была продемонстрирована возможность повышения продуктивности наработки вируса гриппа в клеточной линии человеческого происхождения. Индивидуальный нокаут выбранных генов-мишеней является первым этапом конструирования высокопермиссивной клеточной культуры для наработки широкого набора штаммов вирусов гриппа. *Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №18-75-10069.*

СОЗДАНИЕ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ КЛОНОВ В-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

М.Г. Бязрова[1,2], А.Г. Прилипов[3], А.В. Филатов[1,2]

[1]ГНЦ «Институт иммунологии»; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет; [3]Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Моноклональные антитела доказали свою эффективность при лечении ряда онкологических и аутоиммунных заболеваний. В настоящее время терапевтические антитела человеческого происхождения получают методом фагового дисплея или с помощью гибридомной технологии с использованием мышей, трансгенных по генам Ig человека. Проблему быстрого получения терапевтических антител можно решить, если найти эффективный способ иммортализации В-лимфоцитов человека in vitro. Для стимуляции В-лимфоцитов, выделенных из крови добровольцев, мы использовали интерлейкин 21 (IL21) в сочетании с молекулой CD40L, экспрессированной на поверхности фидерных клеток. В качестве фидерных использовали клетки A549, которые были стабильно трансфицированы геном CD40L. Общие В-лимфоциты или популяцию плазмобластов выделяли из крови добровольцев с помощью сортировки на проточном цитометре. При IL21/CD40L стимуляции В-клетки активно делились, секретировали Ig и приобретали фенотип активированных лимфоцитов, но примерно к 10 дню потенциал пролиферации снижался и лимфоциты гибли путем апоптоза. Для того чтобы преодолеть пролиферативный барьер необходимо репрограммировать стимулированные лимфоциты путем оверэкспрессии анти-апоптотических генов. С этой целью, используя лентивирусную доставку, стимулированные В-лимфоциты были стабильно трансфицированы генами BCL-6 и BCL-XL. Наиболее эффективная трансдукция была получена на 3-й день IL21/CD40L стимуляции. После введения генов BCL-6 и BCL-XL стимулированные В-лимфоциты стабильно пролиферировали в течении несколько недель. Для перехода к безфидерной системе активации В-лимфоцитов мы получили рекомбинантный белок CD40L, который через изолейциновый зиппер был слит с Fc фрагментом Ig. Это позволило получить молекулу CD40L в гексамерной форме, что необходимо для ее эффективного действия вне фидерных клеток. Из крови добровольцев, иммунизированных вакциной против гепатита В, были выделены плазмобласты, которые были стимулированы in vitro. Стимулированные В-клетки показали высокий уровень секреции антител против поверхностного антигена гепатита В. Разработанный подход позволит в будущем перейти к получению антиген-специфических рекомбинантных антител человека. *Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 19-15-00331).*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРА ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ КИНАЗ 4/6 – ПАЛЬБОЦИКЛИБА – ДЛЯ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ КЛЕТОК, ПОДДЕРЖИВАЮЩИХ РАЗМНОЖЕНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО РЕПЛИКОНА ВИРУСА ГЕПАТИТА С

А.З. Маликова, К.А. Кондукторов, А.С. Щербакова, К.А. Камарова, С.Н. Кочетков, М.В. Козлов
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Разработка препаратов, направленных против клеточных мишеней (HTAs), функционально значимых для воспроизводства вируса гепатита С (HCV), открывает новые возможности борьбы с данным патогеном и в перспективе решает проблему резистентности к существующим антивирусным препаратам прямого действия (DAAs). Гепатоциты в нормальных физиологических условиях находятся в функциональном состоянии (G0 фаза), однако HCV инфекция активирует в них митотический цикл, с последующей его остановкой в G1 фазе. Многочисленные данные указывают на то, что основной вклад в наблюдаемое торможение клеточного цикла вносят тесно связанные между собой сигнальные пути TGF-β1 и p53. В современных тест-системах репликация HCV поддерживается в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека (HCC), которые активно пролиферируют, что принципиально отличает их от G1-арестованных гепатоцитов. Однако, непосредственное применение TGF-β1 для перепрограммирования клеток, поддерживающих размножение полноразмерного репликона HCV, оказалось нецелесообразно, ввиду значительного падения содержания репликона в клетках и их малой восприимчивости к цитостатическому действию фактора. Так как G1 арест клеток в присутствии TGF-β1 в норме обеспечивается за счет положительной регуляции белков-ингибиторов циклин-зависимых киназ, то для остановки клеток в G1 фазе клеточного цикла нами был использован пальбоциклиб – низкомолекулярный ингибитор CDK4/6. Мы показали высокую эффективность этого соединения в качестве цитостатического агента, в присутствии которого содержание вирусной РНК возрастало в 2-2.5 раза. Кроме того, пальбоциклиб активировал в клетках аутофагию и окислительный стресс, которые также сопутствуют HCV-инфекции гепатоцитов. Интересно, что DAAs – телапревир и 2'-Me-Ad – демонстрировали равную противовирусную активность, как в свободно пролиферирующих клетках, так и в клетках, остановленных в G1 фазе клеточного цикла. Это ещё раз подтверждало, что присутствие пальбоциклиба не нарушало работу вирусной машинерии. Тестирование антивирусной активности HTAs в остановленных клетках в основном давало худшие результаты, в сравнении с обычной тест-системой, использующей свободно делящиеся клетки. Таким образом, предлагаемый подход может значительно упростить первичный скрининг и оценку эффективности новых HTAs.

ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА НА ГЕМОГЛОБИН В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И ЭЛЕКТРОФИЛЬНОГО СТРЕССОВ

А.Ф. Топунов[1], О.В. Космачевская[1], Э.И. Насыбуллина[1], Л.В. Чумикина[1], Л.И. Арабова[1], Ю.В. Абаленихина[2], К.Б. Шумаев[1,3]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; [2]Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова МЗ РФ, Рязань; [3]НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва, Россия

Многие патологические состояния сопровождаются развитием окислительного и электрофильного стрессов, вследствие избыточного образования активных форм кислорода (АФК) и активных карбонильных соединений (АКС). Гемоглобин (Hb) эритроцитов – долгоживущий белок, способный накапливать повреждения. Это негативно сказывается на функционировании эритроцитов особенно в области микроциркуляторного русла. Поэтому представляется актуальным изучение веществ, способных защищать Hb от модификаций АФК и АКС. Одними из таких веществ являются метаболиты оксида азота (NO) в низких физиологических концентрациях: нитрозотиолы (GS-NO и Cys-NO) и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ). Частным случаем электрофильного стресса является карбонильный стресс. Показано, что GS-NO ингибирует образование флуоресцирующих конечных продуктов гликирования, возникающих в ходе инкубации Hb с метилглиоксалем (MG). GS-NO также препятствует образованию кросс-сшивок между субъединицами Hb, образуемых в реакции неферментативного гликирования. Протекторное действие GS-NO может быть связано с образованием аддуктов оснований Шиффа с NO и нитрозильных комплексов железа. Также показано, что GS-NO в условиях карбонильного стресса стимулирует образование редокс-активных соединений, которые являются нитрозилирующими и нитрующими агентами для Hb, а также вызывают окислительную модификацию Hb и связывание его с мембраной. При этом добавление GS-NO и Cys-NO эритроцитам в присутствии MG снижает уровень мембраносвязанного Hb. Кроме того, было показано, что ДНКЖ ингибируют окислительную модификацию гемоглобина. ДНКЖ, связанные с Hb, защищают SH-группы от окисления под действием пероксида водорода и пероксинитрита. Также ДНКЖ снижают уровень карбонильных производных Hb, образуемых под действием различных окислителей. Протекторное действие ДНКЖ обусловлено их способностью нейтрализовать свободные радикалы, что было продемонстрировано в различных модельных системах с помощью ЭПР-спектроскопии и люминол-зависимой хемилюминесценции. В заключении отметим, что среди множества функция NO в организме можно выделить еще одну, связанную с защитой белков от необратимой модификации АФК и АКС. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №18-34-00561 Мол_а, №19-015-00444-а).*

РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ УЧАСТИИ *ARG-X* ПРОТЕАЗО-ПРОЦЕССИНГА НА ПРИМЕРЕ ФАЗ РАЗВИТИЯ *E. COLI* В КОНЦЕПЦИИ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОЙ ХИМИИ

Э.А. Иванова, Т.С. Тропынина, Г.Х. Вафина
Уфимский институт биологии УИБ УФИЦ РАН; Уфа, Россия

В настоящее время супрамолекулярная химия, особенно биологическая, в высшей степени становится областью междисциплинарной науки и приобретает статус супрамолекулярной науки. Понимание биологических процессов значительно легче

достигается с помощью модельных объектов, в которых клеточный уровень организации жизнедеятельности можно рассматривать с позиции самоорганизующихся структур, постоянно взаимодействующих друг с другом и окружающей средой. В данной работе *E. coli* рассматривается в концепции супрамолекулярной науки, где в соответствии с информационной программой развития, работающей на основе принципов молекулярного распознавания, в результате спонтанной ассоциации, возникают специфически фазовые ансамбли, которые характеризуются определенной организацией на микроскопическом уровне с проявлением макроскопических свойств, зависящих от фазового роста популяционной культуры. В этом отношении супрамолекулярная химия может рассматриваться как химическая или молекулярная информатика. Цель данной работы представить клетку (на основе разработанных в лаборатории патентов) в виде: Бп-бактериоплазмы, Нс-непрочно-, Пс-прочно-связанных с Ко- клеточным остатком супрамолекулярных ансамблей, в молекулах которых уже запрограммирована генетическая память самоорганизации и её реализации в циклах и морфогенетических фазах развития. Так как, в динамической пространственно-временной самоорганизации, топологически-ассоциированных супрамолекулярных ансамблей, активную роль выполняют шапероны, некоторые из которых обладают протеолитической функцией, то, с этой позиции, в них исследована локализация *Arg-X* протеазо-чувствительных сайтов, как возможных зон ремоделирования функциональной системы организма в процессе фазового роста популяционной периодической бактериальной культуры. Интерес к аргинину вызван тем, что его молекула практически вся активна и облигатно взаимодействует как с ДНК, так и с другими гистонами и негистонами. Особенностью представленной экспериментальной работы является то, что выявлено позиционирование *Arg-X* протеазо-процессинга на поверхности раздела Бп – (жидкокристаллической гетерополимерной структуры), по-видимому контролирующей все последующие: Нс-, Пс,, Ко ансамбли морфогенетических фаз роста жизненного цикла периодической популяционной культуры *E.coli*.

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* КЛАСТЕРА BEIJING B0/W148 В ОТВЕТ НА ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНУЮ ТЕРАПИЮ

Ю.А. Беспятых[1], Е.А. Шитиков[1], А.С. Гуляев[1], А.В. Смоляков[1], К.М. Климина[1], М.З. Догонадзе[2], В.Ю. Журавлев[2], Е.Н. Ильина[1]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва;[2]Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

Beijing B0/W148, «успешный» кластер *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциирован с повышенной лекарственной устойчивостью и широко распространен на территории России и в ряде бывших республик Советского Союза. Целью настоящего исследования было выявить изменения в метаболизме эндемичных штаммов кластера в ходе противотуберкулезной терапии (ПТТ).

В исследование было включено три штамма *M. tuberculosis* кластера Beijing B0/W148, выделенные от одного пациента до (штамм I-2008г), во время (штамм II-2009г) и после (штамм III-2012г) проведения ПТТ. Чувствительность к противотуберкулезным препаратам (ПТП) определяли с использованием системы BACTEC MGIT 960. Для всех штаммов было проведено полногеномное и транскриптомное секвенирование на приборе Illumina HiSeq 2500 и количественное протеомное профилирование на масс-спектрометре Q-Exactive HF.

Согласно данным фенотипической чувствительности к ПТП, штамм II обладал устойчивостью к высоким концентрациям изониазида, а штамм III дополнительной устойчивостью к офлоксацину. В ходе полногеномного секвенирования в данных штаммах выявлены мутации в гене gyrA (D94A) и промоторе гена inhA (t-8c), ассоциированные с резистентностью. При этом по результатам РНК-секвенирования для представленных генов выявлена сниженная и повышенная представленность транскриптов, соответственно. Сравнительный количественный протеомный анализ выявил повышенную представленность белков, кодируемых генами mce1 оперона (Rv0169, Rv0170, Rv0172) в штаммах II и III. Повышение представленности соответствующих белков под действием проводимой ПТТ может свидетельствовать в пользу адаптации бактерий к воздействию ПТП. Отмечена повышенная представленность белков липидного метаболизма, в частности ответственных за биосинтез длинноцепочечных жирных кислот. Увеличение представленности белка Rv0469 (UmaA), ответственного за синтез миколовых кислот, может свидетельствовать в пользу формирования штаммами клеточной оболочки, препятствующей проникновению противотуберкулезных препаратов. Отмечена повышенная представленность регуляторных белков. Представленные изменения, безусловно, свидетельствуют в пользу проявления бактериями регуляции путей ответа на воздействие лекарственных препаратов в рамках ПТТ. *Работа поддержана Российским научным фондом грант №17-15-01412.*

ТЕРМИНАЛЬНЫЕ ОКСИДАЗЫ ТИПА bd ПОЗВОЛЯЮТ БАКТЕРИЯМ ПОДДЕРЖИВАТЬ АЭРОБНОЕ ДЫХАНИЕ В ПРИСУТСТВИИ СЕРОВОДОРОДА

В.Б. Борисов[1], Е. Форте[2], М. Фалабелла[2], Х.Г. Колако[3], М. Тинажеро-Трехо[4], Р.К. Пул[5], Ж.Б. Висенте[6], П. Сарти[2], А. Жуффре[2]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [2]Отдел биохимических наук и Институт Пастера – Фонд Ченчи Болоньетти, Римский университет Ла Сапиенца, Рим, Италия; [3]Группа по метаболизму и генетике, НИИ лекарственных средств (iMed.ULisboa), Фармацевтический факультет, Лиссабонский университет, Лиссабон, Португалия; [4]Программа клеточной биологии, Больница для больных детей, Торонто, Канада; [5]Кафедра молекулярной биологии и биотехнологии, Университет Шеффилда, Шеффилд, Великобритания; [6]Институт химической и биологической технологии, Новый университет Лиссабона, Оэйраш, Португалия; [7]Институт молекулярной биологии и патологии НИС, Рим, Италия

Сероводород (H2S) сильно ингибирует гем-медную митохондриальную цитохром с-оксидазу. Принимая во внимание тот факт, что многие прокариоты способны продуцировать H2S и сталкиваются с повышенными уровнями H2S, к примеру, в толстой кишке человека, мы предположили, что микробы могут обладать нечувствительными к H2S терминальными оксидазами. Эта гипотеза была проверена на *Escherichia coli*, которая имеет три дыхательные оксидазы: одну гем-медную (bo3) и две

типа bd (bd-I и bd-II). Оксидазы типа bd обнаруживаются исключительно у прокариот и несут ответственность за вирулентность и устойчивость бактерий к токсичным активным формам кислорода и азота. Нам удалось установить, что, в отличие от bo3-оксидазы, обе bd-оксидазы устойчивы к действию H2S. У мутантных штаммов *E. coli*, аэробное дыхание и рост подавлялись H2S в том случае, когда дыхание поддерживалось только bo3-оксидазой. Вместе с тем H2S не оказывал никакого влияния на эти процессы, если в качестве единственной терминальной оксидазы функционировал один из двух цитохромов типа bd: bd-I или bd-II. Более того, условия пониженного содержания кислорода в среде, способствующие экспрессии bd-оксидаз, индуцировали нечувствительное к H2S дыхание у клеток E. coli дикого типа. Таким образом, оксидазы типа bd наделяют *E. coli* и, возможно, другие бактерии способностью к потреблению кислорода и росту в присутствии сравнительно высоких концентраций H2S. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-04-00094).*

БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-D,L-ЛАКТИД-КО-ГЛИКОЛИДА, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СКАФФОЛДОВЫМИ РАСПОЗНАЮЩИМИ БЕЛКАМИ, ДЛЯ АДРЕСНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА HER2-СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ РАКОВЫЕ КЛЕТКИ

В.О. Шипунова[1,2,3], Е.Н. Комедчикова[1], А.В. Бабенышев[3], С.М. Деев[1,2,3]
[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), Москва, Россия

В течение последних десятилетий успехи белковой инженерии и нанобиотехнологий позволили достичь значительного прогресса в решении проблемы терапии и диагностики раковых заболеваний, однако создание эффективных противораковых терапевтических, а также тераностических средств всё ещё является исключительно актуальным и активно развивающимся направлением. В данной работе описаны синтез, инкапсуляция и поверхностная модификация распознающими белками биосовместимых наноструктур из поли-D,L-лактид-ко-гликолида для адресного воздействия на HER2-сверхэкспрессирующие раковые клетки. HER2 принадлежит к семейству рецепторов эпидермального фактора роста человека и сверхэкспрессируется в примерно 30% случаев рака молочной железы, а также во многих других опухолях эпителиального происхождения. Сверхэкспрессия HER2 часто связана с высоким метастатическим потенциалом опухоли, высоким риском рецидива и снижением общей выживаемости пациентов. Нами были получены наноструктуры поли-D,L-лактид-ко-гликолида размером 150 нм с инкапсулированным флуоресцентным красителем для использования данных структур для диагностических целей, и цитотоксическим агентом доксорубицином для направленного уничтожения раковых клеток. Данные структуры были модифицированы HER2-связывающим аффибоди с помощью метода ковалентной химической конъюгации. Структуры были охарактеризованы различными физико-химическими методами и показана специфичность их связывания с HER2+ клетками как в культуре *in vitro*, так и в ксенографтных HER2+ опухолях *in vivo* со схожей эффективностью. Также было показано, что данные адресные структуры обладают избирательным цитотоксическим эффектом только по отношению к HER2+ клеткам. Таким образом, в данное работе были получены биосовместимые наноструктуры, обладающие необходимыми для тераностики свойствами: диагностическими и терапевтическими, что было продемонстрировано как *in vitro*, так и *in vivo*. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 17-74-20146.*

ВОССТАНОВЛЕНИЕ НАРУШЕННЫХ ФУНКЦИЙ МУТАНТНОГО ОНКОСУПРЕССОРА P53: НОВЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ МОДУЛЯТОРЫ ТАРГЕТНОГО ДЕЙСТВИЯ

Р.М. Саярова[1], Р.Р. Хадиуллина[1], В.В. Часов[1], Д. Стефенсон-Кларк[2], М. Бауд[2], Р.Н. Мингалеева[1], А.А. Ризванов[1], Э.Р. Булатов[1,3]
[1]Казанский федеральный университет, Россия; [2]Университет Саутгемптона, Великобритания; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Транскрипционный фактор p53 является онкосупрессорным белком, который активируется в ответ на различные типы клеточного стресса. При этом p53 регулирует экспрессию генов, белковые продукты которых приводят к остановке клеточного цикла и/или апоптозу. В норме p53 является короткоживущим белком, который быстро расщепляется 26S протеасомой посредством убиквитин-опосредованного сигнального пути. Активную роль при этом играет E3 убиквитин-лигаза MDM2, являющаяся ключевым негативным регулятором p53. Помимо этого, примерно в 50% случаев раковых заболеваний человека инактивация онкосупрессора p53 происходит в результате точечных мутаций, в первую очередь в области ДНК-связывающего домена. Онкогенная мутация Y220C белка p53 является одной из наиболее распространенных и выявляется ежегодно примерно в 100 тысячах случаев диагностированных раковых заболеваний. Наличие данной мутации нарушает третичную структуру ДНК-связывающего домена p53, что приводит к дестабилизации белка, его частичной денатурации и утрате активности. Стабилизация структуры мутантного p53(Y220C) и активация его нарушенных транскрипционных функций возможна при помощи низкомолекулярных соединений, в литературе описываемых как стабилизаторы, активаторы, модуляторы. В данном проекте мы выходим за рамки классического подхода по созданию модуляторов взаимодействий «белок- белок», конкурирующих с субстратом, и предлагаем стратегию, основанную на регуляции фолдинга и активности дестабилизированного белка при помощи синтетических соединений. Мы разрабатываем новые высокоэффективные синтетические модуляторы на основе ранее полученных соединений-лидеров, таргетно воздействующих на мутантный белок p53(Y220C). Мы используем широкий спектр современных междисциплинарных подходов, включая органический синтез и оценку биологического действия соединений с использованием методов белковой биохимии, молекулярной и клеточной биологии. Биологические методы включают в себя оценку цитотоксичности, мониторинг клеточной пролиферации и жизнеспособности в режиме реального времени, количественную ПЦР обратной транскрипции, иммуноблоттинг, редактирование генома с помощью CRISPR-Cas9 (включая технологию редактирования оснований - Base Editing) и ряд других современных методов.

КАЛЬПАИНЫ: СВЯЗЬ С НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИЕЙ ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА И ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИЕЙ

И.В. Кондакова, Г.В. Какурина, Е.А. Сиденко, Е.С. Колегова, О.В. Черемисина, Л.А. Коломиец, С.Г. Афанасьев
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, НИИ онкологии Томск, Россия

В реализации механизмов опухолевой трансформации важна регуляция многочисленных клеточных процессов путем устранения белков, их модификации и/или образования пептидов, в этих процессах участвующих. Протеолитические системы путем деградации обеспечивают быстрый обмен белков, которые играют ключевую роль в становлении злокачественного фенотипа клеток и опухолевой прогрессии. Среди внутриклеточных протеаз важную роль играют кальпаины, которые относятся к кальций-зависимым цитозольным цистеиновым протеазам. В работе изучена активность и экспрессия мРНК кальпаинов 1 и 2 в тканях злокачественных опухолей и облигатного предрака, к которому относится гиперплазированный и диспластически измененный эпителий. Показано повышение содержания активности кальпаинов в ткани рака эндометрия по сравнению с гиперплазией. Однофакторный логистический регрессионный анализ показал, что активность кальпаинов в гипепластически измененной ткани эдометрия может быть независим предиктором развития рака. В ткани рака гортани отмечено повышение уровня экспрессии генов capn1, capn2 и активности кальпаинов в сравнении с группой пациентов с предопухолевой патологией гортани. Изучение связи активности кальпаинов с прорессированием рака эндометрия показало повышение этого показателя с увеличением глубины инвазии опухоли в миометрий и при увеличении стадии заболевания. В ткани колоректального рака активность кальпаинов была значительно выше у пациентов с гематогенным и лимфогенным метастазированием по сравнению с пациентами без метастазов и связана с появлением гематогенных метастазов после лечения. Также показано значимое увеличение экспрессии гена capn2 (в 5 раз) в опухолевой ткани гортани с метастазами в регионарный лимфатический аппарат по сравнению с опухолями без метастазов. Показана связь уровня экспрессии генов capn1 и capn2 с уровнем экспрессии генов snai1 и vim, кодирующих белки – регуляторы клеточной подвижности. Кроме того, экспрессия capn2 была связана с экспрессией генов, кодирующих актин-связывающие белки. Таким образом, кальпаины играют важную роль как в процессе канцерогенеза,так и в опухолевой прогрессии, которая выражалась в инвазивном росте и метастазировании злокачественных новообразований. Вероятно, кальпаины регулируют эти процессы, влияя на клеточную подвижность.

ТРЕХПЕТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ ЧЕЛОВЕКА LYNX1, SLURP-1 И SLURP-2 ПОДАВЛЯЮТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

М.А. Шулепко[1,2], М.Л. Бычков[1], О.В. Шлепова[1],З, А.В. Ефременко[1,2], Г.В.Шаронов[1,2], Д.С. Кульбацкий[1,2], А.В. Феофанов[1,2], Д.А. Долгих[1,2], М.П. Кирпичников[1,2], З.О. Шенкарев[1,3], Е.Н. Люкманова[1,2,3]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Московский физико-технический институт (Государственный университет, Москва, Россия

Никотиновые рецепторы ацетилхолина (nAChR) являются лиганд-зависимыми ионными каналами, активируемыми ацетилхолином и никотином. Эти рецепторы экспрессируются не только в нервной системе, но также играют важную роль в регуляции роста, миграции, дифференцировки и воспалительных процессов эпителиальных клеток. Известно, что с употреблением никотина связано развитие рака легкого, кожи, кишечника, груди и т.п. В настоящее время nAChR рассматриваются как перспективная мишень для терапии онкологических заболеваний. В нашей работе было изучено влияние рекомбинантных аналогов трехпетельных белков человека Lynx1, SLURP-1 и SLURP-2, модуляторов nAChR, на пролиферацию опухолевых клеток человека эпителиального происхождения. Было обнаружено, что SLURP-1 и SLURP-2 в наномолярных концентрациях подавляют рост клеток эпидермальной карциномы (линия A431), карциномы груди (линии SKBR3 и MCF-7) и колоректальной карциномы (линия HT-29), но не оказывают влияния на рост нормальных кератиноцитов (Het-1A) в этом диапазоне концентраций. Показано, что обработка клеток эпидермальной карциномы A431 препаратом рекомбинантного SLURP-1 снижает экспрессию nAChR α7 типа на поверхности опухолевых клеток и индуцирует секрецию эндогенного SLURP-1 из внутриклеточного депо, увеличивая его концентрацию во внеклеточной среде. Белок человека Lynx1 ранее был обнаружен в мозге, легких и почках. Мы обнаружили экспрессию Lynx1 также в клетках кожи, толстой кишки и молочной железы. Показано, что рекомбинантный аналог Lynx1 (ws-Lynx1) ингибирует рост клеток аденокарциномы легкого (линия A549), вызывая остановку клеточного цикла путем модуляции nAChR α7 типа и активации ряда внутриклеточных сигнальных каскадов. Инкубация клеток с ws-Lynx1 приводит к фосфорилированию проапоптотического белка-супрессора опухолей p53 и различных киназ, которые регулируют транскрипцию генов, рост, адгезию и дифференцировку клеток. Индукция апоптоза в клетках A549 под действием ws-Lynx1 была подтверждена проточной цитометрией с использованием фосфатидилсерина в качестве маркера раннего апоптоза. Полученные данные позволяют рассматривать рекомбинантные аналоги белков человека Lynx1, SLURP-1 и SLURP-2 как перспективные препараты для терапии опухолей эпителиального происхождения.

Работа выполнена при поддержке РНФ (№17-74-20161).

БЕЛОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА Tag7 ПРОЯВЛЯЕТ МНОГООБРАЗИЕ ФУНКЦИЙ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОМ ИММУНИТЕТЕ

Д.В. Яшин, Л.П. Сащенко, Т.Н. Шарапова, Е.А. Романова, О.К. Иванова
Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Нами было показано, что белок Tag7 может выполнять несколько различных функций в противоопухолевом иммунитете. Находясь на поверхности $CD4^+CD25^+$ лимфоцитов, он способен распознавать белок теплового шока Hsp70 на поверхности опухолевых клеток и способствовать лизису опухолевых клеток через FasL-Fas индуцированный апоптоз и некроптоз. Секретируемый в клеточную среду $CD8^+$ лимфоцитами при контакте с опухолевыми клетками комплекс белка Tag7 с белком Hsp70

обладает прямым противоопухолевым действием и способен индуцировать программируемую клеточную смерть в опухолевых клетках, несущих TNFR1 рецептор. При этом сам белок Tag7 и его пептид 17.1 способны взаимодействовать с рецептором TNFR1, препятствуя проведению сигналов через этот рецептор как от Tag7-Hsp70 комплекса, так и от TNF-alpha. Другой комплекс белка Tag7 с белком Mts1 участвует в хемотаксисе лимфоцитов, способных бороться с опухолями. В то же время сам белок Tag7 и его пептид 17.0 способны активировать в клетках крови человека противоопухолевую активность. В основе этого механизма лежит взаимодействие Tag7 и его пептида 17.0 с рецептором моноцитов TREM-1, что приводит к последующей секреции провоспалительных цитокинов и появлению цитотоксических для опухолевых клеток популяций лимфоцитов. Таким образом, нами были показано, что белок Tag7 играет важную роль в противоопухолевом иммунном ответе, а его комплексы меняют функции участвующих в них белков-партнеров Tag7 с опухолепротективных на противоопухолевые. *Проект был выполнен при финансовой поддержке гранта РНФ 15-14-00031-П.*

ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Л.М. Обухова, Е.И. Ерлыкина, Т.В. Копытова, Е.И. Мурач, О.В. Баринова, Л.Т. Мусаэлян
Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

Цель работы – топографический анализ активности процессов белкового обмена мозга. Материал и методы. Объект исследования- здоровая ткань продолговатого мозга и коры головного мозга человека (n=12), взятые посмертно. Определение концентрации общего белка проводили методом Лоури (набор реагентов «Фирма Синтакон», Россия), уровня миоглобина- с использованием эритроцитарного диагностикума (НПО «Диагностические системы», Россия) и иммунотурбодиметрически (набора «DiaSys Diagnostic Systems GmbH», Германия). Активность ферментов определяли: аминотрансфераз-оптимизированным УФ-тестом (наборы «DiaSys Diagnostic Systems GmbH», Германия); ацетилхолинэстеразы – методом Хестрина. Свободнорадикальную активность анализировали методом индуцированной биохемилюминесценции. Окислительную модификацию белков (ОМБ)- по уровню карбонильных производных (Дубинина и др., 1995). Результаты. В коре уровень суммарного белка значимо выше (в 1,37 раз), чем в продолговатом мозге. В ткани коры головного мозга по сравнению с тканью продолговатого мозга наблюдалось статистически значимое увеличение параметров свободнорадикальной активности (в 1,6 раза выше) и ОМБ (более, чем в 3 раза), что может быть обусловлено лучшим кровоснабжением коры. Активность АлАТ более высока в коре (430±23,85 Ед/л – в коре, 61±17,4 Ед/л в продолговатом мозге), а АсАТ- в продолговатом мозге (9±6,02 Ед/л – в коре, 23±4,41 Ед/л в продолговатом мозге). Данные результаты обусловлены различиями в энергопотреблении разных отделов мозга. Коре для нормальной работы требуется больше энергии, чем продолговатому мозгу, обменные процессы – в том числе и обмен белка – в ней проходят интенсивнее (Tomasi D et al., 2013). В норме в коре миоглобин не определяется, причем в продолговатом мозге наблюдается его следовые количества. В норме активность ацетилхолинэстеразы в коре значительно выше, чем в продолговатом мозге (более, чем в 3,5 раз), поскольку в коре количество нейронов выше. Кроме того, учитывая роль ацетилхолинэстеразы в регуляции пролиферации клеток (Grando, 2014), можно предположить, что эти процессы в исследованных отделах головного мозга протекают с различной интенсивностью.

Отличия обмена белков в коре и продолговатом мозге обусловлены различием физиологических процессов и интенсивностью кровоснабжения.

ФРАГМЕНТ РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ, ЗАЩИЩАЮЩИЙ ОТ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА, И ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ЕГО ДЕЙСТВИЯ

Т.Д. Волкова[1], Д.О.Короев[1], А.В. Аветисян[2], А.В. Камынина[1], М.Ю. Шимчишина[1], Н.В. Бобкова[3], О.М. Вольпина[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Одним из рецепторов, вовлеченных в патогенез болезни Альцгеймера, и возможной мишенью для создания новых средств терапии этого заболевания является рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE). Ранее нами был получен синтетический фрагмент последовательности (60–76) внеклеточного домена RAGE, который оказывает терапевтическое действие в животной модели болезни Альцгеймера, препятствуя ухудшению памяти у мышей, накоплению бета-амилоида в мозге и патологическим изменениям нейронов. При интраназальном введении флуоресцентно меченного пептида трансгенным мышам наблюдалась его солокализация с амилоидными бляшками в мозге. Была показана также способность пептида предотвращать токсическое действие бета-амилоида на первичной культуре нейронов в тесте активности каспазы 3. Нами было выдвинуто предположение, что один из возможных механизмов протективного действия пептида реализуется через его взаимодействие с бета-амилоидом, являющимся лигандом RAGE. С применением физико-химических методов показано, что в условиях *in vitro* пептид (60-76) связывается с бета-амилоидом, а также подавляет образование олигомеров бета-амилоида, которые, как известно, наиболее токсичны для клеток. В связи с этим мы полагаем, что взаимодействие с бета-амилоидом может играть важную роль в механизме защитного действия фрагмента (60-76) RAGE. *Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-04-00624.*

ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПАТОЛОГИЙ

В.Ф. Лазарев, Е.А. Дутышева, М.А. Микеладзе, Е.Ю. Комарова, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) – ключевой фермент гликолитического цикла. Тем не менее в последние годы учеными были продемонстрированы многие другие функции этого белка. ГАФД задействован в репарации ДНК, ответе

клетки на окислительный стресс, фермент участвует в апоптозной сигнализации. Неудивительно, что фермент принимает участие в многих патологических процессах, сопровождающих нейродегенеративные заболевания. Так, появление в нейронах или в межклеточном пространстве бета-амилоида либо развитие нейровоспалительных процессов неизбежно приводит к окислительному стрессу. Окисление фермента при нейродегенеративных заболеваниях приводит к формированию цитотоксичных агрегатов с участием ГАФД. Такие агрегаты способны выходить в межклеточное пространство и вызывать гибель окружающих клеток. ГАФД принимает участие в формировании токсичных белковых агрегатов при целом ряде нейродегенеративных патологий. Как правило, подобные комплексы он формирует вместе с мутантными белками, которые являются причиной возникновения заболеваний. Так, в нашей лаборатории был обнаружен механизм ковалентного взаимодействия ГАФД с мутантным хантингтином, мутантной супероксиддисмутазой, Абета1-42. Недавно нами было показано участие ГАФД в распространении вторичного повреждения после черепно-мозговой травмы (ЧМТ). Оказалось, что спустя 3 суток после ЧМТ ГАФД может формировать цитотоксические комплексы. Оказавшись в спинномозговой жидкости такие комплексы могут вызывать гибель нейронов. Таким образом, исследования, которые мы проводили в течение последних лет доказывают, что белок ГАФД является крайне перспективной мишенью для терапевтической интервенции при нейродегенеративных заболеваниях. За это время мы апробировали на клеточных и животных моделях нейродегенеративных патологий целый ряд малых химических соединений в качестве терапевтических средств, блокирующих участие ГАФД в патогенезе. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 19-34-80051.*

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ
Физико-химические методы исследования структуры пептидов и белков. Взаимосвязь «структура – функция»
Устные доклады

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ СЕМЕЙСТВА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ S1

О.В. Галзитская[1], О.М. Селиванова[1], А. В. Мачулин[2], С.Ю. Гришин[1], Е. И. Дерюшева[2]
[1]Институт белка РАН; [2]ФИЦ «Пущино» Научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия

Исследование распределения рибосомных белков среди различных таксономических групп живых организмов и выявления специфических признаков между ними и внутри каждой группы актуально для понимания эволюции белковых компонент рибосомы [1]. Семейство рибосомных белков S1 является уникальным белковым семейством, поскольку число структурных доменов в нем изменяется в строго ограниченном диапазоне: от одного до шести [2]. S1 белки связываются с мРНК, вовлечены в процессы инициации и трансляции *in vivo*, а также взаимодействуют с мРНК-подобной частью молекулы тмРНК [3]. Реализация алгоритма автоматического поиска и извлечения данных о доступных записях белка S1 в базе UniProt позволила сформировать выборку, содержащую 1453 белковых последовательностей. Анализ выборки показал, что рибосомный белок S1 идентифицируется в 25 бактериальных отделах. Кроме того, существует корреляция между числом структурных доменов и таксономическим бактериальным отделом. Например, 62% всех записей определяются как шестидоменные белки S1, и, в основном, относятся к отделу Proteobacteria. Четырехдоменные белки S1 преобладают в отделах Firmicutes и Actinobacteria. Записи, относящиеся к этим отделам, составляют 33% от всей исследуемой выборки. Наименее представленные двухдоменные S1 белки (0,6%). Таким образом, число структурных доменов в рибосомных белках S1 можно рассматривать как дополнительный уникальный признак для систематики бактериальных отделов. Отметим, что полученные результаты отличаются от данных, полученных на небольших выборках белков данного семейства [4], и должны рассматриваться как более точные. Дальнейшее исследование полученных данных позволит найти подтверждение одной из предложенных теорий эволюционного развития белков со структурными повторами: от многодоменных белков к однодоменным или обратно [5]. *Работа поддержана грантом РНФ № 18-14-00321.*

1. Andrade, M.A.; Perez-Iratxeta, C.; Ponting, C. P. Protein Repeats: Structures, Functions, and Evolution // Journal of Structural Biology. 2001, №134(2–3). p. 117–131.
2. Deryusheva, E.I.; Machulin, A.V; Selivanova, O.M.; Galzitskaya, O.V. Taxonomic Distribution, Repeats, and Functions of the S1 Domain-Containing Proteins as Members of the OB-Fold Family // Proteins. 2017, №85(4). p. 602–613.
3. Salah, P.; Bisaglia, M.; Aliprandi, P.; Uzan, M.; Sizun, C.; Bontems, F. Probing the Relationship between Gram-Negative and Gram-Positive S1 Proteins by Sequence Analysis // Nucleic Acids Research. 2009, №37(16). p. 5578–5588.
4. Sørensen, M.A.; Fricke, J.; Pedersen, S. Ribosomal Protein S1 Is Required for Translation of Most, If Not All, Natural MRNAs in Escherichia Coli in Vivo // Journal of Molecular Biology. 1998, №280(4). p. 561–569.
5. Yutin, N.; Puigbò, P.; Koonin, E.V; Wolf, Y.I. Phylogenomics of Prokaryotic Ribosomal Proteins // PLOS One. 2012, №7(5), e36972: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036972

СТРУКТУРА В РАСТВОРЕ, ДИНАМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КОМПОНЕНТОВ ТЕЛОМЕРАЗЫ

В.И. Польшаков[1], О.А. Петрова[2], А.Б. Манцызов[1], С.С. Марьясина[1,2], Е.В. Родина[2], А.Н. Малявко[2], Н.М. Шепелев[2], С.В. Ефимов[3], Т.С. Зацепин[4], М.Э. Зверева[2], О.А. Донцова[1,4]
[1]Факультет фундаментальной медицины и [2]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Институт физики, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; [4]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Теломераза представляет собой мультисубъединичный рибонуклеопротеиновый комплекс, ответственный за поддержание целостности генома в клетках эукариот. Представляет фундаментальный интерес механизм действия этого фермента. Кроме того, теломераза является важной фармакологической мишенью, поскольку бессмертие раковых клеток связано с экспрессией в них этого фермента, в отличие от большинства соматических клеток организма. Однако структура и молекулярный механизм действия теломеразы все еще недостаточно исследованы. Функция фермента основана на динамическом взаимодействии каталитической субъединицы (TERT) с теломеразной РНК (TER), теломерными участками ДНК и несколькими белками, входящими в состав рибонуклеопротеинового комплекса. В состав теломеразы дрожжей кроме TERT и TER входят регуляторные белковые субъединицы Est1 и Est3, необходимые для нормального функционирования фермента in vivo. В работе методом спектроскопии ЯМР исследованы N-концевой (TEN) домен TERT и субъединица Est3 из термотолерантных дрожжей Hansenula polymorpha. Выполнено практически полное отнесение химических сдвигов сигналов обоих белков. Определены структуры высокого разрешения этих белков в растворе и исследованы их динамические свойства. Изучены взаимодействия TEN-домена и Est3 с фрагментами РНК и ДНК, моделирующими вероятное окружение этих белков в теломеразе дрожжей. Полученные результаты позволяют предполагать, что TEN домен контролирует ограничение размера гетеродуплекса ДНК-РНК во время синтеза повторов теломер. Установлено, что Est3 участвует в формировании теломеразы посредством взаимодействия с Est1. *Исследование поддержано грантами РНФ № 14-14-00598 и 19-14-00115.*

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ ОДИНОЧНЫХ НУКЛЕОСОМ В СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ДНК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

А.В. Феофанов[1,2], Н.В. Малюченко[1], М.Е. Валиева[1], Н.С. Герасимова[1], А.В. Любителев[1], Г.А. Армеев[1], О.В. Чертков[1], А.К. Шайтан[1], Е.Ю. Котова[3], В.М. Студитский[1,3], М.П. Кирпичников[1,2]
[1]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [3]Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA

Метод флуоресцентной микроскопии одиночных частиц на основе эффекта Фёрстеровского резонансного переноса энергии (далее spFRET-микроскопия) был адаптирован нами для решения разнообразных задач, связанных со структурными исследованиями комплексов нуклеосом с ядерными белками. Для изучения таких комплексов нами были сконструированы флуоресцентно-меченые мононуклеосомы с линкерными участками ДНК различной длины и без них, а также со шпильками на концах нуклеосомной ДНК. Донор-акцепторная пара флуоресцентных меток, вводимая в линкерные участки ДНК или в соседние витки ДНК в различных областях (на границе или в центральной части) нуклеосомы, используется в данном методе, чтобы выявить структурные изменения в нуклеосомах, установить их локализацию и оценить масштаб. Применение spFRET-микроскопии позволяет обнаружить образование различных типов комплексов в сложных реакционных смесях и охарактеризовать их структурные особенности. Исследования комплексов проводятся в растворе в физиологических условиях и требуют ультра-малых количеств вещества для анализа. Возможности структурных исследований ДНК-белковых взаимодействий с использованием spFRET-микроскопии обсуждаются нами на примере опубликованных результатов [1-6] и новых экспериментальных данных, полученных при изучении комплексов нуклеосом с линкерным гистоном H1, с шапероном гистонов FACT и с поли(АДФ-рибоза)-полимеразой 1 (PARP1), отвечающей за репарацию разрывов ДНК в хроматине. *Исследования комплексов нуклеосом с PARP1 и FACT поддержаны соответственно грантами РФФИ 17-54-33045 и РНФ 19-74-30003.*

1. Sultanov D., et al. AIMS Genetics, 2017, 4(1), 21-31.
2. Valieva M.E. et al. Cancers, 2017, 9(1), pii: E3.
3. Valieva M.E. et al. Nat Struct Mol Biol. 2016, 23(12), 1111-1116.
4. McCullough et al. J Biol Chem. 2018, 293(16), 6121-6133.
5. Любителев А.В., и др. Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. 2016, № 2, 49-54.
6. Chang H.-W., et al. Science Advances, 2018, 4 (11), eaav2131.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ САМОСБОРКИ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА ПРЕДШЕСТВЕННИКА БЕТА-АМИЛОИДА В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

А.В. Скобёлкина[1,2], Е.В. Бочаров[3], О.В. Бочарова[3], М.В. Петухов[1,4,5], П.В. Конарев[1,6], О.В. Батищев[4], Э.В. Штыкова[1,5]
[1]Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Физический факультет; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [4]Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН; [5]Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН; [6]НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

В настоящей работе предпринята попытка определения с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния молекулярных механизмов начальных стадий самосборки Aβ-пептида, приводящих к формированию амилоидных фибрилл. Белок предшественник бета-амилоида (ПБА), с которым ассоциирован Aβ-пептид, является ключевым медиатором болезни Альцгеймера [1]. Этот трансмембранный белок в природе существует в липидном окружении, и, следовательно, нерастворим в водных средах. Для изучения его структуры используются липидные нанодиски, мицеллы, амфифильные полимеры и липосомы. На данном этапе работы был использован фрагмент белка ПБА (длиной 55 аминокислотных остатков: с 678 по 726), встроенный в

мицеллы. В результате измерений на синхротронном источнике излучения PETRA III, DESY, Гамбург, малоугловая линия P12 были получены кривые рассеяния от мицелл и комплекса мицелла-белок. При интерпретации данных и построении трехмерных моделей используется программный пакет ATSAS [2]. На первом этапе происходит моделирование трехмерной структуры мицелл из молекул детергента DPC для характеристики общей формы. Далее при помощи разностной кривой, полученной путем вычитания кривых, соответствующих мицеллам с белком и мицеллам без белка, проводится ab initio моделирование структуры белковой компоненты с помощью программы DAMMIN [3]. В результате удалось построить структурные модели низкого разрешения как для молекул белка, так и для мицелл. На их основе была получена модель комплекса ПБА-DPC. *Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Российского фонда фундаментальных исследований фонда (проекты 18-54-74001 EMBL_T, KOMFI 17-00-00487, KOMFI 17-00-00488 и 18-54-00019 Бел_а).*

1. Nadezhdin KD, Bocharova OV et al. Dimeric Structure of Transmembrane Domain of Amyloid Precursor Protein in Micellar Environment. FEBS Letters (2012) 586, 1687-1692.
2. Franke D, Petoukhov MV et al. ATSAS 2.8:a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. J. Appl. Crystallogr. (2017) 50: 1151–1158.
3. Svergun DI Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing (1999) Biophys J. 2879-2886.

РОЛЬ ПОСТ-ТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ БЕЛКОВ, СВЯЗАННЫХ С ИЗМЕНЕНИЕМ ЗАРЯДА, В БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ

П.И. Семенюк[1], А.А. Софронова[2], В.И. Муронец[1,2]
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского; [2] МГУ им. М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

Взаимодействие белков с заряженными макромолекулами важно для многих клеточных процессов. Так, клетки содержат множество природных полиэлектролитов – нуклеиновые кислоты, полифосфаты, сульфатированные гликозаминогликаны и другие заряженные полисахариды, а также другие белки [1]. При этом локальный заряд белка и, как следствие, его взаимодействие с другими макромолекулами, может существенно меняться в результате пост-трансляционных модификаций – например, неферментативного гликирования, фосфорилирования, а также осуществляемых специальными ферментами фосфорилирования и сульфатирования. Из-за сложности идентификации продуктов модификации и их получения *in vitro* экспериментальное изучение таких модификаций затруднено, поэтому в данной работе мы сфокусировались на молекулярном моделировании влияния перечисленных пост-трансляционных модификаций на белок-белковые взаимодействия с последующей проверкой экспериментальными методами. Так, исследовано влияние гликирования на взаимодействие амилоидогенного природн-развернутого белка альфа-синуклеина и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (ГАФД), вовлеченных в развитие болезни Паркинсона. Показано, что гликирование альфа-синуклеина усиливает взаимодействие с ГАФД и вызывает инактивацию фермента [2], в то время как гликирование ГАФД, наоборот, затрудняет связывание. При этом гликирование влияло и на поведение синуклеина в свободном виде. Кроме того, с помощью молекулярного моделирования исследована роль сульфатирования – модификации, во многом похожей на фосфорилирование, но значительно менее распространенной. Поскольку прочность взаимодействия сульфатированных полимеров с белками выше, чем фосфорилированных [3], была проверена гипотеза, что функция сульфатирования заключается в увеличении прочности белок-белковых взаимодействий, которое не может быть достигнуто фосфорилированием. *Работа поддержана грантом РНФ № 19-74-00013.*

1. P. Semenyuk and V. Muronetz, International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20, 1252.
2. P. Semenyuk, K. Barinova and V. Muronetz, International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 127, 278–285.
3. P. I. Semenyuk, V. I. Muronetz, T. Haertlé and V. A. Izumrudov, Biochim. Biophys. Acta, 2013, 1830, 4800–4805.

СТРУКТУРА ЭКТОДОМЕНА ИНСУЛИНОПОДОБНОЙ РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ, РЕГУЛИРУЮЩЕЙ КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОЙ БАЛАНС В ОРГАНИЗМЕ, ОПРЕДЕЛЕННАЯ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ И АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Э.В. Штыкова[1,2], М.В. Петухов[1,2,3,4], А.А. Можаев[1,5], И.Е. Деев[5], Л.А. Дадинова[1], Н.А. Лошкарев[3,6], С.М. Джеффрис[4], Д.И. Свергун[4], О.В. Батищев[3,6], А.Г. Петренко[5]
[1]Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва; [2]Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва; [3]Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия; [4]Европейская лаборатория молекулярной биологии, Гамбургский филиал, Гамбург, Германия; [5]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [6]Московский физико-технологический институт, Долгопрудный, Россия

Рецептор, подобный инсулиновому рецептору (IRR) принадлежит к суперсемейству рецепторных тирозинкиназ. IRR является близким структурным гомологом инсулинового рецептора и инсулиноподобного фактора роста, однако не связывается с их лигандами, но активируется при повышении pH внеклеточной жидкости, то есть функционирует как внеклеточный щелочной сенсор, участвующий в регуляции кислотно-щелочного баланса. Целью настоящей работы был анализ структурных особенностей эктодомена IRR с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и атомно-силовой микроскопии (АСМ) при нейтральном и щелочном pH. Структурное моделирование выявило pH-зависимую смесь двух конформаций в растворе: «открытой», аналогичной опубликованной ранее структуре эктодомена рецептора инсулина, и «закрытой» формы с более коротким расстоянием между доменами фибронектина двух цепей эктодомена IRR. Полученные с помощью МУРР результаты были подтверждены данными атомно-силовой микроскопии. Кроме того, такая структурная организация рецептора

соответствует биохимическим экспериментальным данным по pH-чувствительности IRR. В целом, результаты структурных исследований, полученные двумя независимыми методами, важны для понимания механизмов чувствительности рецепторов к щелочи и могут помочь в разработке новых терапевтических подходов для лечения заболеваний, связанных с нарушением кислотно-щелочного баланса и патологией клеток, в том числе некоторых видов рака. *Данная работа была выполнена при поддержке РФФИ (проекты KOMFI 17-00-00487, KOMFI 17-00-00488 и KOMFI 17-00-00489), а также Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.*

ТЕХНОЛОГИЯ «ДИНАМИЧЕСКОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО ПОРТРЕТА» В ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОМ АНАЛИЗЕ БЕЛКОВ И БИОМЕМБРАН

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

Детальный анализ меняющихся во времени свойств молекулярных поверхностей играет важную роль в процессах распознавания, взаимодействия и передачи сигналов в биомолекулярных системах. Технология «динамического молекулярного портрета» представляет собой современный подход к расчету, наглядной визуализации и сравнительному анализу различных физико-химических характеристик поверхности биомолекул. Эффективное использование таких подходов требует создания специальных методов компьютерной обработки, анализа и представления «молекулярных портретов». Описано применение технологии в работе с белками, мембранами и их комплексами. Показано, что в результате удается повысить точность решения задач молекулярного докинга белок-лиганд, белок-белок и белок-мембрана [1,2]. Кроме того, предложен оригинальный метод «белковой топографии» (МБТ) [3], который позволяет наглядно представить полную поверхность молекулы белка в виде двумерных карт. МБТ применяется также для выявления конформационных изменений между различными состояниями молекул, для проведения сравнительного анализа групп биообъектов, нахождения в них общих и специфических характеристик. Методы «динамического молекулярного портрета» в значительной степени дополняют современные технологии докинга, наглядно иллюстрируют комплементарность свойств поверхностей лиганда и белка-рецептора, позволяют охарактеризовать мозаичность поверхности клеточных мембран и т.д. Использование подобных технологий совместно с экспериментальными и независимыми вычислительными методами создает надежную основу для рационального конструирования новых биологически активных соединений с заданными свойствами [4]. *Благодарности. Работа выполнена при поддержке РНФ (грант 18-14-00375) и РФФИ (19-04-00350).*

1. Pyrkov T.V. et al. (2009) Bioinformatics. 25:1201.
2. Polyansky A.A. et al. (2014) Bioinformatics 30:889.
3. Koromyslova A.D. et al. (2014) J. Chem. Inf. Mod. 54:1189.
4. Kasheverov I.E. et al. (2016) Scientific Reports, 6:36848.

USE OF LIPODISKS FOR STRUCTURAL STUDIES OF HUMANS VOLTAGE-DEPENDENT ION CHANNELS

O.S. Sokolova[1], M.G. Karlova[1], N. Voskoboynikova[2], G.S. Gluhov[1], Yu.G. Kacher[1], A. Mulkidzhanyan[2], H.-J. Steinhoff[2], K.V. Shaitan[1]
[1]Moscow Lomonosov State University, Moscow, Russia; [2]University of Osnabrück, Osnabrück, Germany

Styrene-maleic acid (SMA) copolymers are used to extract lipid-encased membrane proteins from lipid bilayers in a detergent-free manner, yielding SMA lipid particles (SMALPs). Recently, the use of polymer nanodiscs for protein purification became a hot topic. So far, the characterizations in SMALPs were reported for small membrane proteins, including bacterial KcsA, ARC-B transporter and the human KCNE1 transmembrane subunit, expressed in E. coli. Information on the use of SMALPs for purification of large eukaryotic channels is limited to the human GPCR and eukaryotic ABC transporters, purified from isolated membrane fractions. Here, we report, for the first time, the application of SMALPs to the solubilization of full-length human Kv channels: pore forming α-subunits hKCNQ1 and hKCNH5, as well as the complex of the α-subunit hKCNQ1 with its auxiliary subunit hKCNE1. The importance of the studied channels is justified by the fact that hKCNQ1 belongs to cardiac voltage-dependent potassium channels, while hKCNH5 is found in the central nervous system. We used transient transfection of the COS-1 cells to overexpress the Kv channels and compared the effectiveness of their solubilization by SMA and detergent. We demonstrated that the SMA copolymer was more efficient at solubilization of the human KCNQ1 channels than CHAPS. The advantage of using SMALP is that the solubilized membrane proteins can be easily concentrated on Microcon concentrators without aggregation. A DLS experiment demonstrated that nanodiscs have the overall size of 15 nm, while negative stain electron microscopy revealed a four-fold symmetry within channel-containing SMALPs, which indicates that purified hKCNH5 and hKCNQ1 channels, as well as the hKCNE1-hKCNQ1 fusion construct, retained their structural integrity as tetramers. *The purification of ion channels by a SMA copolymer and their investigations were financially supported by the RFBR (Project #18-504-12045 to K.V.S.); DLS experiments were supported by the German Research Foundation (DFG) (Project #STE640/15 to H.-J.S.). Experiments on the purification of hKCNH5 ion channel were supported by the RSF young investigators grant (Project #18-74-00087 to G.S.G.).*

ТРИ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ ПРИВОДЯТ К ДИССОЦИАЦИИ ГЕКСАМЕРА Hfq БЕЗ РАЗВОРАЧИВАНИЯ

Н.В. Леконцева, В.В. Марченков, Г.В. Семисотнов, В.В. Филимонов
Институт белка РАН, Пущино, Россия

Hfq является широко распространенным РНК-связывающим гексамерным белком с очень стабильной структурой. С целью проведения термодинамических исследований были получены варианты белка из Pseudomonas aeruginosa с заменами в консервативных положениях Tyr55Trp и Asp9Ala. Несмотря на то, что оба положения находятся на поверхности контактов между

мономерами, замены приводили к лишь небольшому понижению стабильности гексамеров, не вызывая изменений в их вторичной структуре и укладке. Первая замена давала возможность использования флюоресценции для исследования диссоциации в широком диапазоне изменения концентрации белка. Было показано, что в присутствии сравнительно небольших количеств гуанидин гидрохлорида путем сильного понижения концентрации белка можно добиться распада гексамера на мономеры без их разворачивания, были определены термодинамические параметры диссоциации, а затем и разворачивания мономеров. Замена Asp9Ala предназначалась для подавления гидролиза белка при низких значениях pH (пара Asp-Pro), при которых проводились термодинамические измерения стабильности белка и его олигомеров. С целью изучения структуры изолированного мономера в отсутствие денатуранта была введена дополнительная замена Val43Arg, которая должна была создать большое напряжение на поверхности контактов между субъединицами в гексамере. Был получен рекомбинантный белок с заменами Asp9Ala/Val43Arg/Tyr55Trp, однако данная мутантная форма белка обладала низкой растворимостью, что исключало получение кристаллов белка или определения его структуры методом ЯМР. Тем не менее, нам удалось зарегистрировать его спектры КД и флюоресценции, которые практически не отличались от спектров промежуточного мономера варианта Tyr55Trp, наблюдаемого в ходе диссоциации гексамера. Кроме того, исследования денатурации тройного мутанта подтвердили, что его структура обладает стабильностью, сравнимой с таковой у варианта Tyr55Trp и белка дикого типа. Это свойство Hfq отличает его от аналогов типа GroES и указывает на сборку гексамера из свернутых мономеров.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР ДЛЯ ПОНИМАНИЯ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

К.С. Минеев, С.А. Гончарук, М.В. Гончарук, Э.Ф. Кот, В.А. Лушпа, Л.Е. Артемьева, 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 рецепторов, которые регулируют клеточный цикл и иммунный ответ, а также принимают участие в развитии многих тяжелых заболеваний, таких как рак и неиродегенерация. У битопных белков обычно наличествуют большие внемембранные домены и всего лишь одна трансмембранная (ТМ) спираль. Подобная архитектура препятствует кристаллизации 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 крупные фрагменты битопных белков, содержащие несколько различных доменов, чтобы восстановить реальную структуру полноразмерных рецепторов и правильно понять устройство белков в различных функциональных состояниях. В настоящей работе подобный подход использовался для изучения рецепторов p75NTR, TLR1, TLR4. Удалось показать, что для рецептора p75NTR большинство существовавших ранее представлений о механизмах активации оказались неверны - внутриклеточные домены белка не взаимодействуют между собой, а также с белками RIP2 и RhoGDI, состояние доменов никак не управляется ТМ участком. В случае TLR4 было показано, 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. На примере TLR1 мы продемонстрировали, что структура внутриклеточного TIR домена существенно отличается от структуры домена в кристаллическом состоянии. С использованием параметров ЯМР релаксации был найден интерфейс гомодимеризации TIR доменов, показано, что димеризация усиливается за счет взаимодействия с мембранами. Была построена первая модель полноразмерного толл-подобного рецептора, основанная на экспериментальных данных о всех доменах белка. В целом, результаты работы демонстрируют важность изучения структуры и динамики МБ в близком к нативному окружении.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-74-30014.

К ВОПРОСУ О ВОССТАНОВЛЕНИИ ПРОФИЛЕЙ РАССЕЯНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ В БЕЛКОВЫХ СМЕСЯХ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

П.В. Конарев[1,2], В.В. Волков[1]
[1]ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН; [2]НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Малоугловое рентгеновское рассеяние является эффективным методом исследования структуры биологических макромолекул в растворе в наноразмерном диапазоне. В последние десятилетия были разработаны алгоритмы восстановления формы частиц в монодисперсных растворах по данным малоуглового рассеяния, однако в ряде случаев экспериментальная кривая содержит вклады от нескольких типов частиц (компонент), что существенно усложняет их анализ. Тем не менее, существующие итеративные компьютерные алгоритмы позволяют определять минимальное число независимых компонент с использованием сингулярного векторного разложения, оценивать объемные доли компонент в случаях, когда их форма и структура известны, восстанавливать форму неизвестной промежуточной компоненты при эволюции системы с известными начальными и конечными состояниями [1, 2]. Особый интерес представляет задача нахождения профилей рассеяния компонент и соответствующих концентраций по малоугловым данным от растворов белковых смесей, полученных при использовании хроматографической колонки on-line. Существуют разные подходы к решению данной задачи, в частности это использование хемометрических методов, факторного анализа и методов нелинейной минимизации целевого функционала с ограничением области допустимых решений путем введения дополнительных критериев (штрафов) приемлемости решения [3, 4]. Возможности и условия применимости этих подходов будут рассмотрены на ряде теоретических и экспериментальных примеров. *Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.*

1. Konarev, P.V., Svergun, D.I. (2018) IUCr Journal, V. 5, p. 402-409

2. Herranz-Trillo, F., Groenning, M., van Maarschalkerweerd, A., Tauler, R., Vestergaard, B. & Bernado, P. (2017) Structure, V. 25, p. 5–15.
3. Hopkins, J. B., Gillilan, R. E. & Skou, S. (2017) J. Appl. Cryst., V. 50, p. 1545–1553
4. Meisburger, S. P., Taylor, A. B., Khan, C. A., Zhang, S., Fitzpatrick, P. F. & Ando, N. (2016) J. Am. Chem. Soc., V. 138, p. 6506–6516

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ЛИПИД II МЕМБРАН БАКТЕРИЙ: КЛЮЧЕВОЙ ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

А.О. Чугунов[1,2], И.С. Панина[1], Р.Г. Ефремов[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]НИУ «Высшая школа экономики», Москва, Россия

Устойчивость к антибиотикам стала глобальной угрозой здравоохранению во всём мире, обусловливая необходимость разработки новых классов эффективных антибактериальных веществ. Многие природные антимикробные пептиды (АМП; например, лантибиотики, яркий пример которых — низин; а также тейксобактин, открытый в 2015 году) действуют на уникальную мишень, специфическую для бактериальных биомембран, — липид II, нарушая синтез клеточной стенки и разрушая саму мембрану (что и лежит в основе их антибактериального действия). Центральной точкой специфического распознавания липида II является пирофосфатная группа (PPi), химически консервативная и потому представляющая перспективную фармакологическую мишень. Однако природные АМП, действующие на липид II, по разным причинам не могут стать клиническими антибиотиками, в связи с чем наша цель – выявить ключевой механизм распознавания PPi и предложить методами рационального дизайна химические структуры, ставшие бы основой для прототипов новых антибиотиков. С помощью технологий молекулярного моделирования, таких как молекулярная динамика и разработанная нами ранее Белковая топография [1], мы разработали атомистическую модель бактериальной мембраны, с помощью которой показали, что гибкая молекула липида II индуцирует в мембране «амфифильный паттерн» [2], предположительно участвующий в начальной стадии распознавания АМП бактериальных мембран. В этой работе мы изучили ключевые механизмы, при помощи которых различные АМП распознают PPi липида II. Уникально расположенные атомы кислорода в этой группе формируют специфический фармакофор, распознающийся направленной в единый центр системой водородных связей, доноры которых распределены оптимальным образом в изученных полициклических АМП. Найденные закономерности помогут создать новые молекулы, распознающие пирофосфатную группу липида II и лишенные недостатков природных АМП. Эти молекулы могут стать прототипами новых антибиотиков, лишенных бремени развития антибиотикорезистентности. *Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», а также гранта РНФ 19-74-30014.*

1. Koromyslova A.D., Chugunov A.O., Efremov R.G. Deciphering fine molecular details of proteins' structure and function with a Protein Surface Topography (PST) method. J. Chem. Inf. Model.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ МЕХАНИЗМОВ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ И АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ШАПЕРОНОВ

В.А. Борзова[1], Т.Б. Еронина[1], В.В. Михайлова[1], Н.А. Чеботарева[1], К.А. Маркосян[1], Д.А. Кара[1], С.Ю. Клейменов[1,2], В.В. Шубин[1], И.К. Юдин[3], Б.И. Курганов[1]
[1]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [2]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН; [3]Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина, Москва, Россия

Показана значимость установления кинетического режима и порядка агрегации по белку (n) для интерпретации данных. При n = 1 скорость-лимитирующей стадией общего процесса агрегации является стадия денатурации белка (примеры — дитиотреитол-индуцированная агрегация бычьего сывороточного альбумина (БСА) при 45 град. С, тепловая агрегация глутаматдегидрогеназы из печени быка (ГДГ) при 40 и 50 град. С) или стадия структурной перестройки денатурированных молекул (тепловая агрегация УФ-облученной гликогенфосфорилазы b (Ph b) при 37 град. С). При n = 2 скорость лимитируется стадией агрегации развернутых молекул белка (тепловая агрегация БСА при 70 град. С и апо-Ph b при 37 град. С, агрегация УФ-облученной Ph b при 10 град. С в условиях краудинга). Изучена и количественно охарактеризована с помощью ранее разработанных авторами оригинальных методов антиагрегационная активность химических шаперонов (пролина, аргинина и его производных — аргининамида и этилового эфира аргинина) в описанных выше модельных тест-системах. Наряду с непрямыми методами регистрации кинетических кривых агрегации (динамическое светорассеяние) использованы методы прямого определения доли агрегированного белка (гель-проникающая хроматография, фракционирование в поле асимметричного потока). Для анализа механизма агрегации предложен график соотношения между гидродинамическим радиусом агрегатов и долей агрегированного белка. Показано, что химические шапероны (полиамины, аргинин и его производные), повышение ионной силы, или присутствие краудинг-агента триметиламиноксида, вызывают слипание уже сформировавшихся агрегатов. *Работа частично поддержана грантом РНФ № 16-14-10055.*

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ ФОЛДИНГ И ОБРАЗОВАНИЕ КОНЪЮГАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПЕПТИД-БЕЛОК: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И МД МОДЕЛИРОВАНИЕ

О.Н. Рогачева[1,2], С.А. Измайлов[1], Д.А. Лузик[1], М.И. Индейкина[3], А.С. Кононихин[4], И.С. Подкорытов[1], Н.Р. Скрынников[1,5]
[1]Лаборатория био-ЯМР, Санк-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; [2]Отдел общей патологии и патологической физиологии, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; [3]Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, Москва; [4]Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва, Россия; [5]Факультет химии, Университет Пэрдью, Уэст-Лафайетт, Индиана, США

Нередко динамика пептидных и белковых систем представляет интерес в контексте формирования ковалентных связей. Например, это относится к окислительному фолдингу белков и методам биоконъюгации. Стандартные алгоритмы Молекулярной Динамики (МД) не располагают средствами для того, чтобы моделировать образование ковалентных связей. В своей работе мы постарались восполнить этот недостаток и разработали простой эмпирический алгоритм, позволяющий успешно моделировать такого рода процессы. Предлагаемый алгоритм не вносит возмущений в траекторию системы, не приводит к потере быстродействия и даёт возможность задавать желаемую скорость реакции.

Новый метод был применён для моделирования окислительного фолдинга пептида гуанилин, последовательность которого включает в себя четыре цистеина. Результаты нашего моделирования позволили полу-количественно воспроизвести распределение по изомерам, ранее наблюдавшееся в эксперименте. Сделанные нами оценки энергии привели нас к заключению о том, что окислительный фолдинг гуанилина протекает под кинетическим контролем. При этом была получена высококачественная структурная модель гуанилина, которая по нашему заключению превосходит неудачную экспериментальную структуру, полученную для укороченного варианта пептида. Помимо этого, нам также удалось успешно воспроизвести фолдинг гуанилина в составе прогормона прогуанилин с длиной последовательности в 94 аминокислотных остатка.

Для исследования процесса биоконъюгации был выбран комплекс N-терминального SH3 домена адаптерного белка Grb2 с пептидом Sos1X, полученным из нативного лиганда Sos1 и содержащим реакционноспособный остаток X – неприродную аминокислоту хлороацетил-лизин, вступающую в реакцию нуклеофильного замещения с остатком Cys32 белка-мишени с образованием тиоэфирной связи. С помощью методов 2D- и 3D-ЯМР, LC-MS/MS и SDS-PAGE были определены различные параметры этого взаимодействия, а также подтверждена специфичность реакции с остатком-мишенью. На основе полученных экспериментальных данных был создан протокол для МД моделирования процесса конъюгации. С его помощью были получены высококачественные модели конъюгатов N-SH3 Grb2 / Sos1X, достоверность которых была показана путем сравнения значений химических сдвигов рассчитанных из траекторий МД со значениями, полученными из экспериментальных ЯМР-спектров.

В заключение мы обсудим реализацию ковалентного пептида-ингибитора белка PD-L1 – известной мишени противораковой иммунотерапии. В этом качестве нами исследуется циклический пептид из библиотеки Бристол-Майерс Сквибб (пептид 57), в последовательность которого мы ввели неприродный реакционноспособный остаток K-FDNB-K (1-фтор–2,4-динитробензол–лизин). *Все исследования осуществлялись в рамках гранта РНФ 15-14-20038.*

ЛИПИД-БЕЛКОВЫЙ СИНЕРГИЗМ – ПУТЬ К ПЛАСТИЧЕСКОЙ, СВОБОДНОЙ ОТ СТРЕССА ДЕФОРМАЦИИ МЕМБРАНЫ

П.В. Башкиров
ФНКЦ физико-химической ФМБА России, Москва, Россия

Геометрические свойства многих самособирающихся макроскопических структур диктуются молекулярной формой ее компонентов. Следовательно, макроскопические деформации в этих структурах могут быть достигнуты путем перестановки компонентов с различной молекулярной формой, что подразумевает возникновение эмерджентного материального свойства – макроскопической энтропийной упругости. Мы показали, что данный механизм присущ биологическим мембранам. Показано, что липидный полиморфизм приводит к появлению двух независимых мод изгибных деформаций мембраны - материальной и энтропийной. Итоговая эффективная жесткость мембраны определяется из соотношения типа Гука для двух сцепленных пружин, приписывая наличие материальной и энтропийной «пружины» каждому мембранному компоненту. Данный формализм явно связывает молекулярные параметры компонентов с макроскопической упругостью самособирающейся из них структуры. На примере белков семейства динаминов показано, что взаимодействие белков с мембраной может быть описано в рамках разработанного формализма. Более того задействование энтропийной деформационной моды белками приводит к появлению липид-белкового синергизма, обеспечивающего пластическое изменение формы мембраны, от плоской до сильно искривлённой, что в свою очередь регулирует функциональную ГТФазную активность динамина. Данные результаты выявляют крайне важную физиологическую роль молекулярной формы липидов в регуляции клеточных процессов и важности липидного гомеостаза.

ВЛИЯНИЕ КРАУДИНГ-АГЕНТОВ И БЕЛКА-МИШЕНИ НА ЧЕТВЕРТИЧНУЮ СТРУКТУРУ sHsps

Н.А. Чеботарева[1], Т.Б. Еронина[1], С.Г. Роман[1], В.В. Михайлова[1], Н.Н. Случанко[1], Н.Б. Гусев[2], Б.И. Курганов[1]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [2]Кафедра биохимии, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Агрегация белка является универсальным процессом для всех клеток, который связывают с рядом нейродегенеративных заболеваний. Агрегации белков в клетке противодействуют шапероны, в частности, малые белки теплового шока (sHsps). В основе шапероноподобной активности sHsps лежит их взаимодействие с белком-мишенью. Все процессы в клетке протекают

в условиях краудинга, который усиливает белок-белковые взаимодействия, в том числе и агрегацию белка. Шапероны способны предотвращать агрегацию, но механизм их действия в условиях краудинга остается малоизученным. Динамичная четвертичная структура sHsps играет важную роль в проявлении шапероноподобной активности sHsps, однако взаимосвязь между олигомерным состоянием sHsp и его активностью оставалась плохо охарактеризованной, также противоречивыми были данные об изменении олигомерного состояния sHsp при тепловом стрессе. Методом аналитического ультрацентрифугирования показано, что при повышении температуры до 48˚C крупные олигомеры альфаB-кристаллина (HspB5) диссоциируют с образованием более мелких олигомеров, при этом уменьшается средний коэффициент седиментации, средний гидродинамический радиус и молекулярная масса олигомера. Большинство литературных данных об олигомерном состоянии sHsps были получены в разбавленных растворах, в то время как олигомерное состояние sHsps в условиях краудинга оставалось неизвестным. Изучено также влияние крадиунг-агентов на олигомерное состояние HspB5 в условиях теплового стресса (48˚C). Значительное увеличение коэффициента седиментации наблюдали в присутствии полиэтиленгликоля (PEG), поливинилпирролидона (PVP) и триметиламин-N-оксида (TMAO) при 48˚C. Особенно ярко выраженный эффект был зарегистрирован в присутствии смеси краудинг-агентов, PEG и TMAO, где коэффициент седиментации увеличился с 10,7 до 40,7 S, а молекулярная масса – с 444 до 1005 кДа. В присутствии смеси PEG + TMAO добавление модельного белка-мишени (мышечной гликогенфосфорилазы Б) индуцировало диссоциацию крупных олигомеров HspB5 и способствовало образованию более мелких комплексов. Это подтверждает идею, что в условиях краудинга и теплового стресса белки-мишени провоцируют диссоциацию крупных олигомеров HspB5. *Работа частично поддержана Российским научным фондом (грант 16-14-10055 для НАЧ, ТБЕ, ВВМ, БИК).*

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ
Химия и биология ферментов
Устные доклады

РОЛЬ ПОЛИ(ADP-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗ И РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В РЕПАРАЦИИ ДНК

О.И. Лаврик
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

В ответ на повреждение ДНК в клетках высших эукариот происходит модификация ядерных белков с помощью полимера ADP-рибозы (PAR), синтезируемого поли(ADP-рибоза)полимеразами 1 и 2 (PARP1/2) с использованием NAD+ в качестве субстрата. Их мишенями преимущественно служат белки, участвующие в укладке хроматина и метаболизме ДНК, включая гистоны, белки репарации ДНК и транскрипционные факторы, а также сами PARP. Недавно мы обнаружили новые мишени PAR-илирования, в их числе Y-box-связывающий белок 1 (YB-1). Этот полифункциональный РНК-связывающий белок гиперэкспрессирован в клетках опухолей, устойчивых к химиотерапии. Внутренняя неупорядоченная структура и положительный заряд этого белка обеспечивают его способность взаимодействовать с ДНК, РНК и PAR и участвовать во многих клеточных процессах. Мы показали, что YB-1 способен стимулировать активность PARP1, тем самым снижая эффективность действия ингибиторов этого фермента (Alemasova et al, Oncotarget, 2018; Alemasova & Lavrik, Nucleic Acids Res, 2019). Мы также обнаружили, что для стимуляции PARP1 необходим С-концевой домен YB-1, и функциональные взаимодействия YB-1 и PARP1 могут быть опосредованы поли(ADP-рибозой). Среди белков, обнаруженных на поврежденной ДНК, одним из наиболее распространенных является мРНК-связывающий белок FUS, что позволяет предположить его участие в репарации ДНК. Мы реконструировали систему PARP-1/PAR/ДНК in vitro и проанализировали роль FUS на уровне одной молекулы методом атомно-силовой микроскопии Singatulina et al, Cell Rep, 2019). Нам удалось последовательно продемонстрировать диссоциацию FUS от мРНК, рекрутирование его в места повреждения ДНК посредством связывания с PAR и сборку компартментов, обогащенных поврежденной ДНК. Гидролиз PAR, катализируемый ферментом поли(ADP-рибоза)гликогидролазой (PARG), приводит к диссоциации компартментов на поврежденной ДНК in vitro и инициирует в клетках перемещение FUS из ядра в цитоплазму. В соответствии с ранее предложенными моделями можно ожидать, что FUS способствует репарации ДНК посредством временной компартментализации сайтов повреждения ДНК. Нуклеоцитоплазматический транспорт FUS после PARG-опосредованной диссоциации компартмента может участвовать в образовании цитоплазматических агрегатов FUS. *Работа поддержана грантом РНФ (19-14-00107).*

КЛЮЧЕВОЙ ФЕРМЕНТ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ – НОВАЯ МИШЕНЬ МОДИФИКАЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА) ПОЛИМЕРАЗОЙ 1 ПО НЕОБЫЧНОМУ МЕХАНИЗМУ

Н.А. Моор, И.А. Васильева, О.И. Лаврик
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1) человека – полифункциональный белок, вовлеченный в эксцизионную репарацию оснований ДНК (BER), регуляцию экспрессии генов, процессинг и репарацию РНК. Его основная функция в процессе эксцизионной репарации оснований - специфическое расщепление 5’-фосфодиэфирной связи апуринового/апиримидинового (AP) сайта. AP-сайты - наиболее многочисленные повреждения ДНК, возникающие в результате спонтанного гидролиза N-гликозидной связи и при удалении поврежденных оснований ДНК-гликозилазами. Поли(АДР-рибоза) полимераза 1 (PARP1) участвует в регуляции различных путей репарации ДНК и других клеточных процессов путем автомодификации и

модификации белков-мишеней поли(АДР-рибозой) (PAR). PARP1 активируется при взаимодействии с одно- и двухцепочечными разрывами ДНК. Функциональная кооперация APE1 и PARP1 в процессе BER показана в ряде исследований *in vitro*. В основе ее лежат прямые взаимодействия белков и их конкуренция за взаимодействие с разными ДНК-интермедиатами BER. Нами впервые показана PAR-связывающая активность APE1 и ковалентная модификация, катализируемая PARP1. Эффективность модификации зависит от структуры ДНК, активирующей PARP1: наличия в дуплексе повреждения и его типа (интактный или расщепленный AP-сайт, или однонуклеотидная брешь), а также от нуклеотидной последовательности AP-сайт-содержащей ДНК. Результаты исследования указывают на то, что сродство APE1 к ДНК, локальная структура ДНК в районе AP-сайта и длина дуплекса с 3'-стороны AP-сайт-несущей цепи контролируют эффективность поли(АДР-рибозил)ирования. Предложен механизм модификации в тройном комплексе APE1 и PARP1 с ДНК и показано, что он не является общим для ДНК-зависимых PARP. Сайты модификации локализованы в С-концевом каталитическом домене APE1. В нековалентном взаимодействии APE1 с PAR участвует наряду с каталитическим доменом N-концевой неупорядоченный фрагмент, специфичный для эукариот. Модификация APE1, катализируемая PARP1, представляет собой новый механизм кооперации ключевых участников BER, который может играть функциональную роль в регуляции процессов репарации ДНК. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда научных исследований (грант №19-1400107).*

СПЕЦИФИЧНОСТЬ УЗНАВАНИЯ КОНФОРМАЦИОННО СЛОЖНЫХ СУБСТРАТОВ ФЕРМЕНТАМИ РЕПАРАЦИИ ДНК И ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

Д. О. Жарков[1,2]
[1]Новосибирский государственный университет; [2]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Многие ферменты, участвующие в репарации и редактировании геномной ДНК, сталкиваются с задачей поиска редко встречающихся мишеней среди огромного избытка конкурирующей неспецифичной ДНК. Такие мишени могут представлять конкретные или консенсусные последовательности ДНК, либо модифицированные нуклеотиды и неканонические структуры ДНК. При поиске должен соблюдаться необходимый баланс между скоростью нахождения мишени и частотой ошибок (нераспознавание мишени или ошибочное распознавание нецелевой ДНК), причем ошибки могут приводить к огромным затратам для клетки вплоть до ее гибели. Механизмы, с помощью которых ДНК-зависимые ферменты достигают оптимального баланса между скоростью и точностью, в значительной степени неясны. Ферменты репарации ДНК находят свои мишени путем быстрой одномерной диффузии по контуру ДНК с периодическими редкими событиями переноса на другой участок ДНК, удаленный по контуру, но близко расположенный в трехмерном пространстве относительно текущего местоположения. Этот поиск облегчается неупорядоченными N- или С-концевыми доменами, присутствующими во многих ферментах и, по-видимому, эволюционировавшими из высокодивергентных повторов коротких последовательностей. Одномерная диффузия может использоваться и для других целей: так, например, некоторые вирусы сумели приспособить урацил-ДНК-гликозилазы в качестве факторов процессивности своих ДНК-полимераз. Ферменты репарации при поиске мишеней активно используют непрямое узнавание, пытаясь деформировать ДНК для первичной оценки наличия повреждения. При обнаружении такой «слабой точки» основание выворачивается из двойной спирали, преодолевая несколько энергетических барьеров, что позволяет ферменту не допускать в активный центр нормальные основания. Узнавание в активном сайте вносит небольшой вклад в специфичность, причем скорость собственно каталитической стадии в основном зависит от взаимодействий с фрагментами ДНК в стороне от повреждения. С другой стороны, РНК-направляемая нуклеаза Cas9, по-видимому, не способна диффундировать по ДНК, и ее специфичность определяется исключительно сравнительной стабильностью дуплекса ДНК и гетеродуплекса ДНК-РНК в области мишени. Мутации Cas9, селективно дестабилизирующие гетеродуплекс, снижают эффективность действия фермента, но повышают его точность.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ КЛЮЧЕВЫМИ БЕЛКАМИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК-«МИСМАТЧЕЙ» И ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫМ ПАРАЛЛЕЛЬНЫМ G-КВАДРУПЛЕКСОМ В ДНК

А.В. Павлова[1], М.В. Монахова[2], Н.Г. Долинная[1], В.Ю. Савицкая[1], Т.С. Орецкая[2], Е.А. Кубарева[2]
[1]Химический факультет и [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Система репарации неканонических пар нуклеотидов («мисматчей») и небольших петель (MMR), способствует сохранению целостности генома, препятствуя накоплению мутаций. Ключевыми компонентами системы являются белки MutS и MutL, проявляющие ДНК-связывающую и АТФазную активность. MutS отвечает за узнавание «мисматча». Образование комплекса MutS-ДНК-MutL активирует в клетках E. coli эндонуклеазу MutH, которая вносит одноцепочечный разрыв в содержащую «ошибку» цепь ДНК. В большинстве других бактерий и в эукариотах MutH отсутствует, а гидролиз фосфодиэфирной связи в ДНК выполняет С-домен белка MutL. MutS способен узнавать не только «мисматчи», но и неканонические структуры ДНК, в частности, G-квадруплексы (G4). Нами впервые изучено влияние G4 на функционирование MMR E. coli (ec) и *Rhodobacter sphaeroides* (rs). Для этого сконструирована линейная модель ДНК со всем набором элементов, необходимых для инициации MMR в *E. coli* (G/T-пара и участок узнавания белка MutH), в которой внутримолекулярный G4 параллельной топологии закреплен внутри двуспиральной структуры. Наличие G4-вставки в линейной ДНК доказано методами УФ-, КД- и ЯМР-спектроскопии и «футпринтинга». Охарактеризовано сродство белков ecMutS и rsMutS к 76-звенному совершенному и «мисматч»-содержащему дуплексам, а также к ДНК со вставкой G4 или выпетленным участком, в состав которого входят повторы GT, в присутствии АДФ, АТФ и негидролизуемого аналога АТФ – АТФγS. Белки MutS из обеих бактерий проявляют наибольшее сродство к G4-ДНК по сравнению с другими ДНК-лигандами во всех рассмотренных условиях. Эффект особенно выражен для rsMutS в присутствии АТФγS. Поскольку ДНК-связывающая и АТФазная функции MutS взаимозависимы, мы исследовали скорость гидролиза АТФ в присутствии сконструированных ДНК. Наблюдается существенное увеличение

начальной скорости реакции при добавлении ДНК, однако наличие G4 внутри двуспиральной структуры не влияет на АТФазную активность ecMutS. Белок ecMutL в 2-3 раза эффективнее взаимодействует с G4-ДНК по сравнению с «мисматч»-содержащей ДНК. rsMutL также образует стабильный комплекс с таким лигандом; показано, что в этом взаимодействии участвует С-концевой (каталитический) домен белка. Несмотря на большее сродство ecMutS и ecMutL к ДНК с квадруплексом, комплекс этих белков с эндонуклеазой MutH не дискриминирует G4. Механизм и функциональная значимость эффективного связывания MutS и MutL из разных бактерий с G-квадруплексами находятся в стадии изучения. *Работа проводилась при поддержке РФФИ (грант № 18-34-00768*).

МЕХАНИЗМЫ ТРАНСКРИПЦИИ ПОВРЕЖДЕННОЙ ДНК БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ

А.В. Кульбачинский, А.А. Агапов, М.А. Простова, Д.М. Есюнина
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Перемещение РНК-полимеразы по матрице ДНК в ходе транскрипции происходит неравномерно, с многочисленными остановками, которые могут быть вызваны сигналами пауз, ошибками в синтезе РНК или наличием в ДНК повреждений. РНК-полимераза является одним из основных сенсоров повреждений ДНК в клетке, привлекая в поврежденные участки факторы репарации. В нашей работе исследуются механизмы, контролирующие остановку транскрипционных комплексов в участках ДНК, содержащих сигналы пауз и различные типы повреждений, а также роль регуляторных белков в узнавании таких участков и координации процессов транскрипции и репарации. Нами показано, что РНК-полимеразы различных бактерий, в том числе, экстремофилов, узнают неканонические и поврежденные нуклеотиды в составе ДНК-матрицы сходным образом. Установлено, что различные модификации ДНК, нарушающие комплементарные взаимодействия, способны значительно ингибировать транскрипцию, а также снижать точность синтеза РНК. Охарактеризованы мутации в активном центре РНК-полимеразы, которые могут как снижать, так и увеличивать эффективность транскрипции поврежденных матриц. Изучена роль факторов транскрипции и репарации (Gre-подобные белки, Mfd-транслоказа) в регуляции активности РНК-полимеразы и разборке транскрипционных комплексов в поврежденных участках ДНК. Полученные данные показывают, что регуляторные факторы могут значительно изменять эффективность транскрипции поврежденной ДНК, обеспечивая взаимосвязь процессов транскрипции и репарации. *Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ 17-14-01393.*

НОВОЕ СЕМЕЙСТВО БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕАЗ

И.В. Демидюк[1], К.Н. Чухонцева[1], М.А. Карасева[1], Д.Р. Сафина[1], Т.Н. Бозин[1,2], Э.В. Бочаров[3], П.В. Конарев[2,4], В.В. Сальников[5], С.В. Костров[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]НИЦ «Курчатовский институт»; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [4]Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва; [5]Казанский (Приволжский) федеральный университет и Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Осуществляя ограниченный высокоспецифичный гидролиз белков, в каждой клетке и организме протеазы регулируют множество разнообразных жизненно важных процессов. Активность протеаз в свою очередь строго и тонко регулируется. Имеющиеся данные демонстрируют, что важную роль в контроле протеолитической активности играют селективные белковые ингибиторы, которые, однако, остаются малоизученными. Во многих случаях биологические функции известных ингибиторов остаются невыясненными, и, по-видимому, значительное количество ингибиторов до сих пор не открыто. В ходе исследований протеализинподобных протеаз (ППП) – группы металлопротеаз, которые по полученным нами ранее и опубликованным другими исследователями данным участвуют во взаимодействии бактерий с высшими организмами и, по-видимому, являются факторами патогенности, нами было обнаружено, что гены ППП в геномах бактерий колокализованы с генами небольших гипотетических белков. Поскольку такая ассоциация предполагает общую функцию, мы получили гипотетический белок из *Serratia proteamaculans* в клетках *E. coli* и охарактеризовали его. В ходе исследований было установлено, что гипотетический белок является ингибитором ППП, а также других пептидаз, относящихся к семейству M4. Было продемонстрировано, что у *S. proteamaculans* гены ППП и ингибитора входят в состав оперона, а ингибитор имеет внутриклеточную локализацию. С использованием методов спектроскопии ЯМР и малоуглового рентгеновского рассеяния была определена пространственная структура ингибитора и установлено, что белок имеет уникальную пространственную укладку. Биоинформатический анализ показал, что гомологичные ингибитору из S. proteamaculans белки встречаются у тысяч бактерий, относящихся к 11 таксономическим типам. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что нами открыто новое семейство белковых ингибиторов протеаз. Ассоциация с ингибиторами нового семейства заставляет пересмотреть представления о функциях ППП у бактерий. Наши результаты позволяют предположить, что действие ингибитора направлено на подавление активности ППП, попадающих в бактериальную клетку извне. Это приводит к гипотезе об участии ППП не только во взаимодействии бактерий с высшими организмами, но и в межбактериальной конкуренции. *Работа поддержана грантом РФФИ №19-04-00756.*

АКТИВНОСТЬ НАТИВНОГО И ИММОБИЛИЗОВАННОГО ЛИЗОЦИМА НА КЛЕТКАХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* И ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *MICROCOCCUS LUTEUS* В ПРИСУТСТВИИ ЗАРЯЖЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ И ГЛИЦИНА

П.А. Левашов[1,2], Д.А. Матолыгина[1,2], Е.Д. Овчинникова[3], И.Ю. Адамова[3,4], Д.А. Гасанова[1], С.А. Смирнов[1,2], В.А. Нелюб[2], Н.В. Карелина[2], Н.Г. Белогурова[1], В.И. Тишков[1], Н.Л. Еремеев[1], А.В. Левашов[1]
[1]Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Межотраслевой инжиниринговый центр композиционных материалов МГТУ им. Н.Э. Баумана; [3]Институт экспериментальной кардиологии, НМИЦ кардиологии МЗ РФ; [4]НПФ «ПОКАРД», Москва, Россия

Обнаружено, что присутствие в растворе ряда свободных аминокислот драматически меняет эффективность антибактериального действия лизоцима. Глицин и положительно заряженный гистидин усиливают бактериолитическое действие лизоцима на клетках *Escherichia coli* более, чем в два раза. Зависимости активности лизоцима от концентрации аминокислот представляют собой кривые с максимумом при концентрациях 1 мМ глицина и 6 мМ гистидина соответственно. Глицин и гистидин не влияют на скорость лизиса клеток *Micrococcus luteus* в присутствии лизоцима. Положительно заряженные лизин и аргинин усиливают бактериолитическое действие лизоцима на клетках *E. coli* более, чем в три раза. Зависимости активности лизоцима от концентрации лизина и аргинина представляют собой кривые с насыщением с максимальными значениями при концентрации аминокислот 10^{-15} мМ. Лизин и аргинин не влияют на скорость лизиса клеток *M. luteus* в присутствии лизоцима. Отрицательно заряженные аминокислоты глутамат и аспартат усиливают действие лизоцима и для *E. coli* и для *M. luteus*, но в случае *E. coli* эффект более выраженный. Активность лизоцима усиливается более, чем в 2 раза в присутствии глутамата и более чем в 1,5 раза в присутствии аспартата. Зависимости активности лизоцима от концентрации глутамата и аспартата представляют собой кривые с насыщением с максимальными значениями при концентрации аминокислот 10^{-15} мМ. Ковалентная иммобилизация лизоцима уменьшает эффекты усиления бактериолитического действия в присутствии аминокислот во всех случаях. Обнаруженные эффекты влияния свободных аминокислот на действие лизоцима требуют дальнейшего пристального изучения, поскольку эта информация открывает новые аспекты в функционировании врождённого иммунитета, а также даёт ключ к созданию новых видов антибактериальных лекарственных препаратов. *Работа поддержана в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» по теме «Создание новых медицинских сорбционных материалов для экстракорпоральных методов лечения сепсиса, сочетающих противомикробное действие и способность к сорбции бактериальных токсинов». Шифр заявки 2017-14-576-0053-142. Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57417X0181. Соглашение № 14.574.21.0181.*

KINETIC ANALYSIS OF COMPLEX CATALYTIC AND INHIBITORY BEHAVIORS OF CHOLINESTERASES BY A NEW COMPETING SUBSTRATE PROGRESS CURVE APPROACH

Patrick Masson[1*], Sofya V. Lushchekina[2], Aliya R. Mukhametgalieva[1], Marko Goličnik[3]
[1]Neuropharmacology Laboratory, Kazan Federal University, Kazan, Russia; [2]Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; [3]Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ljubljana, Slovenia

Cholinesterases, key enzymes in the cholinergic system, reacting with ester-containing drugs, xenobiotics and toxicants, display a complex kinetic behavior. The kinetic complexity is manifested by activation or inhibition by excess substrate, hysteretic behavior, and slow-binding processes. Complexicity results from the unique single-domain enzyme structure with a peripheral anionic binding site (PAS), a catalytic center deeply burried in the middle of the protein, and a molecular dynamics, tuning induced fit and allowing slow association/dissociation of ligands from the catalytic center.

Most kinetics studies of cholinesterases have been performed under steady state conditions or pre-steady state conditions using stopped-flow methods. Kinetic analysis from integrated rates of progress curves has not been used until it was possible to integrate rate equations. Progress curve analysis was even less used in the case of reactions involving competition between two substrates and competition between substrate and inhibitor.

We developed a general formalism which makes possible to investigate the effect of an invisible competitor (B) on the progress curves of a reporter ('visible') substrate (A). Rate equations are integrated for Michaelis-Menten model and for enzyme activation or inhibition by excess of B (Webb-Radic model, involving binding of B on the PAS that allosterically affects k_{cat} as $b.k_{cat}$ with $b>1$ for activation and $b<1$ for inhibition). The shape of progress curves for hydrolysis of A in the presence of B depends on the competition matrix, R, the ratio of bimolecular rate constants between B and A, $(k_{cat}/K_m)_{B/A}$. Mathematical solutions exist for $R>>1$, $R = 1$, $R<<1$. Working at constant substrate A concentration and varying concentration of B, from the shape of progress curves (sigmoidal or non-sigmoidal), it is possible: 1) to define the type of competitor; 2) to determine both catalytic and inhibition parameters from the dependence on [B] of retardation time at 90% completion of A, and at inflexion point for sigmoid-like shaped progress curves; 3) to determine $K_{m,A}$ or $K_{m,B}$ and K_{iB} from initial velocity ratio (v_i/v_0 *vs* [B]).

Kinetic analysis of human acetyl- and butyryl-cholinesterase with competing thio/oxo-esters, arylacylamides and different reversible inhibitors, covering all R situations, provided catalytic parameters and new mechanistic information, in particular about the significance of the *b* factor.

Supported by the Russian Science Foundation (project 17-14-01097) to P.M.

UNRAVELLING THE SECRETS OF PHOSPHORYL TRANSFER ENZYMES

Jonathan P. Waltho
University of Manchester and University of Sheffield, United Kingdom

Recently, our group has focused on enzymes that catalyse the transfer of phosphoryl groups, where the non-catalysed reactions can be among the slowest known for a physiological process: phosphate monoesters, for example, have calculated lifetimes to spontaneous

hydrolysis of up to 10^{12} years. We are using a range of phosphoryl transfer enzymes to illustrate what contributes to the very high levels of catalysis achieved by these enzymes. Using a combination of multinuclear NMR spectroscopy, high resolution X-ray crystallography, synthetic chemistry and computational chemistry we have explored the conformational behaviour of enzymes under a very wide range of conditions. Specifically, we have examined what happens during domain folding, during assembly of the native enzyme, during substrate binding, and during transition state binding. The introduction of metal fluoride species to mimic the ground states and the transition state of the transferring phosphate group has allowed us to dissect the steps involved in catalysis, and to dissect electronic contributions made by the enzymes. In particular, these enzymes illustrate how the charge distribution in the close vicinity of the transferring phosphate is tightly controlled by the enzyme, and how the near transition state complex conformation reacts to modulation of these charges.

Some relevant publications

Cliff, M. J. *et al., J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 6507-6516.
Marston, J. P. *et al., J. Mol. Biol.* 2010, 396, 345-360.
Baxter, N. J. *et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 4555-4560.
Liu, X. *et al., J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 3989-3994.
Griffin, J. L. *et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 6910-6915.
Jin, Y. *et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 12384-12389.
Jin, Y. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 4110-4128.
Johnson, L. A. *et al., ACS Catal.*, 2018, 8, 8140-8153.

ЭКЗОГЕННЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ НАРУШАЮТ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК К ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

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

Накопленные данные по цитотоксическим свойствам рибонуклеаз (РНКаз) и данные об участии опухолеспецифических микроРНК в канцерогенезе продемонстрировали перспективность использования экзогенных РНКаз в качестве противоопухолевых препаратов. Установление опухоль-ассоциированных мишеней цитотоксической активности РНКаз представляет несомненный интерес как для понимания молекулярного механизма цитотоксичности этих ферментов, так и для разработки новых, эффективных средств противоопухолевой терапии. Экзогенные РНКазы проявляют избирательную токсичность к опухолевым клеткам. Причины такой селективности не совсем ясны и их следует искать в свойствах, которые отличают злокачественные клетки от нормальных. Во время онкотрансформации клетки приобретают свойства, позволяющие им адаптироваться к изменяющейся окружающей среде, такие как устойчивость к гипоксии, изменения внутриклеточного pH, нарушение ионного транспорта, снижение адгезии и повышение подвижности, а также продукцию специфических экзосом. Эти механизмы адаптации отличают злокачественные клетки от нормальных и дают им конкурентное преимущество, обеспечивая выживание и распространение в организме. В нашей работе исследована связь направленного цитотоксического эффекта экзогенных РНКаз с нарушением адаптационного потенциала опухолевых клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ №17-00-00061.

ЦИСТЕИНОВЫЕ КАТЕПСИНЫ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ: ОТ МЕХАНИЗМОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ АКТИВАЦИЮ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ, К ФУНКЦИЯМ И ПРАКТИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ

А.А. Замятнин (мл.)[1,2]
[1]Институт молекулярной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет);
[2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Папаин-подобные цистеиновые протеиназы широко распространены у представителей различных царств живых организмов. Впервые некоторые свойства папаина - протеиназы, давшей название целой группе ферментов, были описаны почти 150 лет назад. С тех пор папаин, а также его гомологи из растений активно изучаются и находят широкое применение в биотехнологии и биомедицине. В геноме человека идентифицированы и экспрессируются гены одиннадцати папаин-подобных цистеиновых протеиназ, известных как цистеиновые катепсины. До недавнего времени считалось, что эти ферменты, в основном, вовлечены в процессы неспецифичной деградации белков в эндолизосомальной системе. К настоящему времени становится все более очевидным, что кроме обеспечения процессов деградации белков, многие цистеиновые катепсины участвуют в патологических процессах, таких как рак, ревматоидный артрит, а также воспаление. Показано, что при этих патологиях цистеиновые катепсины обычно функционируют в условиях, существенно отличающихся от условий, характерных для эндолизосомальной системы. В нашей работе было проведено исследование влияния условий, нехарактерных для лизосом, на активацию и специфичность ряда папаин-подобных цистеиновых протеиназ. В ходе исследования были также выявлены молекулярные механизмы, определяющие отличия функционирования ферментов в эндолизосомальной системе от функционирования в других внутриклеточных компартментах или в межклеточном пространстве. Полученные результаты расширяют представления о функциях папаин-подобных цистеиновых протеиназ, что имеет важное значение при использовании этих ферментов в биотехнологии и биомедицинских продуктах.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-10410).

α-N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИНИДАЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ВЛИЯНИЕ НА ЕЕ АКТИВНОСТЬ МЕТАБОЛИТОВ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ

И.Ю. Бакунина, О.С. Маляренко, Л.К. Шубина, Т.Н. Макарьева, Н.И. Кулеш, Н.Д. Похило, С.П. Ермакова
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Изучение процессов гликозилирования и дегликозилирования в раковых клетках и межклеточном пространстве опухоли является актуальной проблемой. Изменение гликозилирования запускает процессы, ведущие к образованию метастазов опухолей. Известно из литературы, что α-N-ацетилгалактозаминидаза (альфа-NaGalase) продуцируется клетками всех злокачественных опухолей и накапливается в плазме крови больных, при этом уровень активности фермента и множественность его форм с различными оптимумами pH повышается в сыворотке крови, особенно на начальной стадии болезни и стадии метастазирования. Целью представленной работы, является изучение свойств альфа-NaGalase раковых клеток различного типа и определение влияния природных соединений на активность фермента. В докладе дан анализ состояния исследований по альфа-NaGalase раковых опухолей на сегодняшний день. Нами выделена и очищена альфа-NaGalase из клеток меланомы RPMI-7951 и SK-MEL-28, карциномы толстого кишечника DLD-1, HT-29 и HCT-116, рака молочной железы человека MDA-MB-231 и T-47D, а также из культур нормальных клеток человеческой почки HEK-293 и мышиного эпителия JB6 Cl41. Изучены физико-химические свойства ферментов (pH-оптимум, термостабильность, влияние на активность солей и химических агентов) и определены каталитические параметры для альфа-NaGalase клеток DLD-1 и MDA-MB-231. Для определения влияния природных соединений на активность фермента использовали сульфатированный полисахарид (фукоидан) из бурой водоросли Fucus evanescens, изофлавоноиды и их гликозиды из корней наземного растения Maackia amurensis и метаболиты морских гидробионтов, поскольку они обладают широким спектром биологических активностей, включая противоопухолевую. Было установлено, что фукоидан не ингибировал свободную альфа-NaGalase, однако уменьшал экспрессию фермента в клетках DLD-1. Изофлавоноиды и их гликозиды не снижали активность свободного фермента. Метаболиты морских гидробионтов: халистанол трисульфат, пентациклические гуанидиновые алкалоиды монанхомикалин B, монанхоцидин A и нормонанхоцидин A, хлорпроизводное эхинохрома морских ежей (трихлорнафтазарин), известные как эффективные ингибиторы гликозидаз микроорганизмов, обладающие высокой противоопухолевой и цитостатической активностью, активировали свободную альфа-NaGalase раковых клеток.

АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ ДНК БЕЛКАМИ СЕМЕЙСТВА PARP

Е.А. Белоусова[1], М.М. Кутузов[1], О.И. Лаврик[1, 2], С.Н. Ходырева[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Действие различных химических агентов внешней и внутренней среды, ионизирующего излучения и циркулирующих в клетке химически активных форм кислорода может приводить к образованию многочисленных разрывов в остове геномной ДНК. При массивной атаке ДНК-повреждающих агентов развитие именно быстрого клеточного ответа, который позволяет сохранить целостность геномной ДНК, может быть более важным, чем точный, но длительный процесс восстановления целостности ДНК-структуры с помощью процесса гомологичной рекомбинации. Поли(АДФ-рибозил)ирование, катализируемое белками семейства PARP, является одной из основных реакций при формировании клеточного ответа при повреждении геномной ДНК. Недавно было показано, что ДНК-зависимые белки PARP1 и PARP2 могут модифицировать не только белковые мишени, но и ДНК [Talhaoui et al., 2016, Nucleic Acids Res; Муннур и Ахел, 2017, FEBS J]. Мы обнаружили способность ДНК-зависимого рекомбинантного белка PARP3 человека модифицировать частичные дуплексы ДНК. Мы впервые продемонстрировали возможность репарации ДНК-разрывов посредством их PARP3-зависимого моно(АДФ-рибозил)ирования с последующим лигированием и репарацией образованных рибо-АР-сайтов с помощью ферментативного комплекса системы эксцизионной репарации оснований. Кроме того, мы обнаружили, что АДФ-рибозилированная ДНК может служить затравкой при синтезе цепи поли(АДФ-рибозы) очищенными белками PARP1 и PARP2, а также белками экстрактов клеток. На основании полученных результатов можно предположить, что модификация ДНК АДФ-рибозой является одной из реакций при формировании клеточного ответа, необходимого для выживания клеток при образовании двухцепочечных разрывов. Более того, наши результаты показывают, что разные белки семейства PARP могут работать аддитивно для обеспечения эффективности некоторых клеточных процессов. *Работа поддержана грантом РФФИ номер 17-00-00097.*

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ PrimPol С ФАКТОРАМИ РЕПЛИКАЦИИ И РЕПАРАЦИИ

А.В. Макарова[1], Е.О. Болдинова[1], Е.А. Белоусова[2], Е.О. Мальцева[2], Д.И. Гагаринская[1], С.Н. Ходырева[2], О.И. Лаврик[2]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

PrimPol человека – ядерная и митохондриальная ДНК-полимераза и ДНК-праймаза семейства архео-эукариотических праймаз. Основной функцией PrimPol является синтез ДНК *de novo* после поврежденных участков и ре-инициация репликации. PrimPol также включает нуклеотиды напротив многих повреждений ДНК и может участвовать в транслезионном синтезе. Механизмы узнавания повреждений и регуляции активности PrimPol не ясны. В отличие от «канонических» эукариотических ДНК-полимераз, PrimPol не взаимодействует с фактором процессивности PCNA.

Был проведен анализ взаимодействия PrimPol с polymerase δ-interacting protein 2 (PolDIP2). PolDIP2 содержит сайты связывания для репликативной ДНК-полимеразы Pol δ, ряда траслезионных ДНК-полимераз и регуляторных белков Rev1 и PCNA. Было показано, что полноразмерная ядерная изоформа PolDIP2 в значительной степени стимулирует ДНК-полимеразную активность PrimPol, тогда как укороченная митохондриальная изоформа PolDIP2 с делецией N-концевого рай-

она, содержащего сигнальную последовательность импорта в митохондрии, практически не оказывает стимулирующего эффекта. Физическое взаимодействие между ядерной изоформой PolDIP2 и PrimPol продемонстрировано с помощью выделения комплекса PrimPol-PolDIP2 из клеток *E. coli*, одновременно экспрессирующих два белка. Можно предположить, что PolDIP2 может служить посредником между «каноническими» ДНК-полимеразами и PrimPol. В случае остановки высокоточных или траслезионных полимераз в поврежденных участках PolDIP2 может привлекать PrimPol, стимулируя переключение на синтез ДНК *de novo*.

Нами впервые было обнаружено функциональное взаимодействие PrimPol с другим белком — флэп-эндонуклеазой 1 (FEN1). Взаимодействие между PrimPol и FEN1 было показано с помощью белок-белковых сшивок и выделения комплекса PrimPol-FEN1. Показано, что FEN1 стимулирует ДНК-полимеразную активность PrimPol и активность по вытеснению цепи ДНК, а также выщепляет образованные флэп-участки ДНК *in vitro*. С помощью делеционного картирования обнаружены два района PrimPol, потенциально участвующие во взаимодействии с FEN1. Хотя биологическая значимость кооперации PrimPol с FEN1 не ясна, подобное взаимодействие может быть реализовано в репликации и при некоторых типах репарации в ядре или митохондриях. *Исследование поддержано грантом РНФ18-14-00354.*

ФЕРМЕНТЫ ФОСФОРНОГО ОБМЕНА ДРОЖЖЕЙ: ОВЕРЭКСПРЕССИЯ, ХАРАКТЕРИСТИКА, НОВЫЕ ДАННЫЕ О РОЛИ В РЕГУЛЯЦИИ УГЛЕРОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА И СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ

Н.А. Андреева[1], М.А. Эльдаров[2], [1] Л.П.Рязанова[1], М.В. Думина[2], Л.В. Трилисенко[1], Л.А. Ледова[1], Т.В. Кулаковская[1]
[1]Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Пущино; [2]Институт биоинженерии ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН», Москва, Россия

Неорганические полифосфаты (полиР) распространены во всех царствах живого и играют важную роль в клетке. Функции полиР у микроорганизмов не исчерпывается их значением как запасников фосфора и энергии. Эти линейные полианионы важны для выживаемости в условиях голодания и при переходе в стационарную фазу, участвуют в регуляции клеточной подвижности, вирулентности, адаптации к стрессам. У грибов и дрожжей полиР вовлечены в такие адаптивные процессы, как приспособление к утилизации гидрофобных и токсичных источников углерода, устойчивость к тяжелым металлам, окислительному и щелочному стрессам. Мультикомпонентная система метаболизма полиР у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* включает четыре полифосфатазы Ppx1, Ppn1, Ddp1 и Ppn2. Для детализации представлений о биохимических свойствах и физиологической роли данных ферментов мы разработали систему оверпродукции, выделения и очистки полифосфатаз и кислой фосфатазы PHO5. Показано, что рекомбинантные ферменты различаются по таким свойствам, как соотношение экзо- и эндополифосфатазных активностей, специфичность по отношению к низко- и высокомолекулярным субстратам, в том числе нуклеозид ди-, три и тетрафосфатам, степень зависимости активности от дивалентных ионов, чувствительность к ингибиторам. Полученные результаты анализа in vitro свидетельствуют как о разнице в механизмах действия, так и о различной физиологической роли отдельных ферментов, что находит подтверждение в данных об особенностях физиологии штаммов, оверэкспрессирующих эти белки. Для метилотрофных дрожжей *O. parapolymorpha* и *K. pastoris* нами проведено сравнение содержания отдельных фракций полиР, их субклеточной локализации, полифосфатазной активности и экспрессии генов ферментов фосфорного обмена при росте клеток на глюкозе и метаноле. Выявлена как тесная взаимосвязь между метаболизмом полиР и метанола, так и видоспецифические особенности динамики полиР у метилотрофов. Начаты исследования по функциональному анализу ферментов фосфорного обмена у метилотрофов с помощью геномного редактирования. *Поддержано грантом РФФИ 17-04-00822.*

НОВЫЕ ПОДХОДЫ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ ХИМИИ К ИЗУЧЕНИЮ МЕХАНИЗМОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ И РАЦИОНАЛЬНОМУ ДИЗАЙНУ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

М.Г. Хренова
Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В докладе рассматривается перспективность совместного применения комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ), традиционно использующегося для описания реакций в белках, и методов анализа электронной плотности, успешно применяющихся для небольших молекулярных систем и кристаллов, для получения новой информации о механизмах ферментативных реакций. Этот подход позволяет перейти от интегрального свойства системы, её полной энергии, к локальным свойствам, таким как характеристики межатомных взаимодействий или свойства отдельных атомов в молекулярных системах. В рамках предлагаемого подхода выделяются ключевые взаимодействия и свойства атомов в активных центрах ферментов, то есть те, которые определяют макроскопическое, наблюдаемое в эксперименте свойство. В качестве одного из примеров будут представлены результаты изучения реакции гидролиза цефалоспориновых соединений металлобета-лактамазой, лежащей в основе одного из механизмов бактериальной резистентности. По результатам расчётов определена водородная связь в структуре переходного состояния лимитирующей стадии, свойства которой определяют наблюдаемые каталитические константы схемы Михаэлиса-Ментен. Для ряда родственных цефалоспориновых соединений построены корреляции, позволяющие рассчитывать каталитические константы с высокой точностью. Это открывает новые возможности для рационального дизайна соединений цефалоспоринового ряда. Предлагаемый подход может быть использован для других ферментативных реакций для ранжирования соединений по их каталитической активности, что имеет важные биомедицинские приложения, а также для разработки новых мутантных форм ферментов с измененными каталитическими свойствами для решения биотехнологических задач. *Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования*

сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке РНФ (проект № 18-74-10056).

РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СУБЪЕДИНИЦ ПРОТЕАСОМЫ В ГИДРОЛИЗЕ ПОЛИГЛУТАМИЛ-СОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

А.В. Бачева, В.С. Шашковская, О.О. Красновская
Химический факультет, МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

Убиквитин-протеасомная система, и ее центральный фермент, протеасома, играют ключевую роль в регулировании продолжительности жизни большинства внутриклеточных белков. Протеасома представляет собой мультисубъединичный белковый комплекс, основной функцией которого является направленная и избирательная деградация большинства белков, которые завершили свой цикл, а также потенциально опасных неправильно фолдированных белков, которые продуцируются во время различных патологических процессов. Протеасома содержит шесть субъединиц, обладающих протеолитической активностью, по две каждого из трех типов: бета1, бета2 и бета5. Они имеют различную субстратную специфичность, гидролизуя пептидную связь после отрицательно заряженных (бета1), положительно заряженных (бета2) или объемных гидрофобных (бета5) аминокислот. В некоторых типах клеток, а также под действием провоспалительных цитокинов могут экспрессироваться так называемые иммунопротеасомы, активные центры которых имеют отличающуюся субстратную специфичность, гидролизуя пептидную связь после небольших гидрофобных (бета1i), положительно заряженных (бета2i), или гидрофобных (бета5i) аминокислот. Большинство известных ингибиторов протеасомы не очень специфичны, связываясь в нескольких активных центрах, и одновременно останавливая гидролиз после аминокислотных остатков различных типов. Поэтому для идентификации активных сайтов, участвующих в процессе деградации плохо гидролизуемых белков и их фрагментов, необходимо использовать целый набор ингибиторов. Кроме того, существуют низкомолекулярные вещества, увеличивающие гидролитическую активность протеасомы. Активация протеасомы может быть одним из способов лечения таких патологий, как полиглутаминовые расстройства и, возможно, других заболеваний. Была изучена зависимость активности протеасом по нескольким субстратам от концентрации целого ряда соединений и для некоторых из них показан ингибирующий эффект, а также рассчитаны значения IC50. Некоторые из них показывают способность останавливать внутриклеточный протеолиз. Среди исследованных соединений обнаружены эффекторы, которые повышают активность протеасомы. Такие соединения могут быть использованы для ускорения разложения трудногидролизуемых белков или их фрагментов. *Работа выполнена при поддержке РФФИ проект № 19-04-01261.*

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ
Биоинженерия белков и пептидов
Устные доклады

МОДУЛЬНЫЙ ПРИНЦИП СТРОЕНИЯ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

А.В. Ефимов
Институт белка РАН, Пущино Московской области, Россия

Модули и структурные мотивы – это супервторичные структуры, состоящие из двух или более α-спиралей и/или β-тяжей, которые могут многократно повторяться в одной молекуле или часто встречаться в молекулах разных белков, как гомологичных, так и негомологичных. Модуль или структурный мотив определенного типа состоит из одного и того же количества α-спиралей и/или β-тяжей и имеет одинаковую общую укладку цепи во всех белках, где он встречается. Как правило, структурные мотивы имеют компактную и стабильную структуру с гидрофобным ядром и могут свернуться и существовать сами по себе (что и наблюдается о многих небольших белках и доменах [1]). Модули, по-видимому, менее стабильны (многие из них не имеют компактной структуры) и сами по себе в белках не встречаются, однако в комбинациях с другими модулями образуют компактные стабильные структуры, которые широко распространены в белках [2-4]. В настоящей работе показано, что целые молекулы и домены белков могут быть представлены в виде комбинаций из ограниченного числа стандартных модулей. Так, например, структура β-бочонков SH3-подобных доменов может быть представлена как комбинация 3β-уголок – правая β-шпилька – L-модуль. Структура β-бочонков сериновых протеаз представляет собой комбинацию из двух 3β-уголков. Структура OB-фолдов может быть представлена как комбинация L-модуль – S-лист – П-модуль – левая β-шпилька. Все структуры α/β-белков представляют собой различные комбинации из βαβ-единиц и т.д. Особый интерес представляют структурные модули и мотивы с уникальной укладкой цепи и определенной «хиральностью». Они резко сокращают число возможных укладок цепи и во многом определяют структуру белка и его сворачивание, а, с другой стороны, облегчают моделирование и поиск уникальных структур белков. Как правило, это – спиральные и суперспиральные структуры. С другой стороны, β-шпильки могут быть правыми и левыми, трехтяжевые β-листы могут быть S- или Z-образными и др. В настоящей работе показано, что отбор одной из двух форм таких модулей зависит (1) от взаимного расположения этих и других модулей в их комбинациях, (2) от структуры более высокого порядка, в которую они включены и (3) от расположения в структуре молекулы белка или домена. Например, в abCd-единице ββαβ типа, в которой ab-шпилька расположена на N-конце, отбирается правая ab-шпилька, а в abCd-единице типа βαββ, где ab-шпилька находится на C-конце, отбирается левая ab-шпилька. В комбинациях, где П-модуль следует за трехтяжевым β-листом по цепи, отбирается S-образный лист и образуется SП-мотив. Если, наоборот, β-лист следует за П-модулем по цепи, то отбирается Z-образный лист и образуется ПZ-мотив и т.д. Отметим также, что если в белке есть левые βαβ-единицы (хотя подавляющее большинство βαβ-единиц в белках – правые), то они, как показано, расположены

на С-концах. Таким образом, структуру сложных белковых молекул можно моделировать с помощью ограниченного набора относительно простых структурных модулей и мотивов. Их взаимодействие между собой (точнее, их взаимное расположение) позволяет отбирать их правые или левые формы, что значительно упрощает поиск уникальных структур. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №17-04-00242).*

1. Efimov A.V. (1994) FEBS Lett., 355, 213-219.
2. Efimov A.V. (2017 Proteins, 85, 1925-1930.
3. Каргатов А.М., Ефимов А.В. (2018) Мол. Биол. 52,43-50.
4. Каргатов А.М., Бражников Е.В., Ефимов А.В. (2018) Мол. Биол., 52, 1074-1081.

СИСТЕМА БИОСИНТЕЗА ПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ ШАПЕРОНА GroE

А.Н. Федоров[1,2], А.А. Зенин[1,2], Э.Г. Садыхов[1,2], М.С. Юркова[1,2]
[1]Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [2]Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

При экспрессии рекомбинантных пептидов в бактериальной системе часто сталкиваются с проблемами низкого уровня их экспрессии и / или токсичности. Одним из подходов к решению подобных проблем является создание слитых белков. Нами разработана система для биосинтетической продукции полипептидов, в том числе трудных для экспрессии, на основе шаперона GroEL. Целевой полипептид сливается с полипептидной цепью шаперона T. thermophilus GroEL таким образом, что находится внутри полости частицы вблизи субстратного белок-связывающего домена. В результате целевой полипептид экранирован от действия внутриклеточных протеаз и, с другой стороны, не может влиять на клеточный метаболизм, что важно для пептидов, токсичных для клетки. Термостабильность используемого GroEL из *T. thermophiles* позволяет очищать его от большинства клеточных белков нагреванием. Отделение целевого полипептида достигается химической обработкой бромцианом, специфичной к остаткам метионина. Для упрощения процедур очистки целевых полипептидов создан вариант шаперона GroEL, в котором все остатки метионина заменены на остатки лейцина. Измененный GroEL полностью сохранял четвертичную структуру, присущую исходному шаперону, а также сохранял исходную термостабильность. Возможность получения наиболее сложных пептидов продемонстрирована на примере экспрессии полифемузина – одного из наиболее сильных антибактериальных пептидов. Все процедуры получения целевого пептида просты, надежны и могут быть масштабированы. *Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, уникальный идентификационный номер работы RFMEFI57517X0151*.

ОЛИГОМЕРЫ КОНКУРИРУЮТ С ФИБРИЛЛАМИ: СВИДЕТЕЛЬСТВО АНОМАЛЬНОЙ КИНЕТИКИ АМИЛОИДОГЕНЕЗА

А.В. Финкельштейн, Н.В. Довидченко, О.В. Галзитская
Институт белка РАН, Пущино, Россия

Недавно была обнаружена аномальная зависимость скорости образования амилоида белка Aβ40 от концентрации этого белка, сопряженного с болезнью Альцгеймера. Нами представлено объяснение наблюдаемой аномалии: образование метастабильных олигомеров, конкурирующих с образованием ими фибрилл за счет уменьшения концентрацию свободных. формирующих фибриллу мономеров.

Визуально наблюдаемые олигомеры (которые, однако, обычно рассматриваются только как зародыши, а не как конкуренты амилоидных фибрилл) имеют тот же размер, что следует из аномальной зависимости скорости роста амилоидов от концентрации белка, – если рассматривать эту аномалию как результат конкуренции олигомеров с амилоидогенезом. *Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда*.

ВКЛЮЧЕНИЕ ФОТОБЕЛКОВ В ОЛИГОМЕРНУЮ СТРУКТУРУ ШАПЕРОНА GroEL

Г.В. Семисотнов[1], В.В. Марченков[1], Т.В. Ивашина[1,2], Н.Ю. Марченко[1], Н.А. Рябова[1], А.А. Тимченко[1], И.А. Кашпаров[1], В.Н. Ксензенко[1]
[1]Институт белка РАН; [2]Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, Россия

Введение люминесцентных маркеров в белки позволяет исследовать как их локализацию в клетке, так и межмолекулярные взаимодействия, в которых участвуют эти белки. В работе сконструированы плазмиды, кодирующие ген субъединицы молекулярного шаперона GroEL (м. в. ~60 кДа), слитый с геном EGFP (м. в. ~30 кДа) или люциферазы Gaussia (м. в. ~20 кДа). Экспрессия этих плазмид в клетках E. coli продуцировала слитые белки GroEL•EGFP и GroEL•Luc, обладающие свойствами свернутых составных модулей. Однако слитые белки не образовывали олигомерную структуру, вероятно, вследствие стерических ограничений со стороны громоздкого фотобелка. Вместе с тем, при ко-экспрессии генов слитых белков и гена GroEL дикого типа 1-2 субъединицы слитого белка включались в тетрадекамерную четвертичную структуру шаперона, придавая ему специфические для фотобелков люминесцентные свойства с сохранением его основных структурных и функциональных свойств (упаковка субъединиц, стабильность, связывание с ко-шапероном GroES и субстратными белками). Результаты работы могут быть использованы для исследования функциональных свойств GroEL с частично заполненной внутренней полостью и введения фотобелков в другие олигомерные белковые структуры. *Работа поддержана грантом РНФ № 14-24-00157.*

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ ПРИ ГЛИКИРОВАНИИ

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

Гликирование является распространенной посттрансляционной модификацией белков, вызывающей разнообразные изменения их свойств. Было изучено гликирование глюкозой, метилглиоксалем, глицеральдегид-3-фосфатом и другими сахарами трех групп белков – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД), играющей определяющую роль в гликолизе, амилоидогенных белков – альфа-синуклеина человека и прионного белка овец, а также молочных казеинов. Во всех случаях наиболее эффективно гликирование белков происходило в присутствии метилглиоксаля и глицеральдегид-3-фосфата, являющихся ключевыми метаболитами, участвующим в модификации белков в клетке. Было обнаружено, что при гликировании ГАФД альдегидами и, в меньшей степени, глюкозой происходит снижение активности фермента и его стабильности. Инактивация фермента происходит не только за счет гликирования его лизиновых и аргининовых остатков, но и за счет модификации важных для катализа цистеиновых остатков активного центра. Инактивация ГАФД при гликировании должна приводить к увеличению концентрации гликолитических альдегидов. Накопление этих метаболитов может приводить к последующему дополнительному ингибированию активности ГАФД и снижению эффективности гликолиза. Роль гликирования в развитии нейродегенеративных заболеваний была исследована в экспериментах по модификации двух амилоидогенных белков – альфа-синуклеина и прионного белка - гликирующими альдегидами. Было показано, что в результате гликирования обоих белков существенно изменяется их конформация, что приводит к замедлению или предотвращению их амилоидной трансформации, но стимулирует образование аморфных агрегатов. Гликирование молочных казеинов стимулирует их агрегацию, а в определенных условиях вызывает образование необычных спиралевидных структур. Было обнаружено, что гликирование может модифицировать аминокислотные остатки, по которым происходит убиквитинилирование и сумоилирование белков. Следовательно, избирательное гликирование можно использовать для предотвращения деградации белков протеосомными системами. Кроме того, с помощью гликирования можно регулировать агрегацию белков и даже получать необычные спиральные структуры. *Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 16-14-10027П).*

ТЕРМИЧЕСКАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ ВИРУСОВ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИХ ИЗУЧЕНИЯ

Н.А. Никитин, Е.А. Евтушенко, И.Г. Атабеков, О.В. Карпова
МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Изучение термической денатурации вирусов и вирусных белков является одним из подходов для поиска взаимосвязи между структурой, динамикой и биологической функцией белков в вирусных частицах, а также получения стурктурно-модифицированных вирусных частиц с новыми свойствами. Ранее нами был продемонстрирован процесс структурной перестройки спирального вируса растений, вируса табачной мозаики, при нагревании до 94ºС в структурно-модифицированные частицы сферической формы (сферические частицы – СЧ), состоящие из белка оболочки вируса (БО). Было показано, что СЧ обладают рядом уникальных свойств, включая устойчивость к различным физическим факторам, биодеградируемость, высокие адсорбционные свойства, а размер получаемых СЧ можно контролировать, изменяя начальную концентрацию вируса в растворе. Было обнаружено, что наблюдаемые структурные изменения в процессе термической обработки вирионов тесно связаны со структурным переходом БО, содержащим преимущественно α-спирали, в структуру с низким содержанием α-спиралей и образованием значительной доли β-слоев. Кроме того, наши результаты показали, что образование структурно-модицифрованных частиц сопровождается изменениями в профиле аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности частиц. Схожие структурно-модифицированные частицы были получены и для других спиральных вирусов растений, в том числе вирусов с нитевидной структурой вириона (на примере Х-вируса картофеля). СЧ не имеют аналогов в природе, при этом абсолютно безопасны для человека и млекопитающих, обладают уникальными адсорбционными свойствами и являются эффективным адъювантом. Таким образом, структурно-модифицированные частицы, полученные при термической перестройке вирусов растений, могут служить основой для разработки новых лекарственных препаратов, в том числе вакцин нового поколения. *Работа частично поддержана грантом Российского научного фонда (№ 18-14-00044).*

БИОИНЖЕНЕРИЯ НЕЙРОМОДУЛЯТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ

Е.Н. Люкманова
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва ;[2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В настоящее время никотиновые ацетилхолиновые рецепторы α7 типа (α7-nAChR), локализованные в гиппокампе и префронтальной коре, рассматриваются как потенциальные мишени для лекарств, улучшающих когнитивные функции мозга. В качестве прообразов подобных препаратов могут выступать природные аллостерические нейромодуляторы α7-nAChR, например, белки человека семейства Lynx. Однако, для рационального дизайна новых лекарственных препаратов на основе белков Lynx необходимы дополнительные фундаментальные знания о влиянии нейромодуляторов на различные когнитивные процессы и данные об их биохимических эффектах в мозге.

Работа посвящена исследованию нейромодуляторов из мозга человека Lynx1, Lynx2, Lypd6a и Lypd6. Показано, что водорастворимый вариант белка человека Lynx1 (ws-Lynx1) конкурирует с бета-амилоидным пептидом $A\beta_{1-42}$ за связывание с α7-nAChR. Обнаружено, что экспрессия Lynx1 снижена в коре головного мозга трансгенных мышей, моделирующих болезнь Альцгеймера (3×Tg-AD) по сравнению с мышами дикого типа и это снижение связано с активацией JNK киназы. Показано, что ws-Lynx1 потенцирует α7-nAChR и стимулирует синаптическую пластичность на срезах мозга. Показано, что ws-Lynx1

проникает через гематоэнцефалический барьер мышей при интраназальном введении, и хронический прием ws-Lynx1 приводит к улучшению когнитивной функции и восстановлению синаптической пластичности как у мышей, с дисфункцией α7-nAChR, так и у трансгенных мышей, моделирующих болезнь Альцгеймера (2×Tg-AD). Напротив, рекомбинантный аналог Lypd6 ингибирует α7-nAChR *in vitro* и на срезах мозга, а также подавляет синаптическую пластичность. Полученные данные указывают на участие Lynx1 и Lypd6 в процессах, формирующих память и обучение. Вероятно, Lynx1 и Lypd6, со-локализованные с α7-nAChR на мембране нейронов, представляют собой пару положительных и отрицательных нейромодуляторов, необходимых для тонкой настройки холинергической системы в мозге.

Методами ЯМР-спектроскопии определены пространственные структуры всех четырех нейромодуляторов и исследована молекулярная динамика в растворе. Выявлены отличия в пространственной организации этих нейромодуляторов, возможно, связанные с различием их функции и мишеней действия. Биоинженерия нейромодуляторов, регулирующих когнитивные функции, открывает новые перспективы в разработке препаратов для лечения когнитивных нарушений. *Работа выполнена при поддержке РНФ (№16-14-00102, исследование Lynx1 и Lypd6, и № 19-74-20176, исследование Lynx2).*

СИСТЕМА РЕГЕНЕРАЦИИ КОФАКТОРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИБРИДНЫХ ФЕРМЕНТОВ НА ОСНОВЕ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

А.А. Пометун[1,2,3], П.Д. Паршин[2,3], С.С. Савин[2,3], В.Б. Урлахер[4], П.Дж. Баккес[4], В.И. Тишков[1,2,3]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва; [3]ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Москва, Россия; [4]Institute of Biochemistry, Heinrich-Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

Многие ферменты, применяемые в биотехнологии, используют дорогой и нестабильный NADH/NADPH в качестве кофермента. Поэтому для снижения стоимости процесса применяются схемы с регенерацией кофактора. Регенерация может быть осуществлена за счет использования дополнительного фермента, ко-экспрессии основного и дополнительного ферментов одновременно (whole cell biocatalyst), а также за счет получения гибридного белка. В гибридном ферменте два фермента объединены в одну полипептидную цепь за счет специального линкера. Такая конструкция позволяет активным центрам ферментов сближаться друг с другом и молекула кофактора, восстановленного в активном центре одного фермента, может быстрее достигнуть активного центра другого фермента. NAD(P)+-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2.) – это фермент, широко использующийся в системах с регенерацией кофактора. Основными преимуществами этого фермента являются широкий pH-оптимум активности (6-9,5), высокая температурная стабильность, простота удаления из реакционной смеси продукта реакции – CO2, а также относительно невысокая стоимость основного субстрата – формиат иона. Большинство ФДГ являются NAD+-зависимыми ферментами. В нашей лаборатории методом направленного мутагенеза некоторое время назад были получены мутантные формы ФДГ из бактерий Pseudomonas sp 101, обладающие специфичностью к NADP+, поскольку многие ферменты используют NADPH в качестве кофактора. Одной из наиболее интересных групп ферментов, широко используемых в биотехнологии, являются монооксигеназы. Большинство из них используют в качестве кофактора именно NADPH. В рамках данной работы было получено несколько генетических конструкций, содержащих гены, кодирующие монооксигеназу и ФДГ. Была проведена экспрессия и очистка гибридных ферментов и разные варианты гибридных ферментов были получены в активной и растворимой форме. Все ферменты проявляли активность как по части ФДГ так и по части монооксигеназы. Было проведено сравнение свойств гибридных ферментов и смеси ферментов и показано, что в некоторых случаях фьюжн системы работают более эффективно, чем смесь отдельных белков. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 19-34-70036.*

САМООРГАНИЗУЮЩИЕСЯ ФИБРИЛЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ К3 ПЕПТИДА БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИНА

В.А. Балобанов, А.И. Турчина, Н.С. Рябова, С.А. Гарбузинский, А.О. Михайлина, Н.С. Катина, А.В. Финкельштейн
Институт белка РАН, Пущино, Россия

Амилоидные фибриллы – одна из форм самоорганизации белковых молекул. Проектирование и изучение амилоидных конструкций дают возможность понять физические основы процесса амилоидного роста и получить новые материалы на основе таких белков. В ходе изучение процесса амилоидообразования К3 пептида бета-2-микроглобулина, связанного с диализ-ассоциированным амилоидозом, нами были получены гибридные белки. Белком носителем в них служит тиоредоксин. К нему были присоединены два варианта конструкций из К3 пептида. Первая – пептид с нейтрализующими его отрицательный заряд заменами D15H, E17N, D19H (Trx-K3 HNH). Вторая – содержащая три повтора пептида дикого типа, объединённых линкерами в единую цепь (Trx-K3 Helix). Было проведено изучение процесса амилоидообразования такими гибридами, как по отдельности, так и в смеси. На основании концентрационной зависимости кинетики амилоидообразования было предположено, что в смеси Trx-K3 Helix является материалом для роста фибрилл, а Trx-K3 – инициатором их роста. Микроскопическое исследование результатов фибриллообразования при различном соотношении Trx-K3 Helix и Trx-K3 HNH показало, что при малой доле Trx-K3 HNH образуются длинные фибриллы, тогда как при его значительном содержании много коротких. Это подтверждает, что Trx-K3 HNH в данном сочетании действительно является инициатором роста фибриллы. Полученная нами система позволяет управляемо запускать процесс фибриллообразования и контролировать при этом среднюю длину получаемых фибрилл. Особо стоит отметить, что эксперименты были проведены не на чистых пептидах, а на гибридных белках, в которых амилоидогенные пептиды привязаны к тиоредоксину. При этом тиоредоксин не участвовал в образовании амилоидного остова и сохранял свою структуру. Таким образом, нами был сделан значительный шаг к созданию практически применимых фибрилл, декорированных функциональными доменами. *Работа поддержана грантом РНФ 14-24-00157. Микроскопическое исследование выполнено в объединенном Пущинском центре электронной микроскопии*.

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ
Инновационные лекарственные средства на основе пептидов и белков
Устные доклады

ФАРМАКОТРАНСКРИПТОМИКА ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ

С.А. Лимборская, Н.Ф. Мясоедов
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Исследование особенностей экспрессии генов под действием пептидных препаратов позволяет детально определить особенности их влияния на клеточные функции и метаболические системы. Транскриптомный анализ, проведенный с помощью технологии RNA-seq, был использован для определения действия пептидных препаратов на клетки головного мозга в условиях модели экспериментальной ишемии, наиболее приближенной к острому ишемическому инсульту. Обнаружены широкомасштабные изменения экспрессии генов, в том числе тех, которые относятся к процессам нейротрансмиссии и воспаления. В целом был выявлен компенсаторный эффект нейропептидов, который противоположен действию ишемии на геномную активность. Обсуждается модель, объясняющая массированное действие пептидов на многочисленные клеточные функции и метаболические пути. Изучение транскриптомного профиля клеток мозга и его изменения под действием пептидов в условиях экспериментальной ишемии позволяет сформулировать основные принципы механизмов пептидной регуляции, а также определить новые подходы для дальнейшей разработки препаратов направленного протекторного воздействия.

Работа выполнена при поддержке грантов РНФ (19-14-00268) и РФФИ-КОМФИ (17-00-00104).

ОТ МОЛЕКУЛЫ К ЛЕКАРСТВУ: МЕДИЦИНСКАЯ БИОИНФОРМАТИКА *IN SILICO*

В.В. Поройков
Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Благодаря наличию биологической активности, химические соединения (ХС) применяют как реагенты для изучения функционирования биологических систем в норме и при патологиях или в качестве лекарств для нормализации патологических процессов. Спектр биологической активности ХС – это множество видов биологической активности, которые отражают результат его взаимодействия с различными биологическими объектами [1]. Экспериментальная оценка всех видов биологической активности ХС нереальна, поэтому целесообразно использование биоинформатических методов, которые позволяет определить наиболее перспективные направления для тестирования конкретных веществ и отсеять потенциально опасные молекулы на ранних стадиях исследований. В докладе будет представлено современное состояние проблемы оценки *in silico* биологической активности лекарственно-подобных соединений и отбора среди них веществ, обладающих требуемым фармакологическим действием, на основе которых могут быть разработаны более эффективные и безопасные препараты. Будут рассмотрены разработанные нами свободно-доступные в Интернете веб-ресурсы для прогнозирования биологической активности ХС, которые используются свыше 20 тысяч исследователей из 100 стран мира (http://www.way2drug.com.projects); и приведены примеры экспериментального подтверждения предсказанных с помощью созданной нами программы PASS ранее не известных видов биологической активности у природных соединений [2], открытия новых активаторов ионных каналов TRPC6 с нейропротекторным действием [3], установления новых свойств у разрешенных к медицинскому применению лекарственных препаратов [4]. На примере изучения большой виртуальной библиотеки органических соединений SAVI (Synthetically Accessible Virtual Inventory) мы проанализируем возможности и ограничения применения компьютерных методов для поиска новых веществ, обладающих антиретровирусной активностью [5]. *Работа поддержана грантом РФФИ-NIH № 17-54-30015-НИЗ_а.*

1. Филимонов Д.А. и др. Biomed. Chem. Res. Meth., 2018, 1, e00004.
2. Gawande D.Y. et al. J. Ethnopharmacol., 2017, 202, 97.
3. Popugaeva E. et al. Mol. Pharm., 2019, 95, 337.
4. Lloyd K. et al. bioRxiv. Posted January 07, 2019. DOI: https://doi.org/10.1101/513838.
5. Савосина П.И. и др. Биомед. хим., 2019, 65, 73.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ ПРОЦЕССОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА МАКРОМОЛЕКУЛ ДЛЯ ДОСТАВКИ ПРОТИВОРАКОВЫХ АГЕНТОВ В ЯДРА РАКОВЫХ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

А.С. Соболев[1,2], А.А. Розенкранц[1,2], Т.А. Сластникова[1], А.В. Уласов[1], Ю.В. Храмцов[1]
[1]Институт биологии гена РАН, Москва, Россия; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Разработаны модульные нанотранспортёры (МНТ) – синтетические полипептиды, придающие клеточную специфичность и высокую эффективность противоопухолевым агентам [1]. МНТ, используя естественные процессы эндоцитоза и цитоплазменно-ядерного транспорта, способны проникать в клетку-мишень, а затем – в клеточное ядро. Данный подход позволяет создавать различные МНТ в зависимости от задачи, например: для смены типа клеток-мишеней, смены целевого внутриклеточного компартмента и т.д. На клеточных и животных моделях показано, что доставляемые МНТ фоточенсибилзаторы и радионуклиды, испускающие электроны Оже [2] или альфа-частицы, благодаря специфической доставке в клетки-мишени, а в них – в ядро, приобретают намного большую эффективность и клеточную специфичность. Проведенные во МНИОИ им. П.А. Герцена и МРНЦ им. А.Ф. Цыба доклинические испытания МНТ, нацеленных на клетки со сверхэкспрессией рецептора

эпидермального фактора роста (клетки глиобластомы, раков мочевого пузыря, головы и шеи, шейки матки). Испытания убедительно подтвердили высокую противоопухолевую эффективность и безопасность данного подхода при внутриопухолевом пути введения МНТ, несущих индий-111 (радионуклид, испускающий электроны Оже). Разработаны «гибридные» МНТ, полученные путем ковалентного присоединения лиганда фолатных рецепторов (производного фолиевой кислоты) к безлигандному МНТ. Полученные «гибридные» фолат-МНТ специфически интернализовались клетками-мишенями (клетки рака шейки матки, рака яичников, характеризующиеся сверхэкспрессией и экспозицией фолатных рецепторов), проникали в их ядра и, доставляя в них индий-111, эффективно поражали их. Фолат-МНТ-индий-111 продемонстрировал выраженную противоопухолевую активность на животных моделях [3]. Обсуждаются другие возможные применения разработанного подхода. *Работа поддержана грантом РНФ № 17-14-01304.*

1. Sobolev, A. S. (2017) Modular Transporters, In: Encyclopedia of Cancer (Schwab, M., Ed.) 4th ed., pp 2891-2894, Springer, Berlin, Heidelberg.
2. Sobolev, A. S. (2018) Front. Pharmacol. 9, 952.
3. Slastnikova, T. A., et al. (2017) Drug Des. Devel. Ther. 11: 1315-1334.

УСТАНОВЛЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО И НОРМАЛИЗУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ПЕПТИДА HLDF-6 ПРИ МФТП-ИНДУЦИРОВАННОМ ПАРКИНСОНИЗМЕ

Ю.А. Золотарев[1,5], Н.В. Кост[2,5], О.Ю. Соколов[2,5], А.К. Дадаян[1,5], СИ. Шрам[1,5], Д.Д. Марков[1,5], Г.И. Ковалёв[3], Е.В. Васильева[3], А.П. Богачук[4], В.М. Липкин[4], Н.Ф. Мясоедов[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]Научный центр психического здоровья; [3]НИИ фармакологии им. В.В. Закусова; [4]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [5]ООО «Нейропепт», Сколково, Москва, Россия

Объектом данного исследования являются производные пептида HLDF-6, аминокислотная последовательность которых соответствует фрагменту 41Thr-Gly-Glu-Asn-His-Arg46 фактора дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor), который обнаруживается в организме человека в норме и при патологии. Пептид HLDF-6 полностью воспроизводит дифференцирующую активность полноразмерного фактора. Ранее показано, что NMDA-рецепторы являются функциональной мишенью специфической нейропротекторной активности пептида HLDF-6, реализуемая через стимуляцию нейростероидогенеза и модуляцию экспрессии 5-альфа редуктазы. На экспериментальных моделях болезни Альцгеймера и ишемического инсульта было показано, что пептид HLDF-6-A (Thr-Gly-Glu-Asn-His-Arg-NH2) обладает высокой нейропротекторной активностью и обеспечивает практически полное восстановление когнитивных нарушений при этих патологиях. Пептид HLDF-6-A обладает также высокой противотревожной активностью, и он свободен от нежелательных побочных эффектов, присущих бенздиазепинам. Используя экспериментальную модель болезни Паркинсона (БП), основанную на введении мышам токсина МФТП, нами впервые было показано, что хроническое интраназальное применение пептидов HLDF-6-A и HLDF-6-H (Thr-Gly-Glu-Hse-His-Arg-NH2) приводит к восстановлению нарушенной нигростриатной дофаминовой системы головного мозга. Для этих пептидов показано наличие высокоафинного связывания с мембранами коры мозга. Изучение нейропротекторных свойств пептидов HLDF-6-A и HLDF-6-H проводили с использованием досимптомной модели БП, вызванной введением мышам C57BL/6 нейротоксина МФТП в дозе 2×15 мг/кг с интервалом 2 часа. В результате хронического трехнедельного интраназального введения в дозе 300 мкг/кг пептидов HLDF-6-A и HLDF-6-H происходит достоверное восстановление уровня дофамина в стриатумах, BDNF, IFNγ, TNFα в мозге и эстрадиола в плазме крови. Хроническое введение пептидов HLDF-6-A и HLDF-6-H на компьютеризированной установке “Grid test” приводит к ослаблению проявления локомоторных дисфункций, вызванных введением МФТП. Такой положительный результат по восстановлению нигростриатной дофаминовой системы головного мозга, достигнут впервые в мире, что делает пептид перспективным для создания на его основе лекарственного средства для лечения болезни Паркинсона.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕПТИДНЫХ МИКРОЧИПОВ И БИБЛИОТЕК ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА РЕПЕРТУАРА АНТИТЕЛ

С.В. Подлесных[1], Д.В. Шаньшин[2], Е.А. Колосова[1,2], Д.Е. Мурашкин[1,2], Д.Н. Щербаков[1,2], С.А. Джонстон, А.А. Ильичев[2], А.И. Шаповал[1,3]
[1]Российско-Американский противораковый центр, Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия; [2]ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия; [3]Центр инноваций в медицине, Институт Биодизайна, Университет штата Аризона, Темпи, США

Современные биомедицинские исследования значительно изменились после разработки постгеномных технологий, таких как секвенирование нового поколения и микрочипы, которые могут быть использованы, как для диагностических, так и для исследовательских целей. Микрочипы представляют собой эффективный и высокопроизводительный инструмент для исследования генома и протеома. Пептидные микрочипы могут быть использованы для различных исследований, включая профилирование репертуара циркулирующих антител (изучение иммуносигнатур при онкологических, инфекционных, аутоиммунных, нейродегенеративных и аллергических заболеваниях), а также оценки белок-белковых взаимодействий. Также фаговые пептидные библиотеки могут быть использованы для разработки иммунодиагностических средств и иммуномодуляторных препаратов.

В данном исследовании были использованы микрочипы, содержащие сотни тысяч пептидов, со случайными аминокислотными последовательностями, для изучения репертуара антител в плазме крови пациентов с онкологическими и другими заболеваниями. В работе также были использованы фаговые пептидные библиотеки. Наши исследования показали, что в крови пациентов с онкологическими заболеваниями содержаться антитела комплементарные определенным пептидам, представленных на микрочипах и фаговых библиотеках. Панели пептидов, специфически взаимодействующих с сывороткой пациентов,

могут служить основой для создания диагностических тест-систем для определения заболеваний. В тоже время, микрочипы, содержащие тысячи пептидов, могут быть использованы для скрининга групп риска различных заболеваний и «молекулярной диспансеризации» населения. Возможность одновременной идентификации различных заболеваний, с помощью анализа репертуара циркулирующих антител (биомаркер), делает технологию пептидных микрочипов одной из самых перспективных и востребованных для совершенствования иммунодиагностики.

Таким образом, пептидные микрочипы могут быть использованы для создания нового инструмента для изучения репертуара циркулирующих антител в норме и патологии, а также для исследования и оценки белок-белковых взаимодействий. *Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проекты № 17-04-00321\19 и 17-54-33003/18) и государственного задания Минобрнауки России (№6.3892.2017/4.6.).*

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ СИСТЕМЫ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА И МАТРИЦА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

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

Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) – эволюционно древние факторы системы врождённого иммунитета многоклеточных организмов, играющие ключевую роль в их защите от инфекции. Каждый биологический вид вырабатывает свой уникальный набор АМП, позволяющий ему успешно бороться с патогенной микрофлорой. Сходные по защитным функциям и разнообразные по структуре пептиды были выделены из тканей беспозвоночных и позвоночных животных, а также из растений. АМП проявляют активность в отношении бактерий, мицелиальных и дрожжевых грибов, простейших, оболочечных вирусов, они отличаются спектрами антимикробной активности и способны взаимно дополнять и усиливать друг друга. АМП также характеризуются широкой вариативностью механизмов действия, включающих не только нарушение барьерной функции мембраны клетки-мишени, но и специфическое ингибирование процессов метаболизма за счет взаимодействий с молекулами на поверхности или внутри клетки. Наряду с фактами, свидетельствующими о прямом эффекторном (антибиотическом) действии, была обнаружена способность многих АМП проявлять регуляторную (иммуномодулирующую) функцию и участвовать в функционировании не только врожденного, но и приобретенного иммунитета. Поиск и исследование свойств АМП, выполняющих функции защитных факторов живых организмов, позволяет лучше понять закономерности функционирования системы врождённого иммунитета. Изучены структуры, биологические функции и механизмы действия ряда АМП животного происхождения. Рассмотрен вопрос о биологической значимости антимикробных свойств, наблюдаемых в условиях *in vitro* и *in vivo*. Исследованы основные механизмы мембранотропного действия АМП и проанализированы причины селективности взаимодействия с микробной мембраной. Фундаментальные исследования АМП тесно связаны с их важным прикладным значением. Ключевой задачей исследователей, работающих над созданием новых антибиотиков пептидной природы, в настоящее время является проблема токсичности и увеличение продолжительности жизни этих молекул в кровотоке. Благодаря своим структурно-функциональным особенностям АМП могут стать прототипами новых антибиотиков широкого спектра действия, способных решить проблему резистентности к существующим антимикробным средствам.

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА КАК ПРОНИКАЮЩИЕ В КЛЕТКИ ПЕПТИДЫ (CELL-PENETRATING PEPTIDES)

О.В. Шамова[1], А.С. Назаров[2], И.В. Кудрявцев[1], Н.А. Грудинина[1], Е.А. Андреева[1], Т.А. Филатенкова[1], П.М. Копейкин[1], Н.В. Луговкина[1], А.А. Кололбов[3], Г.А. Сакута[4], Е.С. Умнякова[1], С.В. Баландин[2], Т.В. Овчинникова[2], В.Н. Кокряков [1], Д.С. Орлов[1]
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [3]ГНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург; [4]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Антимикробные пептиды (АМП) врожденного иммунитета – группа пептидов с различной структурой, преимущественно имеющих положительный суммарный заряд молекулы и амфипатические свойства. АМП содержатся в клетках, выполняющих защитные функции, и обладают антимикробной, иммуномодулирующей, а иногда и противоопухолевой активностью, а также проявляют ряд других эффектов, в том числе способны проникать как в бактериальные, так и в эукариотические клетки. В настоящее время разработка средств, обеспечивающих доставку лекарственных препаратов (ЛП) в опухолевые или инфицированные клетки, составляет важное направление биомедицины. К числу таких средств можно отнести проникающие пептиды (Cell-Penetrating Peptides – CPP), которые обладают способностью к интернализации в эукариотические клетки, а также могут переносить соединения различной природы через их мембраны. Поиск новых эффективных CPP является актуальной задачей экспериментальной медицины. С этой точки зрения антимикробные пептиды представляют несомненный интерес, так как на основе этих молекул могут быть разработаны не только эффективные переносчики лекарств через мембраны клеток, но и соединения, которые могут повышать активность этих ЛП.

Целью данной работы являлось изучение интернализации АМП различной структуры (пептид с конформацией β-шпильки – протегрин 1; пролин-богатые пептиды (ПБП) – бактенецины и ПБП слюны человека, а также их структурные аналоги; пептид-производное гистона H2A – аципенсин 1), несущих флуоресцентную метку, в клетки человека *in vitro*. С помощью проточной цитометрии количественно охарактеризован процесс интернализации пептидов, меченых BODIPY FL, в опухолевые и нормальные клетки. Применение конфокальной микроскопии позволило наблюдать распределение пептидов в клетках-мишенях. Установлено, что пептиды быстро проникают в клетки, эффективность их транслокации через клеточные мембраны зависит от структуры пептида и типа клеток; отобраны наиболее активные аналоги АМП. Изучена зависимость процесса интернализации от температуры среды и энергетического метаболизма клеток-мишеней. Полученные результаты подтверждают

перспективность дальнейшего исследования данных АМП как прототипов новых соединений-переносчиков ЛП в малигнизированные или инфицированные клетки. *Поддержано грантом РФФИ № 17-04-02177а.*

АНТИБИОТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ, ХЕМОКИНЫ И НЕЙРОПЕПТИДЫ КАК СОСТАВЛЯЮЩИЕ КОНТИНУУМА ЭФФЕКТОРНО-РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ ОРГАНИЗМА

В.Н. Кокряков[1,2], Г.М. Алешина[1], М.Н. Берлов[1,2], Е.С. Умнякова[1]
[1]Институт экспериментальной медицины; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Возрастающая тенденция формирования антибиотикорезистентности у клинически значимых штаммов бактерий диктует необходимость поиска новых противоинфекционных веществ. На основании исследований последних 20 лет в качестве источника таковых можно рассматривать эндогенные антибиотические пептиды (дефенсины, пептид LL-37, протегрины, бактенецины, аципенсины), хемокины CXC ELR- (CXCL9-CXCL13) и CC (CCL13, 19, 20, 25, 26) семейств, а также совокупность синтезируемых нервной и иммунной системами нейропептидов (субстанция Р, вазоактивный интестинальный пептид, α-меланоцит-стимулирующий гормон, грелин, орексин). Для молекул рассматриваемых физиологически активных полипептидов характерны положительный заряд и амфипатическая структура, которые определяют повышенную тропность этих соединений к мембранам микробных клеток и способность в микромолярных концентрациях (1-100 мкМ) инактивировать микроорганизмы, в том числе устойчивые к конвенциональным антибиотикам. Наряду с этим большинство представителей рассматриваемых полипептидов обладают иммуномодулирующими свойствами, как правило, реализуемыми через рецепторы, сопряженные с G-белками. Они опосредуют хемотаксис клеток иммунной системы в очаги инфекции и воспаления, дегранулируют тучные клетки, стимулируют синтез цитокинов и хемокинов, обладают адъювантной активностью, поляризуют адаптивный иммунный ответ в сторону либо Th1, либо Th2 типа, поддерживают формирование толерантности к собственным антигенам. Перечисленные иммуномодуляторные эффекты реализуются, как правило, в концентрациях на 3-6 порядков меньших, чем антимикробные. Широкий функциональный потенциал совокупности рассматриваемых физиологически активных полипептидов обеспечивает не только их прямое антимикробное действие, но и регулирующее воздействие на иммунные реакции организма, формируя их протективный характер. Это обстоятельство служит основанием для объединения антибиотических пептидов, хемокинов и нейропептидов в единый континуум эффекторно-регуляторных пептидов, формирующих и поддерживающих иммунный гомеостаз организма, значимый в реакциях противоинфекционной защиты. Функциональный потенциал этих физиологически активных полипептидов может быть востребован в медицине или ветеринарии с использованием химически синтезированных и/или рекомбинантных препаратов.

ДЕЙСТВИЕ В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА НА РАЗЛИЧНЫЕ ТИПЫ КЛЕТОК

Е.В. Наволоцкая
Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущино, Россия

В-субъединица холерного токсина является перспективным иммуномодулирующим и противовоспалительным агентом. Показано, что белок подавляет иммунопатологические реакции при аллергии и при аутоиммунных заболеваниях, стимулирует гуморальный иммунитет и индуцирует противовоспалительные реакции *in vivo*, в частности, уменьшает воспаление кишечника при болезни Крона. Поскольку CT-B способна ослаблять инфекционные заболевания и, в то же время, подавлять развитие аутоиммунных реакций, остается невыясненным вопрос, как эти два противоположных иммунных процесса могут быть опосредованы одним и тем же белком. В докладе будут представлены данные о действии В-субъединицы холерного токсина и синтетического пептида LKEKK, соответствующего последовательностям 16–20 тимозина-α1 и 131–135 интерферона-α2, на функциональную, NO-синтазную и гуанилатциклазную активность Т- и В-лимфоцитов, клеток мышиной макрофагальной линии RAW 264.7, эпителиальных клеток кишечника линий Caco-2 человека и IEC-6 крысы. Во всех случаях CT-B и пептид с высоким сродством связывались с рецептором холерного токсина клетки-мишени и запускали следующий каскад внутриклеточных реакций: активация индуцибельной NO-синтазы → возрастание продукции NO → увеличение активности растворимой гуанилатциклазы → возрастание уровня циклического гуанозин-3',5'-монофосфата.

КОНВЕРГЕНТНЫЙ СИНТЕЗ ГАЛАНИНА КРЫСЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Д.В. Авдеев, М.Е. Палькеева, А.А. Азьмуко, М.В. Овчинников, А.С. Молокоедов, Л.И. Серебрякова, О.М. Веселова, И.М. Студнева, О.И. Писаренко, М.В. Сидорова
Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии МЗ РФ, Москва, Россия

Работа является продолжением исследований по поиску и изучению пептидных кардиопротекторов. Мы показали, что N-концевые фрагменты галанина улучшают восстановление функции изолированного сердца крысы после тотальной ишемии и ограничивают размеры инфаркта миокарда (ИМ) у крыс *in vivo* после региональной ишемии и реперфузии сердца [1]. Работа посвящена синтезу полноразмерного галанина крысы H-GWTLNSAGYLLGPHAIDNHRSFSDKHGLT-NH2 (G) и изучению его биологической активности. Последовательность галанина представляется сложной для ступенчатого твердофазного синтеза (ТФС), так как при многостадийном синтезе длинных пептидов за счет неколичественных выходов на отдельных стадиях накапливаются «ложные» пептиды с пропуском аминокислотных остатков. Дополнительные проблемы связаны с происходящими в ходе ТФС побочными реакциями, характерными для остатков Trp, Asp, Ser, Thr, Arg. Поэтому очистка продукта ТФС, содержащего близкие по составу и свойствам примеси – сложный, многостадийный процесс. Для преодоления перечисленных проблем выбран твердофазно-фрагментный или конвергентный вариант синтеза галанина. Фрагменты получали на твердой фазе или в растворе и после очистки конденсировали на полимерном носителе. Кардиопротекторные свойства G изучали на модели острого инфаркта миокарда у наркотизированных крыс Вистар *in vivo*. Пептид G вводили внутривенно после периода

региональной ишемии в диапазоне доз 0.25–3.0 мг/кг. Введение G уменьшало размеры ИМ на 43% и снижало активность маркеров некроза МВ-креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в плазме к концу реперфузии по сравнению с контролем. Пептид G (0.5 мг/кг) улучшал метаболическое состояние сердца – увеличивал содержание АТФ, общего фонда адениннуклеотидов, фосфокреатина, общего креатина и снижал уровень лактата по сравнению с контролем. Результаты указывают на возможность использования пептида G в качестве препарата для уменьшения реперфузионных повреждений сердца и необходимость изучения механизмов его действия. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 18-015-00009).*

[1] L. Serebryakova et al. Peptides 111 (2019) 127–131.

ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВАГИНИТОВ НА ОСНОВЕ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ПЕНТАДЕФЕНИНА

Алексей А. Колобов[1], М.П. Смирнова[1,2], М.С. Захаров[1], Е.И. Ермоленко[3], Александр А. Колобов[1,2]
[1]ГНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России; [2]ООО «НПФ Верта»; [3]Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Вагинит – чаще всего инфекционное заболевание, характеризующееся воспалением слизистой оболочки влагалища и сопровождающееся болью, жжением, зудом и появлением серозных или гнойных выделений. Вагинит развивается у 15-80% женщин в различных популяциях хотя бы однажды в жизни и рецидивирует в течение года более чем в половине случаев.

Инфекционные вагиниты, как правило, развиваются при попадании специфических возбудителей (трихомонада, хламидия, гонококк, микоплазма и др.) и осложняются вторичной условно-патогенной инфекцией (стафилококк, стрептококк, кандида и др.). В ряде случаев для развития вагинита достаточно только условно-патогенной инфекции.

Терапия бактериальных вагинитов всё более затрудняется из-за распространения устойчивых к антибиотикам бактерий. Это определяет необходимость разработки новых средств их терапии на основе антибиотических агентов новых классов, например, антимикробных пептидов.

Целью данной работы стала разработка и доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственного препарата для лечения бактериальных вагинитов в форме геля для интравагинального введения. Активным компонентом препарата является синтетический пептид Пентадефенин (1 мг/мл). Он обладает прямым антибактериальным и антигрибковым действием – разрушает клеточные мембраны указанных организмов.

Препарат был испытан на модели бактериального вагинита, вызванного *Staphyllococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*. Уже в первые дни после введения препарат подавлял рост патогенных бактерий и снижал совокупное содержание условно-патогенных бактерий *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia* и *Porphyromonas spp.* во влагалище мышей. Также он способствовал восстановлению нормальной микрофлоры влагалища и редуцировал воспаление матки мышей на фоне инфекции.

Препарат не токсичен для грызунов и зайцеобразных при интравагинальном введении в дозе 2 г/кг, что в 10000 раз выше предполагаемой терапевтической дозы для человека. Препарат также не обладает хронической токсичностью и никакими другими формами токсичности.

Таким образом, разработанный препарат эффективно купирует инфекционный процесс во влагалище, безопасен и может быть использован в терапии бактериальных вагинитов.

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ

Стендовые доклады и конкурс молодых ученых

ИЗУЧЕНИЕ ТИМУСА КАК ИСТОЧНИКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ПРОТЕОМНЫМИ МЕТОДАМИ

А.Г. Ахремко, Е.Р. Василевская, Л.В. Федулова
ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

Органы и ткани сельскохозяйственных животных представляют собой неисчерпаемый ресурс биоактивных соединений белковой природы для создания на их основе биопрепаратов – стимуляторов неспецифического иммунитета. Наиболее интересными в этой связи представляются зобная железа (тимус) и костный мозг, являющиеся центральными органами иммунной системы. В нашей работе была предпринята попытка описать основные белки тимуса свиньи для выбора перспективных веществ, способных влиять на состояние иммунитета. На двумерных электрофореграммах (2ДЭ) образцов тимуса обнаружено в среднем 547 пятен. Анализ 2ДЭ при помощи программного обеспечения выявил 219 конститутивно присутствующих белков, в то время как в БД SwissProt охарактеризовано 22 фракции, а в TrEMBL – 97. Используя информационные ресурсы, обнаружен ряд белков с различной функциональной активностью: многофункциональный гормон адреномедуллин 5 (12,5 кДа), относящийся к числу наиболее эффективных вазоактивных факторов; свиной гликопротеин CD47 (33,25 кДа), участвующий в регуляции фагоцитоза и играющий роль в межклеточном взаимодействии. Также обнаружен многофункциональный негистоновый белок HMG2 (24,13 кДа), вызывающий структурные изменения в ДНК посредством неспецифического связывания с В-ДНК; интерлейкин-17А (17,37 кДа), вызывающего экспрессию антимикробных пептидов, индуцирующих продукцию ряда противоспалительных цитокинов, также индуцирующего миграцию нейтрофилов макрофагов в область воспаления и их активацию с последующим повреждением тканей. Детектированы следующие белки с иммунореактивной функциональностью: протокадгерин-11, участвующий в кальций-зависимой клеточной адгезии; белок активирующий рекомбинации 1, отвечающий за регуляцию хроматина, эндонуклеазную активность и связывание гистонов; компонент комплемента С7, играющий ключевую роль во врожденном и адаптивном иммунном; глутатион S-трансфераза омега-1, участвующая в клеточном ответе на

токсичные вещества и цистатин Б, ингибирующий протеазы. Полученные результаты служат начальной стадией обоснования эффективности ранее разработанного ветеринарного иммунорегулятора. *Работа выполнена при поддержке РНФ проект № 15-16-00008 (П).*

НОВЫЙ ПОРИНОПОДОБНЫЙ БЕЛОК ИЗ МОРСКОЙ ПСИХРОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *MARINOMONAS PRIMORYENSIS*

О.Д. Новикова, В.А. Хоменко, Н.Ю. Ким, Г.Н. Лихацкая, Л.А. Романенко, О.В. Черников, Д.К. Чистюлин, О.Ю. Портнягина, Т.Ф. Соловьева
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова, Владивосток, Россия

В состав бактериальных консорциумов, способных деградировать углеводороды, входят различные виды бактерии, в том числе морские бактерии рода Marinomonas. Как наиболее распространенный загрязнитель вод мирового океана нефтепродукты оказывают влияние на естественное соотношение микроорганизмов в биоценозах, изменяют метаболизм морских бактерий и структуру их клеточных мембран. Изучение особенностей структуры и функции белков-поринов, образующих систему гидрофильных пор в мембране, представляет фундаментальный интерес в силу значительных изменений в организации клеточной стенки морских бактерий под влиянием экстремальных условий обитания. В настоящей работе охарактеризованы физико-химические и функциональные свойства порина из наружной мембраны бактерии *Marinomonas primoryensis* (штамм КММ 3633Т), выделенной из образцов морского льда Амурского залива Японского моря вблизи Владивостока. Электрофоретически гомогенный белок был получен в результате экстракции бактериальных клеток неионным детергентом octyl-POE (n-Octylpolyoxyethylene) и очистки на сефакриле S-300. Тример порина *M. primoryensis* (MpOmp) оказался неустойчив к действию температуры. Критическая температура перехода его в мономерную форму составила 45-50 °C в отличие от таковой для поринов наземных бактерий (50-70°C). Молекулярная масса мономера белка составила 43 кДа. Была определена N-концевая последовательность (GETSTVDVRGNIQRA-) и аминокислотный состав выделенного белка. Установлено, что он содержит большее, по сравнению с основными, количество кислых аминокислот и не содержит цистеина. Порин обогащен полярными аминокислотами, что необычно для мембранных белков, индекс его полярности составляет 1.63. При реконструкции MpOmp в искусственные бислойные мембраны были обнаружены характерные для поринов ступенчатые флуктуации тока через пориновый канал. При изменении концентрации соли в водной фазе в диапазоне 0.5-2.0 М наблюдалась линейная зависимость проводимости канала от потенциала на мембране. Анализ спектров КД порина *M. primoryensis* в ароматической области показал, что мономеры белка в тримере слабо связаны друг с другом. Соотношение элементов вторичной структуры характерно для β-складчатых белков со структурой типа α+β: содержание β-структуры составляет 70%, α-структуры – 4.9%. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-04-00318*

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ И ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЯДА ПАУКА *TIBELLUS OBLONGUS* И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЕГО ПЕПТИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Я.А. Андреев [1,2], Е.М. Соловьева[3], А.Н. Миков[1], А.А. Лобас[3], Ю.В. Королькова[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ; [3]Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва, Россия

Природные яды являются неисчерпаемым источником биологически активных соединений. С химической точки зрения токсины ядов пауков могут иметь низкомолекулярную, пептидную и белковую природу. Одними из самых интересных представляются пептидные компоненты ядов пауков, составляющие основную часть яда. Для всестороннего структурного и функционального исследования пептидных компонентов яда (токсинов) паука *Tibellus oblongus* из семейства Philodromidae был проведен транскриптомный анализ данных секвенирования кДНК ядовитых желёз. В библиотеке транскриптов (1710 клонов) установлены структуры всех закодированных белков-предшественников, а также координаты их посттрансляционного процессинга. Получены последовательности 388 зрелых пептидов, которые кодируются молекулами мРНК ядовитых желёз *Tibellus oblongus*.

Пептидная фракция яда *Tibellus oblongus* была использована для проведения протеомного анализа. Массы соответствующих молекулярных ионов были сопоставлены базе данных пептидных последовательностей, сформированной на основе транскриптома. Также был проанализирован триптический гидролизат яда с идентификацией последовательностей на основе масс-спектров фрагментации. Установлено, что как минимум 113 пептидов, предсказанных из транскриптома, реально содержатся в яде паука в виде зрелых пептидных токсинов.

Для более детального структурного и функционального изучения выбраны 3 пептида паука *Tibellus oblongus*, содержащие необычный цистеиновый каркас, в бактериальной системе экспрессии получены их рекомбинантные аналоги. При первичной проверке биологической активности для 2 рекомбинантных пептидов обнаружена значимая инсектотоксичность (LD 100 – 1 и 100 мкг/г, соответственно). Можно предположить, что данные пептиды селективно воздействуют на мембранные транспортные системы насекомых и могут рассматриваться как перспективная основа для получения новых безопасных инсектицидов. *Проект поддержан РФФИ, грант № 18-04-00994 А.*

РЕГУЛЯЦИЯ ПОЛИФЕНОЛАМИ МЕМБРАННОЙ АКТИВНОСТИ α-СИНУКЛЕИНА

С.С. Ефимова, О.С. Остроумова
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

α-Синуклеин представляет собой пресинаптический мембранно-активный нейрональный белок, увеличение содержания которого связано с болезнью Паркинсона. Используя модельные липидные мембраны и метод электрофизиологической реги-

страции трансмембранных токов, было изучено влияние растительных полифенолов на порообразующую активность α-синуклеина в бислоях из пальмитоолеоилфосфохолина. α-Синуклеин добавляли к водным растворам (0.1 M KCl, pH 7.4) с одной стороны бислоя до конечной концентрации 1-3 мкМ. В работе было выявлено, что добавка 20 мкМ флоретина, бутеина и изоликвиритигенина в мембраноомывающие растворы вызывала увеличение белок-индуцированного трансмембранного тока в 5, 1.5 и 2 раза соответственно. Кардамонин, 4'-гидроксихалкон и ресвератрол практически не влияли на мультиканальную активность α-синуклеина. Принимая во внимание результаты нашего предыдущего исследования влияния полифенолов на порообразующую активность фрагмента 25-35 амилоидного β-пептида в липидных бислоях [Ефимова и др., Цитология 2015; Ефимова и Остроумова, Цитология, 2019], можно предположить, что полифенолы специфически взаимодействуют с амилоидными олигомерами. Обсуждаются структурные особенности молекул растительных полифенолов и амилодиных олигомеров, ответственные за предполагаемое взаимодействие. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РНФ (№ 19-14-00110). С.С. Ефимова отмечена Стипендией Президента РФ (СП-484.2018.4).*

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЕПТИДНЫХ БЛОКАТОРОВ КАЛИЕВЫХ KV1-КАНАЛОВ CE4 И CE5 ИЗ ЯДА СКОРПИОНА *CENTUROIDES ELEGANS*

Н. Орлов[1], А. Феофанов[2,3], А. Вихров[2], О. Некрасова[2]
[1]Биологический факультет, Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Китай; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [3]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Пептидные блокаторы калиевых потенциал-зависимых каналов (Kv) широко представлены в яде скорпионов. Эти пептиды характеризуются высокой аффинностью и селективностью связывания с каналами, являются инструментом изучения каналов и обладают фармакологической активностью. Изучение на молекулярном уровне многообразных форм их взаимодействия с каналами позволяет установить связь структурной организации пептидов с их биологической активностью. Токсины семейства α-KTx 2 представлены 15-ю пептидами с молекулярной массой около 4000 Да. Они имеют пространственную укладку типа CSα/β (cysteine-stabilized alpha-beta) с 3-мя дисульфидными связями. Три из этих токсинов (ноксиустоксин, маргатоксин и хонготоксин) хорошо охарактеризованы по связыванию с калиевыми каналами семейства Kv1, известна их 3D структура. Активность остальных пептидов малоизученна. Нами получены рекомбинантные пептиды Ce4 и Ce5 из яда скорпиона *Centuroides elegans*, являющиеся близкими гомологами хонготоксина. Рецептор-связывающая активность этих пептидов была изучена в биоинженерной аналитической системе на модельных калиевых каналах KcsA-Kv1.x (x=1, 3, 6). В качестве зонда впервые был использован синтетический хонготоксин, меченный по N-концу Atto-488 (A-HgTx1). Активность пептидов определяли методом конкурентного ингибирования связывания меченого пептида немеченым. Валидацию системы проводили путем определения кажущейся константы диссоциации (Kap) известных пептидных блокаторов, полученных нами в рекомбинантной форме (агитоксин, харибдотоксин, хонготоксин, маргатоксин, калиотоксин). Показано, что применение в качестве зонда A-HgTx1, высоко гомологичного по структуре немеченым пептидам семейства α-KTx2, повышает достоверность определения величины Kap этих пептидов в реакции конкурентного связывания с целевыми каналами. Полученные данные могут быть использованы для рационального дизайна пептидных блокаторов, обеспечивающих высокую избирательность распознавания целевых калиевых каналов, что актуально для создания перспективных лекарственных средств. *Работа поддержана грантом РНФ 19-74-30014. Получение рекомбинантных пептидов агитоксина, харибдотоксина, маргатоксин и калиотоксин подержано Программой Президиума РАН «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий».*

ПРОИЗВОДНЫЕ ПЕПТИДНЫХ МОДУЛЯТОРОВ TRPA1 СНИЖАЮТ БОЛЕВОЙ ОТВЕТ У МЫШЕЙ, ВЫЗВАННЫЙ ДЕЙСТВИЕМ СЕЛЕКТИВНОГО АГОНИСТА КАНАЛА

Ю.А. Логашина[1,2], Е.Е. Малеева[1], Я.А. Андреев[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Институт молекулярной медицины, Москва, Россия

Ионные каналы играют важную роль во многих патологических процессах, таких как боль, воспаление, нейродегенерация и др. В связи с этим поиск модуляторов ионных каналов является перспективной научной и фармакологической задачей. Животные яды содержат большое количество биологически активных соединений, в том числе и модуляторов различных ионных каналов. Актинии, или морские анемоны, синтезируют соединения, которые эволюционно воздействуют на ортологи человеческих каналов и могут оказывать терапевтическое действие на млекопитающих. Во время поиска модуляторов канала TRPA1 (анкириновый канал временного рецепторного потенциала), который играет существенную роль в инициации и распространении болевых сигналов при воздействии вредных химических, механических и термических (низкие температуры) стимулов, из ядов морских анемонов Urticina eques и Metridium senile были выделены пептиды Ueq12-1 и Ms9a-1, соответственно. Оба пептида являются положительными модуляторами TRPA1. В электрофизиологических экспериментах на ооцитах Xenopus laevis, экспрессирующих TRPA1, Ueq12-1 и Ms9a-1 усиливают агонист-индуцированный ток через ионный канал. В то время как инъекция пептидов в заднюю лапу мыши не вызывает боль, отек лапы или термическую гипералгезию. Кроме того, внутривенная инъекция пептидов снижает ноцицептивное поведение у мышей и отек лапы, вызванные введением специфического агониста TRPA1 аллилизотиоцианата (AITC), а также уменьшает неспецифическое воспаление, индуцированное полным адъювантом Фрейнда. С целью определения активных сайтов пептидов было проанализировано влияние N-концевых и C-концевых доменов Ueq12-1 и Ms9a-1 на канал TRPA1 in vitro и in vivo. В результате было обнаружено, что короткие пептиды способны модулировать активность TRPA1 менее эффективно, по сравнению с природными пептидами, и не оказывают влияния на развитие неспецифического воспаления. Однако они сохранили антиноцицептивный эффект на AITC-индуцированную

боль. Следовательно, пептидные производные Ueq12-1 и Ms9a-1 обладают селективным механизмом действия и могут служить в качестве основы лекарственных препаратов для лечения патологических состояний, связанных с активностью TRPA1. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00167).*

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА gap-43 В ООЦИТАХ И ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНАХ МЫШИ

Л.А. Постникова[1], В.В. Захаров[2,3], Ф.М. Захарова[1,4]
[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; [2]НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина; [3]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; [4]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Нативно-неупорядоченный белок GAP-43 (Growth-Associated Protein-43) является маркером развития и пластичности нервной системы. Первоначально GAP-43 был обнаружен на плазматической мембране аксонных окончаний в мозге позвоночных животных, где он участвует в «навигации» конусов роста аксонов по ориентирующим внеклеточным сигналам. Основная форма белка GAP-43 в нейронах – мембранная. Связывание белка GAP-43 с мембраной обусловлено пальмитоилированием двух остатков цистеина (Cys3 и Cys4). В нейронах также присутствует укороченная форма белка (GAP-43-2), лишенная четырех N-концевых остатков и локализованная в цитоплазме тела нейрона. Высказывались предположения, что это протеолитический фрагмент основной формы белка, однако механизм его образования не был изучен. Ранее нами было впервые обнаружено присутствие белка GAP-43 в ооцитах и преимплантационных эмбрионах мыши, где он не связан с плазматической мембраной и локализован на веретене деления метафазы II, на центрах организации микротрубочек, а также в цитоплазме и ядрах бластомеров. При исследовании промоторной области гена GAP43 в базе данных FANTOM5 мы обнаружили, что она содержит четыре сайта инициации транскрипции (TSS), вероятно соответствующие четырем различным промоторам. Три проксимальных сайта TSS1, TSS2 и TSS3 связаны с экспрессией гена GAP43 в нейронах. Дистальный сайт TSS4 связан с экспрессией гена GAP43 в нейрональных предшественниках. Это ставит вопрос о том, какой промотор обуславливает экспрессию GAP43 в ооцитах и ранних эмбрионах мыши. Мы предположили, что наблюдаемая в ооцитах цитоплазматическая форма белка GAP-43 является укороченным белком GAP-43-2, а механизмом его образования является альтернативная инициация трансляции с кодона, соответствующего остатку Met5. Данное явление может быть связано с особенностью транскрипции GAP43 в ооцитах, где образуется только самый короткий мРНК-транскрипт (с сайта TSS1) с короткой 5\'-нетранслируемой областью. Особенности экспрессии гена GAP43 в ооцитах и ранних эмбрионах будут исследованы с помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, для обнаружения возможных вариантов мРНК-транскриптов, а также с помощью 5\'-RACE-анализа для картирования их 5\'-концов. *Работа поддержана грантом РФФИ № 18-04-01357.*

АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД В КЛЕТКАХ КРОВИ: ВОЗМОЖНОСТИ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ИССЛЕДОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

А.Н. Семенов[1], Е.А. Ширшин[1], Б.П. Якимов[1], А.Н. Великанов[2], С.А. Родионов[3], А.В. Муравьев[4], А.В. Приезжев[1]
[1]МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [2]Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова, Москва, Россия; [3]ЯГПУ имени К.Д. Ушинского, Ярославль, Россия

Системы внутриклеточной сигнализации представляют собой комплексы белков, участвующих в каскадных биохимических превращениях, регулируемых вторичными мессенджерами. Одним из распространенных универсальных вторичных мессенджеров в клетках млекопитающих является цАМФ, который синтезируется ферментом аденилатциклазой (АЦ). Стимулирование комплекса G-белков, ассоциированных с АЦ, ведет к росту концентрации цАМФ внутри клетки и стимулированию цАМФ-зависимых протеинкиназ, способных фосфорилировать аминокислотные остатки белков в составе клеточных структур. Знание молекулярных механизмов внутриклеточной сигнализации позволит регулировать функционал этих систем в живой клетке. Исследование механизмов внутриклеточной сигнализации затруднено сложной организацией сигнальных каскадов. В этой связи, необходимо использование современных малоинвазивных методов молекулярного имиджинга, способных быстро и эффективно охарактеризовать процессы, происходящие в клетке в ответ на стимулирование и ингибирование элементов сигнальных каскадов. Нами было показано, что метод лазерной эктацитометрии чувствителен к изменениям деформируемости эритроцитов при стимулировании АЦ-каскада: при селективном стимулировании бета2-адренорецепторов, ассоциированных с АЦ-каскадом, с помощью метапротеренола (10 μM), наблюдается увеличение индекса деформируемости (ИД) эритроцитов при внешнем сдвиговом напряжении 3 Па: 0.344±0.009 (0.327±0.012 в контроле). Измерения были проведены на N=10 здоровых донорах мужского пола. С помощью метода восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) было получено, что метапротеренол (50 μM) также приводит к увеличению текучести цитоплазматической мембраны эритроцитов: коэффициент диффузии липофильного красителя в мембране составил 0.0687±0.0015 мкм2/с (0.0551±0.0022 мкм2/с в контроле). Таким образом подтверждается положительный эффект стимуляции АЦ-каскада на микрореологические параметры эритроцитов. Полученные знания могут оказаться полезными в клинической гематологии при коррекции гемореологических нарушений при социально-значимых заболеваниях (сахарный диабет обоих типов, артериальная гипертензия и др.). *Работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ 18-32-00756 и 19-02-00947.*

СЕРОТОНИН УВЕЛИЧИВАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК К НОРАДРЕНАЛИНУ

В.И. Чечехин, А.М. Иванова, П.А. Тюрин-Кузьмин, Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Ожирение – одна из наиболее серьезных медицинских проблем. Повышение веса является побочным эффектом ряда медицинских препаратов, например, антидепрессантов, ингибирующих обратный захват моноаминов. Серотонин является ключевым регулятором метаболизма жировой ткани, вызывая её гипертрофию и гиперплазию, которая возможно связана с активацией адипогенной дифференцировки МСК. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) выявляются в большинстве тканей организма и играют ключевую роль в процессах репарации, регенерации и поддержании гомеостаза. Ключевым регулятором функциональной активности МСК является норадреналин. Ранее мы показали, что при стимуляции сигнального пути β-адренорецепторы/Gs-белок/аденилатциклаза/цАМФ через 6 часов происходит повышение экспрессии α1A-адренорецепторов и, как следствие, повышение чувствительности МСК к этому гормону. В данной работе мы изучали, как влияют нейромедиаторы, концентрация которых повышается при приеме антидепрессантов, на функциональную активность МСК. Для выяснения механизмов влияния антидепрессантов на жировую ткань мы выяснили, какие изоформы рецепторов норадреналина и серотонина, сопряженные с Gs-белком, экспрессируются в МСК. Методом ПЦР мы установили, что в МСК экспрессируются мРНК рецепторов серотонина (HTR6, HTR7), и на уровне белка показали, что МСК экспрессируют β1-, β2- и β3-адренорецепторы. Затем мы стимулировали ими МСК и через 6 часов анализировали их чувствительность к норадреналину и установили, что серотонин повышает число клеток, отвечающих на норадреналин. Путем вестерн-блоттинга мы установили, что через 6 часов после преинкубации с серотонином в МСК повышается уровень экспрессии α1A-адренорецепторов. Кроме того, мы показали с помощью ингибиторного анализа и ИФА, что серотонин повышает экспрессию α1A-адренорецептора через сигнальный каскад HTR6/аденилатциклаза/цАМФ/PKA/CREB и EPAC. В случае норадреналина повышение экспрессии α1A-адренорецепторов не связано с активацией CREB и EPAC. Таким образом, сопряжение адренергических рецепторов с кальциевой сигнализацией за счет повышения уровня экспрессии α1A-адренорецепторов в МСК при действии серотонина регулируется путем HTR6/Gs-белок/аденилатциклаза/цАМФ/PKA/CREB и EPAC. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00421.*

МУЛЬТИМЕРИЗАЦИЯ ДНК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДНК ПОЛИМЕРАЗЫ Bst exo

Р.Р. Гарафутдинов, А.Р. Гильванов, З.Н. Фазлетдинова, А.Р. Сахабутдинова
Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

В последние годы все большее распространение приобретают методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот, для чего используются ДНК полимеразы с цепь-вытесняющей активностью. Среди подобных полимераз одной из самых популярных является ДНК полимераза Bst exo- (большой фрагмент ДНК полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus*). В наших работах была подтверждена открытая ранее способность ДНК полимеразы Bst exo- (всех ее коммерческих форм Bst Large Fragment, Bst 2.0, Bst 2.0 WarmStart, Bst 3.0) давать мультимерные продукты на линейных ДНК-матрицах, что характерно исключительно для реакции амплификации катящимся кольцом. Нами впервые было обнаружено, что мультимерные продукты представляют собой тандемно расположенные нуклеотидные последовательности исходной ДНК-матрицы с редукцией ее концевых фрагментов, причем размер делеций варьировал в зависимости от различных факторов. Наибольшая эффективность мультимеризации наблюдалась при использовании полимеразы Bst 2.0, при температуре 55-60°C, при проведении реакции в объеме около 15-20 мкл. Оптимальная для протекания мультимеризации длина ДНК мишени составляет 51 нуклеотид. Оказалось, что SYBR Green I в концентрации свыше 0,25× ингибирует мультимеризацию. С помощью молекулярного докинга в три- и тетрануклеотидном приближении, а также экспериментально на мишенях с разной нуклеотидной последовательностью была изучена предпочтительность связывания полимеразы Bst exo- с ДНК. Так, для комплексов, состоящих из закрытой формы Bst полимеразы и двуцепочечных тринуклеотидов с метилфосфатными группами по 5'- и 3'-концам дуплекса, обнаружена наиболее выраженная предпочтительность связывания активного центра фермента с AT-богатыми нуклеотидными последовательностями. Анализ аминокислотной последовательности и трехмерной структуры позволил нам сконструировать измененную структуру фермента и получить его новую мутантную форму, которая изучается на способность вызывать мультимеризацию ДНК. Полученные данные могут позволить оптимизировать условия проведения изотермической амплификации с Bst полимеразой и для подавления образования неспецифических продуктов и повышения тем самым специфичности реакции, что важно, например, в ДНК-диагностике.

IN SILICO АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СТЕПЕНИ ОКИСЛЕНИЯ АЛЬБУМИНА НА ЕГО СВЯЗЫВАЮЩУЮ И ЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЯМ

Д.А. Белинская[1], А.А. Баталова[1], Н.В. Гончаров[1,2]
[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН; [2]НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Известно, что, помимо транспортной функции, альбумин обладает и эстеразной активностью, в том числе и по отношению к фосфорорганическим соединениям (ФОС). Показано, что сайт Садлоу I альбумина с каталитическим аминокислотным остатком Tyr150 отвечает за истинно эстеразную активность белка (связывание субстрата с активным центром с последующим распадом комплекса на фермент и продукт), а сайт Садлоу II с каталитическим аминокислотным остатком Tyr411 – за псевдоэстеразную (необратимое связывание субстрата с ферментом). Направленная модуляция связывающей и/или эстеразной активности альбумина поможет усилить детоксикацию ФОС в кровеносном русле. Окисление свободного цистеина Cys34 может

стать одним из возможных способов направленной модификации белка. Цель представленного исследования – методами молекулярного моделирования изучить влияние степени окисления Cys34 альбумина человека (ЧСА) на его связывающую и каталитическую активность по отношению к параоксону. Были рассмотрены три модели степени окисления цистеина: (1) Cys34 восстановлен, (2) Cys34 окислен до сульфеновой кислоты и (3) Cys34 окислен до сульфиновой кислоты. Конформационные характеристики комплексов ЧСА с параоксоном в сайтах Садлоу I и Садлоу II были изучены методом молекулярной динамики. Возможность реакции фосфорилирования была проанализирована по расстоянию между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитических тирозинов сайтов Садлоу I и II. Значения свободной энергии связывания параоксона с ЧСА были рассчитаны методом MM-PBSA. Согласно полученным данным, окисление Cys34 не влияет на связывающую активность ЧСА по отношению к параоксону в сайтах Садлоу I и Садлоу II, не влияет на эстеразную активность в сайте Садлоу I, но увеличивает вероятность псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-015-00304) и в рамках госзадания АААА-А18-118012290142-9.*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АТИПИЧНЫХ ЦИТОХРОМОВ P450 КЛАНА CYP74

С.С. Горина, Е.О. Смирнова, Е.К. Аскарова, Л.Ш. Мухтарова, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин
Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Казанского научного центра РАН, Казань, Россия

Ферменты клана CYP74 принадлежат к атипичным цитохромам P450. Уникальным свойством этих ферментов является отсутствие необходимости в молекулярном кислороде для протекания реакции. Ферменты CYP74 используют гидроперекиси жирных кислот, которые служат как субстратом, так и донором кислорода, что приводит к биосинтезу многочисленных биологически активных оксилипинов у высших растений, некоторых протеобактерий, Metazoa, бурых и зеленых водорослей. Клан CYP74 включает алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). За последние годы нами были охарактеризованы новые представители клана CYP74, среди которых были идентифицированы первые 13-специфичные ДЭС (LuDES (*Linum usitatissimum*) и RaDES (*Ranunculus acris*)), первые ферменты CYP74 Lycopodiophyta (SmDES1 и SmDES2 (*Selaginella moellendorffii*)) и первые ЭАС растений (SmEAS (*S. moellendorffii*), RjEAS (*Ranunculus japonicus*)). Кроме этого, были обнаружены CYP74 и CYP74-подобные ферменты среди представителей Chordata, Cnidaria, Placozoa. Эксперименты с меченым [18O] кислородом позволили нам установить механизм каталитического действия ЭАС. Полученные данные свидетельствуют, что ферментативная реакция идет следующим образом: (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировка образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпоксиспирт. Продукты реакций идентифицировали методами газовой хромато-масс-спектрометрии, ЯМР и УФ-спектроскопии. Индивидуальные оксилипины очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Исследования ферментов Selaginella moellendorffii проводились при финансовой поддержке гранта МК-5989.2018.4. *Эксперименты по ГХ-МС и ЯМР были поддержаны грантом РФФИ 18-04-00508_а.*

РОЛЬ LAM БЕЛКОВ ПЕРЕНОСЧИКОВ СТЕРИНОВ В ЗАЩИТЕ ОТ СТРЕССА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

С.С. Соколов[1], М.А.Воробьева[2], Н.И.Трушина[2], Ф.Ф.Северин[1], Д.А.Кнорре[1,3]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Факультет почвоведения, МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Основной стерин дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* эргостерин синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), откуда транспортируются в другие клеточные мембраны, в том числе в плазматическую мембрану (ПМ), в которой содержится до 90% клеточных стеринов. Скорость транспорта стеринов между ЭР и ПМ высока, она более чем в 10 раз превышает расчетную величину скорости пополнения стеринового пула ПМ, необходимую для пролиферации. Транспорт осуществляется белками семейств Osh и Lam. Белки Lam1 - Lam4 локализуются в местах контактов ЭР и ПМ. Поскольку они, по видимому, способны дублировать функции друг друга фенотипические проявления одиночных делеций LAM генов слабо выражены. Мы исследовали фенотипические проявления одиночных, двойных и четверных нарушений LAM1 - LAM4 генов. В большинстве стрессовых условий: высушивание, замораживание, тепловой стресс, добавление Амфотерицина B, этанола, изопропанола, высоких концентраций NaCl фенотипические проявления lam мутаций схожи: изменяется чувствительность к стрессам тем сильнее, чем больше генов нарушено. При этом основной вклад вносит нарушение гена LAM2. В ряду других стрессов, таких как добавление SDS, бутанола, клотримазола, эффекты нарушения попарных гомологов lam1 и lam3 было противоположно эффекту нарушения попарных гомологов lam2 и lam4. Нарушение lam1lam3 приводило к небольшому увеличению устойчивости, а нарушение lam2lam4 к значительному снижению устойчивости. Исследование генетических взаимодействий LAM2 гена с генами, кодирующими ферменты биосинтеза эргостерина ERG генами показало, что нарушение транспорта стеринов (lam2) проявляет себя в различном направлении в зависимости от особенностей стеринового состава (erg). Делеция LAM2 гена в штаммах с делециями генов биосинтеза эргостерина (ERG2-ERG6) в некоторых случаях приводила к значительному снижению резистентности к стрессам. Этот результат, вероятно, связан с тем, что интермедиаты биосинтеза эргостерина (например зимостерин, фекостерин) хуже связываются липид-связывающим доменом Lam-белков. В этом случае, активности оставшихся Lam-белков может не хватать для переноса этих стеринов между мембранами клетки, что в конечном счете снижает ее приспособленность в стрессорных условиях. *Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ №18-14-00151.*

ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА БЕЛОК-ЛИГАНДНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Е.А. Рыскина[1], Ф.Н. Гильмиярова[2], Н.А. Колотьева[2]
[1]Российский университет дружбы народов, Москва; [2]Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

Межмолекулярное белок-лигандное взаимодействие является ключевым механизмом регуляции метаболических, транспортных, рецепторных и иммунологических процессов. В качестве объекта изучения были выбраны антиген-антительное и фермент-субстратное взаимодействия, а фактором воздействие этанол - низкомолекулярное соединение с высокой химической активностью. Для оценки действия этанола на антиген–антительное взаимодействие системы АВ0 крови разработана модельная система и поставлен ряд экспериментов. Перед постановкой реакции гемагглютинации мы осуществляли предварительную инкубацию с этанолом раздельно - эритроцитов разных групп крови с антигенами А и В на поверхности мембраны; анти-А и анти-В антител плазмы крови; анти-А и анти-В моноклональных антител. В одной серии экспериментов выявлено снижение степени агглютинации и уменьшение времени начала агглютинации антигенов А и В эритроцитов различных групп крови под влиянием этанола. В другой серии экспериментов показано повышение степени агглютинации анти-А и анти-В антител плазмы крови с эритроцитами соответствующей группы крови. Степень агглютинации анти-А иммуноглобулинов увеличилась на 20%, а анти-В иммуноглобулинов на 25%. Предварительная инкубация с этанолом анти-А и анти-В моноклональных антител способствовала более быстрой агглютинации с эритроцитами А(II) и В(III) групп крови, время наступления агглютинации уменьшилось на 16,6%. В условиях in vitro этанол может регулировать фермент-субстратное взаимодействие дегидрогеназ: глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (КФ1.1.1.12), а-глицерофосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.8) и лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27). Увеличение активности исследуемых ферментов под влиянием этанола в гемолизате цельной крови было в 2,5–3 раза выше, чем в изолированной среде (с чистыми препаратами ферментов). С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии наглядно продемонстрировано, что под влиянием этанола изменялись размер и количество комплексов антиген–антитело эритроцитов различных групп крови. Полученные нами данные позволяют дополнить представление о белок-лигандном взаимодействие в определенных условиях, прямо или опосредованно влияющих на это взаимодействие.

ВАЖНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИНЕТИЧЕСКОГО РЕЖИМА ПРОЦЕССА АГРЕГАЦИИ БЕЛКА-МИШЕНИ ПРИ ОЦЕНКЕ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ШАПЕРОНОВ

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

Установление механизма подавления агрегации белков шаперонами является актуальной задачей современной биохимии и молекулярной биологии. Для корректной интерпретации экспериментальных данных необходимо понимание механизма и кинетического режима процесса агрегации белка-мишени. Тест-система, основанная на агрегации УФ-облученной гликоген-фосфорилазы b (УФ-ФБ), привлекает исследователей возможностью изучать защитное действие агентов при физиологических температурах. Кинетика тепловой агрегации УФ-ФБ при 37 град. С исследовалась в широком диапазоне концентраций белка с использованием метода динамического светорассеяния. Порядок агрегации по белку для УФ-ФБ установлен равным единице. Показано, что скорость-лимитирующей стадией процесса роста агрегатов является стадия структурной реорганизации молекулы УФ-ФБ, характеризующаяся константой скорости первого порядка kI. Предложена схема процесса агрегации УФ-ФБ, включающая в себя относительно медленную стадию структурной реорганизации молекулы УФ-ФБ, содержащей скрытые повреждения, стадию нуклеации и стадию роста агрегатов. Понимание механизма тепловой агрегации УФ-ФБ позволило оценить влияние различных факторов и агентов на данный процесс. Показано, что увеличение дозы облучения значительно ускоряет структурную реорганизацию молекулы УФ-ФБ. Установлено, что рост ионной силы приводит к увеличению длительности стадии нуклеации и замедлению процесса структурной реорганизации УФ-ФБ. При этом происходит образование агрегатов меньшего размера при той же доле агрегированного белка, что свидетельствует об изменении механизма агрегации УФ-ФБ. Заметное влияние на механизм агрегации УФ-ФБ при физиологических значениях ионной силы (0,15 М) оказывают и химические шапероны аргинин, трегалоза и 2-оксипропил-бета-циклодекстрин (HPCD). Аргинин ускоряет структурную реорганизацию УФ-ФБ и стимулирует образование более крупных агрегатов. Трегалоза или HPCD увеличивают длительность стадии нуклеации, замедляют структурную реорганизацию молекулы УФ-ФБ и приводят к образованию как крупных, так и большого количества мелких агрегатов. Интересно, что при высокой ионной силе (0,5 М) аргинин подавляет агрегацию УФ-ФБ, практически не оказывая влияния на механизм агрегации белка-мишени. *Работа частично поддержана грантом РНФ (16-14-10055).*

СТРУКТУРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПЕПТИДНЫХ МОДУЛЯТОРОВ ASIC КАНАЛОВ МОРСКИХ АНЕМОН СЕМЕЙСТВА STICHODACTYLIDAE

И.Н. Гладких, Р.С. Калина, О.В. Синцова, Е.В. Лейченко, М.П. Исаева, Э.П. Козловская, М.М. Монастырная
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Протон-чувствительные ионные каналы (ASIC channels), принадлежащие к семейству натриевых каналов/дегенеринов (NaC/DEG), являются детекторами малейших изменений значений pH среды и обладают важной регуляторной функцией, как в периферической, так и центральной нервной системе. Локальные изменения значений pH в физиологических условиях, например, в синапсах во время нейрональной активности, носят временный характер. Однако при патологиях, связанных с ишемией, воспалением или ростом опухоли, развивается длительный ацидоз тканей, который вызывает боль, резко снижающую качество жизни человека. Известные низкомолекулярные модуляторы ASIC каналов являются неселективными и/или малоэффективными и вызывают нежелательные побочные эффекты, что сильно ограничивает возможность их применения.

Поэтому поиск новых пептидных лигандов, специфично действующих на молекулярные механизмы генерации боли с минимальными побочными эффектами, является весьма актуальной задачей. Пептидные токсины ядовитых животных, пауков, змей и морских анемон, рассматривают как потенциальные модуляторы ASIC каналов. В настоящее время из морских анемон, в основном семейства Actiniidae, выделено и охарактеризовано семь пептидов-модуляторов ASICs, пептиды были обнаружены также в результате транскриптомного анализа. В данной работе изучено разнообразие пептидов-модуляторов ASIC каналов трёх видов морских анемон семейства Stichodactylidae методами молекулярной биологии. Для определения разнообразия генов, кодирующих пептиды, были сконструированы ген-специфичные праймеры на основе ранее полученных нуклеотидных последовательностей генов Heteractis crispa. Показано, что пептиды-модуляторы ASICs представлены только в морских анемонах H. crispa и Heteractis magnifica, причем их аминокислотные последовательности отличаются. Полученные пептиды пополнят арсенал возможных биохимических инструментов для выяснения механизмов функционирования разных изоформ ASIC каналов и станут основой для конструирования эффективных анальгетических препаратов. *Работа частично поддержана грантом РФФИ № 18-38-00387.*

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕНЫ ОСТАТКОВ R65 И M182 НА СТАБИЛЬНОСТЬ β-ЛАКТАМАЗ ТЕМ ТИПА

В.Г. Григоренко[1], И.П. Андреева[1], О.В. Серова[2], А.В. Алтухова[1], М.Ю. Рубцова[1], А.М. Егоров[1]
[1]Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Возникновение и развитие устойчивости микроорганизмов к действию антибиотиков является одной из острейших проблем в современном мире. Одним из основных механизмов резистентности микроорганизмов к β-лактамным антибиотикам является их гидролиз ферментами β-лактамазами. К настоящему времени описано более 2000 ферментов, способных гидролизовать β-лактамные антибиотики. Высокая скорость их мутирования, способность к быстрому распространению при передаче генетических элементов, несущих гены устойчивости, представляет собой глобальную угрозу. Сериновые β-лактамазы молекулярного класса А ТЕМ типа, обладающие наиболее широким полиморфизмом, представляют удобную модель для исследования роли мутаций. Известно, что одни мутации («ключевые») приводят к расширению спектра субстратной специфичности, изменению каталитической активности и возникновению устойчивости к ингибиторам, а роль других мутаций («сопутствующих» или «вторичных») остается до конца не изученной. В литературе показано стабилизирующее действие «вторичной» замены M182T на β-лактамазы ТЕМ типа. Анализ сетей внутрибелковых взаимодействий (RINs – Residue Interaction Networks) на основе траекторий молекулярной динамики позволил предложить дополнительное объяснение стабилизирующего влияния вторичной мутации M182T, связанное с изменением конформации R65 и как следствие подвижности Ω-петли – каталитически важного структурного участка β-лактамаз. Для экспериментального подтверждения гипотезы о вкладе стабилизирующей замены M182T были получены мутанты с единичной и двойной заменами (R65L и R65L+M182T), а также проведён насыщающий мутагенез по 182 положению. Проведённые исследования свойств полученных рекомбинантных форм β-лактамаз ТЕМ типа позволяют расширить принятую в настоящее время парадигму стабилизирующей роли "вторичной" мутации M182T. Показана применимость метода RINs для изучения комплексного взаимного влияния единичных и множественных мутаций на структуру и свойства β-лактамаз ТЕМ типа, что имеет фундаментальное и практическое значение для понимания природы полиморфизма и преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотикам. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (Проект № 15-14-00014-П).*

РАЗНООБРАЗИЕ СВЕТОЗАВИСИМЫХ ГЕНЕРАТОРОВ ЭНЕРГИИ У ЭКСТРЕМАЛЬНО АЛКАЛИФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

М.С. Мунтян[1], Л.В. Хитрина[1], А.А. Заспа[1], Д.Ю. Сорокин[2], В.П. Скулачев[1]
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия; [2]Дельфтский технологический университет, Биотехнология, Дельфт, Нидерланды

У нового представителя экстремоалкалифилов, натроноархеи *Natronolimnobius sulfurireducens* AArc1, выделенной из содовых озер Кулундинской степи, **обнаружен родопсиноподобный пурпурный пигмент.** Наличие каротиноидов в клетках AArc1 затрудняет определение пигмента родопсинового типа в клетках при помощи спектрального анализа. Методом **импульсной спектроскопии, который** позволяет выявлять даже следовые количества пигмента незаметные в спектре поглощения, в суспензии клеток AArc1 **обнаружены характерные спектральные изменения** в полосе 570-580 нм (вблизи максимума поглощения родопсиновых белков), что соответствует ожидаемому при наличии фотоцикла. В полосе М-подобных интермедиатов (405-410 нм) был заметен прирост оптической плотности, что убеждает в наличии фотоцикла родопсинового типа у этого микроорганизма. По данным **импульсной спектроскопии родопсиноподобный пигмент** AArc1 относится к пигментам «быстрого типа», которые, как бактериородопсин, обычно являются светозависимыми ионными помпами. При измерении трансмембранной разности потенциалов на сопрягающей мембране клеток AArc1 (после истощения в них субстратов в темноте) обнаружены ответы на включение постоянного света, исчезающие при его выключении. Результаты свидетельствуют о работе светозависимой протонной помпы и указывают на возможную транспортную функцию **родопсиноподобного пигмента** у AArc1. Исследование зависимости показателя pH среды инкубации штамма AArc1 от засветки в присутствии и в отсутствие разобщителя-протонофора СССР показало, что обнаруженный родопсин является светозависимым протонным насосом. Добавка к суспензии 20 мкМ разобщителя-протонофора СССР, рассеивающего градиент протонов на мембранах, приводит к более чем троекратному снижению амплитуды светоиндуцированного закисления среды инкубации. **Анализ нуклеотидной последовательности гена** показал, что родопсиноподобный пигмент AArc1 имеет характерную для бактериородопсинов пространственную организацию. Интересно, что в отличие от известных бактериородопсинов, бактериородопсин AArc1 вместо консенсусного D96 содержит Y96, что, по-видимому, не приводит к утрате функции протонного насоса, тогда

как у другого представителя экстремоалкалифилов, бактерии *Cyclonatronum proteinivorum*, выделенной из этого же ареала, пигмент родопсинового типа оказался натриевым насосом (Sorokin et al., 2018). Исследования поддержаны РФФИ, грант 17-04-02173.

(1) Sorokin, D.Y., Muntyan, M.S., Toshchakov, S.V. et al. (2018). *Front Microbiol* **9**: 2672.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РНК-ШАПЕРОНА ProQ ИЗ *ESCHERICHIA COLI* С МАЛЫМИ РЕГУЛЯТОРНЫМИ РНК

Н.В. Леконцева, А.О. Михайлина, М.С. Фандо, А.Д. Никулин
Институт белка РАН, Пущино, Россия

Недавние исследования показали, что белки, содержащие домен ProQ/FinO, возможно выделить в отдельный класс белков РНК-шаперонов, которые могут играть ключевую роль в посттранскрипционной регуляции генов в бактериях. Механизм взаимодействия малых регуляторных РНК и ProQ недавно исследован для бактерии Salmonella enterica, однако для такого модельного объекта, как Escherichia coli, подобные исследования не проводились. Используя данные о мрРНК из Salmonella enterica, которые взаимодействуют с ProQ, мы провели биоинформатический поиск их гомологов в E. coli. Для дальнейших исследований были выбраны две малые регуляторные РНК: rdlD, длиной 64 нт, и 3'ETS (LeuZ), длиной 67 нт. rdlD принадлежит к системе токсин-антитоксин I типа и ингибирует трансляцию белка-токсина за счет комплементарного взаимодействия с целевой мРНК. 3'ETS (LeuZ) мрРНК представляет собой внешнюю транскрибируемую спейсерную последовательность предшественника лейциновой тРНК. В 2015 году было показано, что данная РНК специфически связывается с мрРНК RyhB и RybB. Мутации в 3'ETS (LeuZ), приводящие к уменьшению комплеменарности к мрРНК, вызывают многократное увеличение активности RyhB и RybB. Эти результаты свидетельствуют о роли 3'ETS (LeuZ) в качестве «молекулярной ловушки» или «губки», захватывающей эти мрРНК и предотвращая их взаимодействие со своими обычными партнерами. Сродство белка ProQ и его изолированных доменов к исследуемым мрРНК сначала определяли методом гель-шифта (EMSA). Результаты показали, что полноразмерный ProQ связывает все выбранные мрРНК, как и N-концевой домен белка. Определение кинетических констант взаимодействия методом поверхностного плазмонного резонанса позволило более точно измерить сродство белка и его доменов к мрРНК. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00073.*

ПОЛУЧЕНИЕ И КОЛЛОИДНЫЕ СВОЙСТВА ИНТЕРПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИАСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Д.В. Салахиева, А.М. Павлюк, М.И. Камалов, М.В. Моисеева, Т.И. Абдуллин
Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Полиаминокислоты являются перспективными полимерными системами для создания биоактивных препаратов, биоматериалов и систем доставки лекарств. Значительный интерес представляют полиаспарагиновая кислота (Пасп) и её производные благодаря биосовместимости и эффективным методам синтеза/модификации [1, 2]. Полимеры получали путём термической поликонденсации аспарагиновой кислоты с последующим щелочным гидролизом полисукцинимида (с образованием анионной Пасп) или в реакции его аминолиза с алифатическим диамином (с образованием катионного полиаспартамида, Паа). По данным динамического рассеяния света, катионный Паа эффективно связывает плазмидную ДНК и конденсирует её в компактные катионные наноразмерные электростатические комплексы (гидродинамический диаметр 77±0.9 нм, ζ-потенциал +17±0.6 мВ). Охарактеризованы условия образования наноразмерных комплексов анионная Пасп/катионный Паа в водных растворах. Их гидродинамический диаметр был менее 100 нм, а дзета-потенциал варьировал в диапазоне от –20 до –32 мВ в зависимости от соотношения компонентов. Это показывает, что связывание Паа с Пасп, в отличие от плазмидной ДНК, не сопровождается эффективной катионизацией комплексов. По данным первичного исследования in vitro, комплексообразование Паа с Пасп модулирует биологические эффекты компонентов; при этом меченные интерполимерные комплексы эффективно проникают в клетки млекопитающих. Полученные результаты представляют интерес для создания систем пролонгированной и избирательной доставки биоактивных веществ в клетки на основе Пасп и её производных. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00766 и в рамках программы повышения конкурентоспособности КФУ.*

1. Камалов, М.И. и др. ПБМ. 2019, Т. 55, № 5. С. 1-9.
2. Salakhieva, D.V. et al. Int. J. Pharm. 2017, V.517, №1-2, P.234-246.

ПОЛИФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАСКАДНЫЙ СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВ

Р.С. Есипов, М.А. Костромина, И.В. Фатеев, Е.С. Тузова, Е.А. Заяц, Т.И. Муравьева, А.И. Мирошников.
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Практическую значимость разработки легкомасштабируемого эффективного полиферментативного каскадного синтеза модифицированных нуклеозидов, являющихся противовирусными, противораковыми, противовоспалительными, антимикробными препаратами, невозможно не оценить. Нами реализованы две технологии «one-pot synthesis» на основе ферментов нуклеинового обмена из термофильных организмов в основе которых лежат классический прямой и реутилизационный пути синтеза нуклеозидов. В обоих случаях на первой стадии с участием рибокиназы из Thermus species 2.9 (TspRK) происходило превращение D-пентоз в 5-фосфаты. Дальнейшие стадии в первом варианте включают синтез 5-фосфо-α-D-пентофуранозо-1-пирофосфаты под действием фосфорибозилпирофосфат-синтетазы из T. thermophilus HB27 (TthPRPPS) и их конденсацию с гетероциклическими пуриновыми основаниям в присутствии фосфорибозилтрансфераз из T. thermophilus HB27 (TthAPRT и

TthHPRT). Во втором варианте при участии фосфопентомутазы из T. thermophilus HB27 (TthPPM) происходил перенос фосфатной группы между атомами углерода в 1-м и 5-м положениях углеводного остова, а пуриннуклезидфосфорилаза T. thermophilus HB27 (TthPNP) катализировала конденсацию с гетероциклическим основанием. Оптимизация разработанных технологий предполагала получение модифицированных ферментов с увеличенной удельной активностью и расширенной специфичностью. Ключевым объектом была выбрана термофильная рибокиназа, обладающая низкой удельной активностью в сравнении с остальными ферментами каскадов. Для выявления ключевых аминокислотных остатков, замена которых могла потенциально привести к изменению каталитической активности, было проведено выравнивание последовательностей рибокиназы RK из T. spicies 2.9 с рядом ортологов с большей ферментативной активностью. Осуществлен сайт-направленный мутагенез по выбранным положениям и исследована удельная активность полученных мутантных форм в отношении основных субстратов. Показано существенное увеличение (5-ти кратное) специфичности созданных мутантных форм в отношении D-рибозы. Использование таких мутантов значительно упростило постановку полиферментативных каскадов. Осуществлен синтез ряда активных модифицированных нуклеотидов (2-хлораденозина, 9-(β-D-ксилофуранозил)-2-хлораденина, 9-(β-D-арабинофуранозил)-2-хлораденина и клофарабина.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КАНАЛОВ T2/T3 ЦЕНТРА ДВУХДОМЕННЫХ ЛАККАЗ

С.В. Тищенко, И.А. Коляденко, А.Г. Габдулхаков
Институт белка РАН, Пущино, Россия

Лакказа (КФ 1.10.3.2) – медьсодержащая оксидоредуктаза, катализирующая окисление широкого спектра фенольных субстратов и некоторых неорганических ионов с восстановлением молекулярного кислорода до воды. Двухдоменные (малые) лакказы (2D) по сравнению с трехдоменными обладают уникальными свойствами: высокой термостабильностью, способностью катализировать окисление фенольных субстратов при щелочных значениях pH, высокой устойчивостью к ингибиторам. Четыре иона меди активного центра лакказ образуют моноядерный T1 центр, вблизи которого происходит окисление первого субстрата, и трехядерный T2/T3 кластер, в котором происходит восстановление молекулы кислорода до воды. Объектом наших исследований является 2D лакказа из актинобактерии Streptomyces griseoflavus Ac-993 (SgfSL). Мутационный анализ аминокислотных остатков, которые находятся в местах сужения предполагаемых каналов лакказы, позволил нам идентифицировать единственный канал, ведущий к T2/T3 центру со стороны одного из T3 ионов меди. «Воротами» этого канала является боковая группа консервативного для 2D лакказ His165, замена которого на гидрофобный фенилаланин приводит к формированию неактивного фермента. Анализ определённой нами кристаллической структуры His165Phe SgfSL показал, что заполнение T2/T3 центра ионами меди повышается при увеличении содержания сульфата меди в культуральной среде при выращивании штамма-суперпродуцента. His165Ala SgfSL обладает большей каталитической активностью, чем фермент дикого типа, причём, при такой замене резко увеличивается устойчивость лакказы к ингибитору азид натрия. Таким образом, по этому каналу, по всей видимости, осуществляется доступ к T2/T3 центру кислорода, ионов меди и ингибитора. Замены консервативного Arg240, находящегося в месте сужения канала, ведущего к T2/T3 центру со стороны T2 иона меди, на аланин привело к уменьшению каталитической активности на порядок. Замена Arg240His не изменила активность фермента. Можно предположить, что боковая цепь аргинина принимает участие в транспорте протонов к функциональному центру, поскольку гистидин также способен быть донором протонов. *Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 18-04-00270) и программы «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии» Президиума РАН.*

БЕЛКИ PTCD2 И ZMYND17 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ АКТИВАТОРЫ В МИТОХОНДРИЯХ ЧЕЛОВЕКА

С.А. Левицкий, М.В. Балева, Д.Г. Красавина, И.В. Чичерин, П.А. Каменский
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В ходе эволюции митохондрии утратили большую часть своего генома, сохранив лишь гены нескольких белков – компонентов электрон-транспортной цепи, а также транспортных и рибосомных РНК, обеспечивающих возможность функционирования аппарата митохондриальной трансляции. Биосинтез белка в митохондриях в целом организован по бактериальному типу, однако имеет ряд существенных отличий. В частности, в митохондриях дрожжей имеется сложная система регуляции трансляции отдельных мРНК, осуществляемая особыми белками – трансляционными активаторами, связывающимися с 5\'-нетранслируемыми областями мРНК и определяющими эффективность инициации трансляции. В митохондриях млекопитающих процессы регуляции трансляции недостаточно изучены, а из специфических трансляционных активаторов для отдельных мРНК выявлен только белок TACO1, участвующий в регуляции биосинтеза компонента цитохром C оксидазы COI. В данной работе мы предположили, что роль трансляционных активаторов в митохондриях человека могут играть еще два белка. Первый из них - PTCD2, является PPR-белком с неизвестной функцией. Второй - ZMYND17, является гомологом дрожжевого трансляционного активатора Mss51p, регулирующего трансляцию белка COX1p. Для проверки данной гипотезы мы получили линии клеток человека с делециями соответствующих генов и оценили в них эффективность митохондриальной трансляции, скорость поглощения клетками кислорода, активность CIV и состав суперкомплексов. Нам удалось продемонстрировать, что делеция в гене PTCD2 действительно ведет к специфичному снижению эффективности биосинтеза компонентов цитохром C оксидазы и снижению эффективности работы митохондрий. Специфичность влияния PTCD2 на митохондриальную трансляцию и его отношение к группе PPR-белков позволяет предположить, что он играет роль трансляционного активатора в митохондриях клеток человека. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-07002*

АТФ СИНТЕТАЗА КАК РЕГУЛЯТОР МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА

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

Протон-зависимая АТФ синтетаза F-типа (FoF1, комплекс V) представляет собой мультисубъединичный фермент, присутствующий в плазматической мембране многих эубактерий, во внутренней мембране митохондрий и в тилакоидной мембране хлоропластов. Он осуществляет взаимопревращение двух основных "энергетических валют" клетки - АТФ и мембранного потенциала. Основной функцией фермента является синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Энергия для этого процесса получается за счет протонного транспорта через мембрану, обусловленного мембранным потенциалом. Если же величина мембранного потенциала снижается, реакция обращается, и фермент функционирует как АТФ-зависимый протонный насос. Существуют несколько механизмов, подавляющих АТФазную активность фермента в условиях низкого мембранного потенциала. В результате фермент инактивируется, и для его ре-активации требуется высокий уровень мембранного потенциала. В ряде случаев было показано, что данный уровень превосходит таковой, достаточный для синтеза АТФ. Возможно, что АТФ синтетаза функционирует как регулятор величины мембранного потенциала. В случае снижения активности первичных генераторов (дыхательной или фотосинтетической цепи переноса электронов) скорость потребления мебранного потенциала становится больше скорости его генерации, потенциал снижается, и происходит инактивация АТФ синтетазы. Это вызывает снижение скорости потребления потенциала и приводит к его росту. И наоборот, увеличение активности первичных генераторов вызывает рост потенциала выше уровня, необходимого для синтеза АТФ. Это приводит к активации дополнительной фракции АТФ синтетаз и снижению потенциала обратно до уровня синтеза АТФ. Предложенный механизм позволяет за счет увеличения или уменьшения фракции активных АТФ синтетаз в мембране варьировать скорость синтеза АТФ, сохраняя постоянным уровень мембранного потенциала.

БЫСТРОЕ И ОБРАТИМОЕ ОБРАЗОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ СКОПЛЕНИЙ В ОТВЕТ НА ГИПЕРОСМОТИЧЕСКИЙ ШОК УКАЗЫВАЕТ НА ДВУХФАЗНУЮ АРХИТЕКТУРУ ЦИТОПЛАЗМЫ

А.И. Александров[1,2], Э.В. Гросфельд[1,3], А.А. Дергалев[1], Р. Чупров-Неточин[4], П.А. Тюрин-Кузьмин[5], И.И. Киреев[2], М.Д. Тер-Аванесян[1], С.В. Леонов[4], М.О. Агафонов[1]
[1]Институт биохимии им. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Кафедра молекулярной и клеточной биологии, Московский физико-технический институт (Государственный университет); [4]Центр живых систем, Московский физико-технический институт (Государственный университет); [5]Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Современные данные указывают на то, что компоненты цитозоля распределены и перемещаются крайне неравномерно, при этом на данный момент неизвестно, за счет чего обеспечивается эта гетерогенность. В то же время, структурирование цитозоля должно играть важнейшую роль в большинстве клеточных процессов. В данной работе удалось пронаблюдать феномен, который, возможно, дает сведения об архитектуре цитоплазмы. Было обнаружено, что во время гиперосмотического шока, химерные шапероны, меченые GFP, образуют множество скоплений (Осмошоковые скопления – ОШС), которые возникают и разбираются за нескольких секунд после возникновения и исчезновения гиперосмотического шока. Во время шока жидкая фаза клетки уменьшается в объёме из-за выхода воды, в то время как компоненты, которые не могут терять воду, должны сближаться. Таким образом, небольшие островки жидкости, зажатые между другими клеточными компонентами, могут выглядеть как скопления. Если предположить, что белки, которые образуют ОШС, неспособны покинуть жидкую фазу цитоплазмы, то такая модель бы хорошо объясняла быстрое возникновение/исчезновение ОШС, а также необычную форму этих скоплений, обнаруженную с помощью микроскопии высокого разрешения. Полногеномный поиск белков, образующих ОШС, с помощью высокопроизводительной микроскопии обнаружил около 20 белков, в том числе шапероны, метаболические ферменты, компоненты P-телец, а также амилоидогенные белки. Так же оказалось, что большинство белков в ОШС – это компоненты крупных белковых комплексов. Было обнаружено, что способность белков образовывать ОШС усиливалась при клеточном стрессе (для шаперонов) и при агрегации (для амилоидогенных белков). Эти обстоятельства показывают возможный механизм ограничения перемещения белков: мономерные белки или комплексы небольшого размера могут проходить в более твердые части цитоплазмы, а более крупные комплексы не могут. Таким образом, наши данные дают указания на то, что цитоплазма клеток дрожжей может быть более структурирована, чем считалось ранее. *Данная работа была поддержана грантом Российского научного фонда #171401092 и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации. Микроскопия высокого разрешения была выполнена при поддержке программы научного развития Московского государственного университета.*

ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ

М.Н. Агафонова, А.П. Любина, М.Н. Чиркова, С.В. Сапожников, Н.В. Штырлин, Ю.Г. Штырлин
Научно-образовательный центр фармацевтики, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия

Четвертичные аммониевые соли (ЧАС) на сегодняшний день являются одним из перспективных классов дезинфицирующих средств, однако их применение ограничивается способностью микроорганизмов вырабатывать устойчивость к данным соединениям. В работе были исследованы модифицированные производные ЧАС как новые потенциальные антибактериальное агенты. В ходе исследования была определена антибактериальная активность соединения в отношении музейных и кли-

нических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий в сравнении с коммерческими антисептиками (хлоргексидин и бензалкония хлорид). Методом серийных разведений была определена минимальная ингибирующая и бактерицидная концентрация исследуемых соединений для каждого тест-штамма микроорганизмов. Также бактерицидная активность соединений была исследована с помощью количественного суспензионного теста и количественного теста на металлической поверхности. На следующем этапе для исследования возможного механизма действия была изучена способность исследуемого соединения изменять электрический потенциал мембраны St. aureus и E. coli, а также проницаемость данного соединения через бактериальную мембрану. Кроме того, было изучено влияние исследуемого соединения на уровне изменения протеомного профиля E. coli CDC F-50 после краткосрочной инкубации с исследуемым веществом. В ходе работы было, показано эффективное бактериостатическое и бактерицидное действие изучаемого соединения по отношению к тест-микроорганизмам, продемонстрировано повреждающее действие данного соединения на мембрану бактерий. Кроме того, выявлены значительные изменения протеомного профиля Escherichia coli в результате краткосрочной инкубации с исследуемым веществом. Полученные данные позволяют говорить о возможности успешного использования данного вещества в качестве антисептического или дезинфицирующего средства. *Работа выполнена при поддержке программы государственного задания № 14.N08.11.0197 Министерства образования и науки Российской Федерации, а также программы конкурентного роста Казанского (Приволжского) федерального университета.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПОХЛОРИТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА XIII МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

Д.Ю. Азарова[1], А.Д. Васильева[1], Л.В. Юрина[1], М.И. Индейкина[1,2], А.Е. Бугрова[1], Т.С. Константинова[1], А.С. Кононихин[1,2,3], Е.Н. Николаев[3], М.А. Розенфельд[1]
[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; [2]Московский физико-технический институт (Государственный университет; [3]Сколковский институт науки и технологий, Москва., Россия

Плазменный коагуляционный фактор XIII (pFXIII) является ключевым белком системы свертывания крови, основная функция которого заключается в ферментативной ковалентной стабилизации полимерной структуры фибрина. Белок обладает гетеротетрамерой структурой, состоящей из двух каталитических FXIII-A2 и двух регуляторных субъединиц FXIII-B2. Впервые, используя метод ВЭЖХ-МС/МС, изучено гипохлорит-индуцированное окисление молекул pFXIII на разных стадиях активации. Показано, что серосодержащие и ароматические аминокислотные остатки являются наиболее уязвимыми к окислительной атаке. Данные масс-спектрометрии свидетельствуют о том, что в исследуемом белке за исключением активационного пептида, окисленные аминокислотные остатки обнаруживаются во всех структурных элементах каталитической субъединицы FXIII-A, в то время как в регуляторной субъединице FXIII-B целый ряд доменов остается в нативной форме. При обработке гипохлоритом активной формы pFXIII были выявлены дополнительные сайты модификаций как в субъединице FXIII-A , так и в FXIII-B . Полученные данные позволили постулировать, что в процессе превращения профермента в активную форму белка (FXIIIa) новые аминокислотные остатки, ранее недоступные окислителю, мигрируют к поверхности белковой глобулы, становясь уязвимыми мишенями для молекул окислителя, в то время как некоторые из исходно поверхностно-экспонированных аминокислотных остатков перемещаются внутрь белка, теряя способность вовлекаться в окислительные модификации. Электрофорез восстановленных образцов ковалентно-сшитого фибрина выявил снижение трансглутаминазной активности окисленного FXIIIa, проявляющееся в ингибировании реакции образования γ-γ-димеров. Обсуждается способность молекулы pFXIII противостоять окислительной атаке за счет ее антиоксидантной структурной адаптации к действию АФК.

ДЕЙСТВИЕ КАРДЕНОЛИДОВ И БУФАДИЕНОЛИДОВ НА РЕЗИСТЕНТНУЮ И ЧУВСТВИТЕЛЬНУЮ К КАРДИОТОНИЧЕСКИМ СТЕРОИДАМ α1- Na,K-АТРАЗУ ИЗ ПОЧЕК: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

А.М. Тверской[1], Е.А. Климанова[1], С.Н. Орлов[1,2,3], О.Д. Лопина[1]
[1]Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск; [3]Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Кардиотонические стероиды (КТС) – специфические ингибиторы Na,K-АТРазы, выделенные из растений (карденолиды) и некоторых видов жаб (буфадиенолиды). Сродство к КТС α1-субъединицы Na,K-АТРазы у грызунов примерно в 100 - 1000 раз меньше, чем у других млекопитающих. В клетках грызунов экспрессируется α1-резистентная (α1R) к действию КТС изоформа Na,K–АТРазы, в то время как в клетках других млекопитающих – α1-чувствительная (α1S) изоформа. Ранее установлено, что добавление уабаина в концентрациях, полностью ингибирующих α1-изоформу Na,K-АТРазы приводит к гибели эндотелиальных и гладкомышечных клеток человека (α1S-Na,K-АТРаза), но не крысы (α1R-Na,K-АТРаза). Ключевую роль в процессе выживания и гибели играют конформационные переходы, которые происходят при связывании КТС с ферментом. Для доказательства существования различий в связывании чувствительной и резистентной α1R- и α1S-Na,K-АТРазы из почек крысы и свиньи соответственно, с тремя КТС: двумя карденолидами (уабаин, дигоксин) и одним буфадиенолидом (маринобуфагенин), мы сравнили значения IC50, а также исследовали обратимость связывания α1-субъединицы в двух основных конформациях Na,K-АТРазы (E1 и E2-P). Уабаин, дигоксин и маринобуфагенин ингибируют α1S-Na,K-АТРазы с близкими значениями IC50 (2, 1,4 и 0,7 мкМ соответственно). IC50 при ингибровании α1R-Na,K-АТРазы для уабаина и дигоксина составили 140 и 270 мкМ. Маринобуфагенин в концентрации до 500 мкМ не оказывал ингибирующего действия на этот фермент. В конформации E2-P маринобуфагенин действует обратимо, в то время как карденолиды необратимо связываются с α1S-Na,K-АТРазы (Ка в ряду 250 -400 мкМ). Это связывание осуществляется в двух центрах, между которыми существует положительное кооперативное взаимодействие (коэффициент Хилла≈2). В конформации E1 уабаин необратимо связывается с α1S-Na,K-АТРазой (Ка в ряду 20-40 мкМ), в то время как дигоксин и маринобуфагенин связываются с этой конформацией обратимо. Все три КТС обратимо связываются с α1R-Na,K-АТРазы как в конформации E2-P, так и в конформации E1. Обсуждается,

каким образом КТС, связываясь с α1S- и α1R-Na,K-АТРазой индуцируют сигнальные каскады, приводящие к смерти клеток, содержащих α1S- и к выживанию клеток, содержащих α1R-Na,K-АТРазу. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-34-00308.*

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ ФИБРИНОГЕНА, ВЫЗВАННЫЕ ИХ ИНДУЦИРОВАННЫМ ОКИСЛЕНИЕМ

Л.В. Юрина[1], А.Д. Васильева[1], Д.Ю. Азарова[1], А.Е. Бугрова[1], Т.С. Константинова[1], М.И. Индейкина[1,2], А.С. Кононихин[1,2,3], Е.Н. Николаев[3], М.А. Розенфельд[1]
[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; [2]Московский физико-технический институт (Государственный университет); [3]Сколковский институт науки и технологийЮ Москва, Россия

Фибриноген проявляет наибольшую чувствительность к окислению по сравнению с другими белками плазмы. Фибриновый гель, образованный из молекул окисленного фибриногена, имеет аномальную структуру, которая характеризуется более тонкими фибрилами, меньшими размерами пор, что затрудняет дальнейший плазминовый гидролиз геля и может вызывать образование тромбов. Методом масс-спектрометрии высокого разрешения были исследованы окислительные модификации полипептидных цепей фибриногена Aα, Bβ и γ, вызванные их индуцированным окислением. Было обнаружено, что аминокислотные остатки, расположенные во всех трех цепях и основных структурных элементах белка, участвуют в окислении. Показано, что αC-коннектор является наиболее уязвимым к окислению по сравнению с другими структурными частями, тогда как область E оказалась наиболее защищенной областью белка. Впервые было установлено, что многочисленные аминокислотные остатки, ответственные за превращение фибриногена в фибрин, остаются незатронутыми при окислении фибриногена. Данные, которые мы получили в этом исследовании, показывают, что ни один из идентифицированных остатков, которые считаются важными для связывания hole «a» и «b» с knob «A» и «B» соответственно, а также ответственные за связывание тромбина с E областью молекулы фибриногена, не подвергались химическим изменениям при окислении. Данные по окислению фибриногена, полученные в настоящем исследовании, позволяют предположить, что некоторые структурные части молекулы, а также ряд легко окисляемых аминокислотных остатков могут быть наделены антиоксидантными свойствами. Представленные здесь новые результаты могут быть важны для выявления адаптивных молекулярных механизмов, способных смягчить пагубное действие активных форм кислорода на функционирование окислительно поврежденного фибриногена. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-04-01313. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского научного фонда, № 14-24-00114. В работе использовалось оборудование ЦКП ИБХФ РАН.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПОХЛОРИТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

А.Д. Васильева[1], Л.В. Юрина[1], Д.Ю. Азарова[1], М.И. Индейкина[1,2], А.Е. Бугрова[1], Т.С. Константинова[1], А.С. Кононихин[1,2,3], Е.Н. Николаев[3], М.А. Розенфельд[1]
[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; [2]Московский физико-технический институт (Государственный университет); [3]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Белки представляют собой высокочувствительные мишени для активных форм кислорода (АФК). Окислительные модификации белков могут вызывать нарушение их структуры и механизма функционирования. Плазминоген, будучи предшественником плазмина, основная функция которого заключается в осуществлении внутрисосудистого тромболизиса, является недостаточно изученным белком плазмы крови в отношении его посттрансляционных окислительных модификаций и, как следствие, структурных нарушений. В работе было исследовано влияние гипохлорит-индуцированного окисления плазминогена на модификацию отдельных сайтов в первичной структуре белка и на ферментативную активность плазмина, образованного из окисленного плазминогена. Используя метод масс-спектрометрии высокого разрешения показано, что малое количество окислителя вовлекало в процесс окисления только домены KR-2, KR-4 и SP, в то время как при более высоком количестве окислителя все структурные области плазминогена были окислены. Наибольшее число сайтов окисления приходится на остатки метионина и ароматические аминокислоты, среди которых триптофаны были наиболее доступными для окислителя. Окислительные повреждения структуры плазминогена проявляются в снижении функциональной активности плазмина, полученного из окисленного плазминогена, что подтверждается как результатами электрофореза продуктов деградации фибриногена, так и определением активности полученного плазмина с использованием хромогенного субстрата. *Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского научного фонда 14–24–00114.*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ, С ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МИШЕНЯМИ СРЕДИ СТЕРОИД-МЕТАБОЛИЗИРУЮЩИХ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА P450

Р.А. Масамрех[1,2], А.С. Латышева[1], М.Г. Завьялова[1], А.В. Кузиков[1,2]
[1]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ; [2]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Первой линией фармакотерапии кастрационно-резистивного рака предстательной железы является применение ингибиторов ключевого фермента биосинтеза андрогенов – цитохрома P450 17A1 (CYP17A1). Препарат абиратерон (17-(3-пиридил)андроста-5,16-диен-3β-ол) является эффективным ингибитором CYP17A1 и «золотым стандартом» в лечении рака предстательной железы. Однако, существенные побочные эффекты абиратерона стимулируют осуществлять поиск новых эффективных и

более безопасных препаратов. Галетерон (17-(1Н-бензимидазол-1-ил)андроста-5,16-диен-3β-ол) находится на стадии клинических испытаний в качестве противоопухолевого препарата для лечения рака предстательной железы. Новое противоопухолевое соединение – 2'-{[(E)-3β-гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол – эффективно ингибирует активность CYP17A1 и подавляет рост клеток линий рака предстательной железы (LNCaP и PC3) и перспективно в качестве кандидата для создания противоопухолевого препарата. Поскольку вышеупомянутые противоопухолевые соединения имеют стероидную структуру, имеется высокая вероятность их взаимодействия со стероид-метаболизирующими изоферментами цитохрома P450. Выявление таких взаимодействий позволяет спрогнозировать возможные побочные действия и оптимизировать применение данной группы препаратов. Нами исследовано взаимодействие абиратерона, галетерона и 2'-{[(E)-3β-гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазола со стероид-метаболизирующими изоферментами цитохрома P450 человека – CYP3A4, CYP19A1, CYP51A1. Все исследуемые соединения взаимодействуют с CYP3A4, что может с высокой вероятностью обуславливать межлекарственные взаимодействия на уровне данного изофермента цитохрома P450. Выявлены субстратные свойства исследуемых соединений по отношению к CYP51A1, что даёт возможность предположить изменение их фармакологического эффекта при взаимодействии с данным изоферментом. Полученные результаты позволяют расширить представление о фармакокинетике и фармакодинамике исследуемых противоопухолевых препаратов и потенциальных противоопухолевых соединений. *Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 18-315-00043 мол_а.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И БИОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МОДУЛЯТОРОВ P53(Y220C) МУТАНТА

Р.М. Саярова[1], Р.Р. Хадиуллина[1], Р.Н. Мингалеева[1], В.В. Часов[1], М. Бауд[3], А.А. Ризванов[1], Э.Р. Булатов[1,2]
[1]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; [3]Университет Саутгемптона, Великобритания

Транскрипционный фактор p53 является онкосупрессорным белком и регулирует экспрессию генов, белковые продукты которых приводят к остановке клеточного цикла и/или апоптозу. Примерно в 50% случаев раковых заболеваний человека инактивация онкосупрессора p53 происходит в результате точечных мутаций. Онкогенная миссенс-мутация Y220C белка p53 снижает термическую стабильность белка примерно на 4 ккал/моль, что является причиной нарушения его третичной структуры и, как следствие, белок становится неактивным при физиологической температуре. Существует перспективная стратегия стабилизации мутантного p53, основанная на специфичном связывании низкомолекулярных стабилизаторов с узкими гидрофобными полостями («карманами»), образующимися в результате мутации в третичной структуре белка. В рамках проекта методом поверхностного резонанса определялась аффинность производных (1Н-пиррол-1-ил)бензойной кислоты и (1Н-пиррол-1-ил)индазола по отношению к рекомбинантным белкам p53 и p53(Y220C). Биофизические исследования показали, что соединения JC16, JC36 и MB539 проявляют существенно более высокую аффинность к p53(Y220C) по сравнению с ранее описанными соединениями. Также методом колориметрического MTS-теста оценивалась цитотоксичность соединений в отношении опухолевых клеточных линий с различным статусом p53 – MCF-7 (wt), MCF-7 (p53–/–), MCF-7 (p53-Y220C/P72R) и Huh7 (p53-Y220C). В результате показано, что клеточные линии с мутантной формой белка p53 являются более чувствительными к обработке производными (1Н-пиррол-1-ил) индазола, чем клеточные линии с p53 дикого типа и с нокаутом по гену TP53. Производные (1Н-пиррол-1-ил)бензойной кислоты не привели к значительному снижению жизнеспособности клеток в тестируемых клеточных линиях. Наблюдаемая повышенная чувствительность мутантных клеточных линии к производным (1Н-пиррол-1-ил) индазола может являться дополнительным подтверждением в пользу p53-зависимого механизма действия соединений. Дальнейшее изучение биологических свойств реактиваторов мутантного p53 имеет высокую актуальность ввиду необходимости создания противоопухолевых лекарственных препаратов на основе данного механизма действия. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00702.

ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОБНЫХ ХОЛЕСТЕРИН ОКСИДАЗ

М.А. Шапиро[1], А.А. Добыш[1], М. Савич[2], Йо. Айдукович[2], С. Йованович-Санта[2], А.В. Янцевич[1]
[1]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; [2]University of Novi Sad Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental protection, Novi Sad, Serbia

У некоторых опасных патогенов, таких как Mycobacterium, Pseudomonas и др. есть одна общая черта - для распространения по организму они должны изменять структуру клеточной мембраны, делая ее более проницаемой. Такой процесс возможен благодаря экспрессии холестерин оксидаз – ФАД-зависимых ферментов семейства оксидоредуктаз, катализирующих окисление холестерина в холестенон [1]. Многие представители данной группы ферментов, хоть и отличаются по аминокислотному составу, однако имеют высокую степень структурного подобия активных центров, что делает возможным создание универсальных ингибиторов активности микробных холестерин оксидаз. *Pseudomonas aeruginosa* является опасным патогеном, особенно у пациентов с нарушенными защитными механизмами хозяина. Это наиболее распространенный патоген, вызывающий внутрибольничные инфекции. Такие инфекции трудно поддаются лечению и могут быть опасными для жизни. Эта проблема осложнена устойчивостью к антибиотикам, которая характерна для этого вида Pseudomonas [2]. В нашем исследовании использованы холестерин оксидазы Pseudomonas и Streptomyces, т.к. они относятся к различным подсемействам оксидаз, а значит с высокой вероятностью будут иметь максимально различные активные центры. Для поиска потенциальных ингибиторов использован масштабный скрининг синтетических стероидов с различными заместителями в A и D кольцах, а также с измененным кольцом C. Мы первыми провели скрининг синтетических стероидных ингибиторов холестерин оксидаз. Такой подход выявил некоторые перспективные ингибиторы, которые могли бы стать основой для разработки лекарственных средств. Зондирование активного центра ферментов ингибиторами позволило сделать важные выводы о структуре активного центра

молекул данных ферментов. Методами гомологичного моделирования и молекулярной динамики установлены предполагаемые участки связывания ингибиторов в активных сайтах ферментов. Объяснены особенности ингибирования отдельными соединениями.

1. Noriyuki Doukyu and Rikizo Aono, Biochem. J. (1999).
2. Marcus Friedrich, Medscape (2018).

ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО КАТАЛИТИЧЕСКИ НЕАКТИВНОГО РНК-ЗАВИСИМОГО БЕЛКА-АРГОНАВТА RzAgo

А.Д. Огиенко[1,2], Д.М. Есюнина[1], А.В. Кузьменко[1], С.С.Рязанский[1], А.В. Кульбачинский[1,2], А.А. Аравин[1,3]
[1]Институт молекулярной генетики РАН, Москва; [2]Кафедра молекулярной биологии, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [3]California Institute of Technology, Pasadena, USA

Белки-Аргонавты являются основными участниками РНК-интерференции у эукариот. Они способны вносить эндонуклеотический разрыв в таргетную РНК, используя в качестве гида комплементарную короткую РНК. Белки-Аргонавты также встречаются и у прокариотических организмов, причем их разнообразие несравненно шире: среди них встречаются как каталитически активные, так и неактивные белки-Аргонавты, гидовыми бывают как РНК, так и ДНК, а в качестве мишеней на данный момент обнаружены только ДНК. Функции и механизмы действия прокариотических белков-Аргонавтов остаются практически неизвестными. Данное исследование посвящено изучению свойств каталитически неактивного белка-Аргонавта RzAgo, найденного в геноме мезофильной грамотрицательной бактерии. При биоинформатическом анализе в последовательности белка было обнаружено 2 дополнительных домена, гипотетически имеющих АТФазную активность. Для анализа характеристик белка in vitro был разработан протокол экспрессии и очистки белка. Были проведены эксперименты по связыванию различных субстратов in vitro, а также по выявлению способности белка к гидролизу АТФ. Чтобы охарактеризовать работу белка in vivo, были получены препараты коротких нуклеиновых кислот, ассоциированных с белком в гетерологической системе экспрессии E. coli. Было показано, что данный белок использует в качестве гидовых молекул короткие РНК, содержащие на 5'-конце фосфатную группу. Для более детального анализа были подготовлены библиотеки этих нуклеиновых кислот для высокопроизводительного секвенирования. Чтобы проверить возможное влияние RzAgo на транскрипцию в гетерологической системе, были также получены библиотеки тотальной РНК из культур клеток, экспрессирующих и не экспрессирующих данный белок, и проведен анализ дифференциальной экспрессии генов. Полученные результаты показывают, что наличие белка RzAgo влияет на экспрессию некоторых генов, и позволяют предположить, что механизм его функционирования значительно отличается от других известных белков-Аргонавтов. *Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации 14.W03.31.0007.*

ПЕПТИД RL2 – СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ В КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

О.А. Чинак[1], Е.А. Голубицкая[1], А.В. Шернюков[2], Е.С. Журавлёв[1], Г.А. Степанов[1], Е.В. Кулигина[1], О.А. Коваль[1], В.А. Рихтер[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский институт органической химии СО РАН, Новосибирск, Россия

Понимание механизма проникновения биологически активных соединений в клетки является ключевым моментом при разработке противоопухолевых препаратов и преодолении множественной лекарственной устойчивости. Лактаптин - фрагмент к-казеина молока человека, способный индуцировать апоптоз раковых клеток. Его рекомбинантный аналог RL2 эффективно проникает в цитоплазму как раковых клеток MCF-7 и MDA-MB-231, так и немалигнизированных клеток MSC, индуцируя апоптотическую гибель раковых клеток, но не снижает жизнеспособность нормальных. Однако механизм проникновения RL2 в клетки оставался невыясненным. Методом проточной цитометрии показано, что RL2 проникает в раковые клетки частично по пути рафт-зависимого пиноцитоза (преимущественно кавеолин-зависимого) и частично – прямым проникновением через плазматическую мембрану. Механизм прямого прониковения через мембрану клетки описан для пептидов класса CPP (Cell-penetrating Peptides), известных также своей способностью доставлять в клетки связанные с ними молекулы. Данные, полученные нами при изучении структуры RL2 и механизма его проникновения в клетки, позволяют отнести этот пептид к классу CPP. Исследование структуры RL2 методами КД и ЯМР спектроскопии показало, что в водной среде RL2 является неупорядоченным пептидом с частично упорядоченным N-концом. Установлено, что в 50% гидрофобном трифторэтаноле фрагмент RL2 с 31 по 40 а.о. α-спирализуется. Такое частичное структурирование при взаимодействии с клеточными мембранами описано для неупорядоченных CPP, что, как предполагают, позволяет им проникать через липидные мембраны клеток. RL2, подобно некоторым CPP, образует нековалентные комплексы с различными нуклеиновыми кислотами (плазмида, несущая ген EGFP, цитотоксическая мяРНК U25 и миРНК, направленные на кодирующую область гена EGFP) и обеспечивает их доставку в клетки человека in vitro. Кроме того, RL2 способен доставлять в клетки ковалентно присоединённые парамагнитные радикальные метки. Таким образом, показано, что противоопухолевый пептид RL2 является потенциальным инструментом для доставки в клетки терапевтических и диагностических молекул. *Работа выполнена при финансовой поддержке ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг (0309-2018-0003, Синтетическая биология...).*

ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ НУКЛЕОИД-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*

А.И. Зубов[1], О.В. Побегуц[1], Д.В. Евсютина[1,2], В.Г. Ладыгина[1], О.Н. Букато[1], Г.Ю. Фисунов[1], Т.А. Семашко[1]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Mycoplasma gallisepticum (MG) принадлежит к классу Молликут и является патогеном, вызывающим респираторные заболевания у птиц. Для нее характерны отсутствие клеточной стенки и очень маленький размер генома, а размеры нуклеоида микоплазм сравнимы с размером самой клетки. Как следствие редукции генома, разнообразие нуклеоид-ассоциированных белков (НАБ) и транскрипционных факторов у MG сильно ограничено. Изучение динамики изменения протеомного профиля нуклеоида в различных клеточных состояниях поможет понять механизмы функционирования, регуляции хромосомной организации и адаптации этого патогена в условиях стресса. Нами впервые выделен нуклеоид из клеток MG в логарифмической фазе роста с синхронизацией культуры (ЛФ) и стационарной фазе роста (СТ) с помощью мягкого лизиса клеток детергентом NP-40, стабилизации нуклеоида сперимидином и фракционирования лизата центрифугированием в 20-60% сахарозном градиенте. Методом дифференциального 2Д электрофореза показано обогащение НАБ относительно общего протеома клеток MG. Методом ВЭЖХ-МС анализа (Bruker MaXis II) проведено протеомное профилирование полученных образцов. Критерием отбора НАБ служила перепредставленность белков выделеннного нуклеоида относительно клеточного лизата. В результате обнаружено 79 НАБ, из которых 12 являются известными ранее из литературных источников. Среди них два гистоноподобных белка (Hup_1, Hup_2) и ДНК-связывающий ферритин-подобный белок (Dps), являются наиболее распространенными ДНК-связывающими белками в прокариотических организмах. Кроме того, найдено 11 белков с неизвестной функцией. Из общего пула найденных белков 56 определены, как общие для двух фаз клеточного роста. Помимо этого, обнаружен ряд уникальных белков для каждой из этих фаз. В СТ-фазе роста определено меньшее количество уникальных белков - 8, по сравнению с логарифмической фазой - 22 белка, что может свидетельствовать о начале компактизации нуклеоида и консервации процесса деления. В свою очередь активность в ЛФ-фазе подтверждается большим разнообразием белков, в том числе и ответственных за клеточное деление, репарацию, транскрипцию и трансляцию, а также ряд белков с неизвестной функцией, представляющих большой интерес для дальнейших исследований. *Данная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-29-08043*.

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МИНОРНЫХ КОМПОНЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА: КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ

Ф.Н. Гильмиярова[1], Н.А. Колотьева[1], В.И. Кузьмичева[1], О.А. Гусякова[1], Е.А. Рыскина[2]
[1]Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, Самара; [2]Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Молекулы малой молекулярной массы сегодня выходят на передний план, становясь актуальным предметом фундаментальных исследований. В то время как науке стало многое известно об особенностях взаимодействия белков друг с другом, недостаточно изученным остается вопрос о регулировании этих процессов на уровне более тонких структур, а именно о том, какой вклад в межбелковые взаимодействия вносят минорные компоненты метаболизма, постоянные спутники и участники разнообразных внутри- и внеклеточных превращений, составляющие микроокружение крупных молекул. Цель нашего исследования – изучение биологической активности минорных компонентов метаболизма с применением методов in silico и in vitro. В качестве объекта изучения нами были выбраны такие интермедиаты как лактат и пируват. Предсказаны биологические эффекты данных молекул с использованием прикладной программы для компьютерного моделирования PASS. Изучение смоделированных эффектов проводилось in vitro с применением экспериментальной системы белок-лиганд, основанной на изменении степени взаимодействия антигенов А и В групп крови по системе АВО с анти-А и анти-В естественными и моноклональными антителами при добавлении в систему метаболитов малой молекулярной массы. Осуществлялась постановка реакции гемагглютинации с индикацией степени агглютинации балльно по W. Marsh. Статистический анализ данных проводили в среде прикладных программ SPSS 12.0 и MS EXCEL 2010. Полученные методом компьютерного прогнозирования результаты показывают вероятность влияния пирувата и лактата на межмолекулярные процессы поддержания метаболического баланса путем регуляции белкового, углеводного, липидного обменов, антиоксидантных процессов, тканевого дыхания. Серия проведенных экспериментов отчетливо показала более активное влияние лактата на белок-лигандные взаимодействия антигена с антителом, в отличие от пирувата, что, вероятно, является результатом суммарных модификаций, вызванных этим метаболитом и регистрируемых по скорости и полноте процесса агглютинации. Представленные данные свидетельствуют о многообразии функций, выполняемых лактатом и пируватом – малыми молекулами, которые выводят нас за рамки привычного восприятия этих интермедиатов лишь как участников биохимических превращений и служат фундаментом для дальнейших исследований.

РОЛЬ КОНСЕРВАТИВНОГО БЕЛКА CNDP2 У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Е.Н. Андреева, А.А. Огиенко, Г.А. Павлова, А.В. Пиндюрин
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

Изменение экспрессии гена CNDP2 часто сопровождает формирование злокачественных образований в организме человека. Однако неясно, как продукт этого гена, относящийся к семейству металлопептидаз M20, участвует в росте и пролиферации клеток. Кроме того, наши знания о функциях ортологов CNDP2 у модельных организмов недостаточны или отсутствуют. Цель работы заключалась в характеристике функций ортолога гена CNDP2 у *D. melanogaster*, кодируемого геном CG17337 (далее dCNDP2), и его белкового продукта. Для этого мы недавно создали набор генетических и молекулярных инструментов; в частности, методом направленного мутагенеза при помощи технологии CRISPR/Cas9 была впервые получена полная делеция (нуль-мутация) гена dCNDP2 (Andreyeva et al., 2019). В настоящей работе мы обнаружили, что нарушение экспрессии гена

dCNDP2 не вызывает образование опухолей у дрозофилы. Однако, на фоне РНК-интерференции этого гена в 2 раза увеличивается доля митотически делящихся культивируемых клеток S2 по сравнению с контролем. В личиночных нервных ганглиях при отсутствии или избытке белка dCNDP2 также наблюдается 2-кратное увеличение митотического индекса. По литературным данным белок dCNDP2 прямо взаимодействует с актин-связывающими и регулирующими полимеризацию актина белками Fimbrin, Capulet, Flare и Moesin. Известно, что последний регулирует сборку веретена деления и его функционирование в ходе митоза. Мы обнаружили, что нарушение экспрессии гена dCNDP2 влияет на формирование актиновых структур в клетках дрозофилы и предполагаем, что роль белка CNDP2 в формировании цитоскелета может быть одной из причин выявленных изменений митотического клеточного цикла. В целом, полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что белок dCNDP2 дрозофилы, являющийся компонентом хроматина и цитоплазмы (Andreyeva et al., 2019), также необходим для правильного прохождения митоза. *Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований № 0310-2019-0005.*

1. Andreyeva EN, Ogienko AA, Dubatolova TD, Oshchepkova AL, Kozhevnikova EN, Ivankin AV, Pavlova GA, Kopyl SA, Pindyurin AV. A toolset to study functions of Cytosolic non-specific dipeptidase 2 (CNDP2) using Drosophila as a model organism. (doi: 10.1186/s12863-019-0726-z) BMC Genetics 20(Suppl 1): 31, 2019.

ДИСУЛЬФИДНАЯ ДИМЕРИЗАЦИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА НЕЙРОНАЛЬНЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ СЕНСОРОВ: Ca^{2+}/Zn^{2+}-ЗАВИСИМЫЙ ОТВЕТ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

В.Е. Бакшеева[1], Н.Н. Готманова[1], А.О. Залевский[2,3,4], А.А. Назипова[5], В.И. Владимиров[3], О.С. Ганчарова[1], А.Ю. Роман[6], Д.В. Зинченко[3], А.А. Замятнин мл.[1,4], Ф.О. Цветков[7], С.Е. Пермяков[5], Е.Ю. Зерний[1,4]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и [2]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [4]Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва; [5]Институт биологического приборостроения РАН, Пущино; [6]Институт физиологически активных соединений РАН, Черноголовка, Россия; [7]Институт нейрофизиопатологии, Фармацевтический факультет, Университет Марселя, Франция

Нейрональные кальциевые сенсоры (НКС) – белки ЦНС и сетчатки, которые опосредуют Ca^{2+}-зависимые сигнальные механизмы, регулирующие рост, выживаемость и функционирование нейронов. В работе впервые показано, что НКС являются редокс-чувствительными белками, и их структура и активность подвержены существенным изменениям в результате окисления. В условиях *in vitro* большинство НКС способны образовывать дисульфидные димеры в присутствии физиологических концентраций окислителя. При этом их склонность к димеризации варьируется в зависимости от наличия физиологических катионов, таких как кальций и магний. Показано также, что НКС способны связывать ионы цинка, что усиливает их восприимчивость к окислению. Дисульфидная димеризация НКС является структурно детерминированным процессом, поскольку зависит от поверхностной доступности редокс-чувствительных остатков цистеина. С помощью макромолекулярного моделирования и сайт-направленного мутагенеза продемонстрировано, что димеры разных НКС стабилизируются дисульфидными связями с участием разных остатков цистеина, и отличаются структурой, строением межмолекулярного интерфейса и энергией нековалентного взаимодействия субъединиц. Димеризация оказывает влияние на стабильность и функциональные свойства НКС, включая способность связываться с клеточными мембранами и узнавать белки-мишени, такие как каркасный белок кавеолин-1 или протеинкиназы рецепторов, сопряженных с G-белками. С использованием клеточных и животных моделей окислительного стресса продемонстрировано, что димеризация НКС происходит и в физиологических условиях. Высказано предположение, что увеличение концентрации цинка, характерное для развитого окислительного стресса, вызывает дисульфидную димеризацию НКС и, как следствие, аберрантное функционирование и агрегацию этих белков, что может индуцировать апоптоз нейронов и приводить к нейродегенерации. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18-04-01250).*

АДИПОКИНЫ И БЕЛКИ ОБМЕНА ЖЕЛЕЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ С ОЖИРЕНИЕМ

Е.Л. Макарова[2], Н.А.Терехина[1]
[1]Пермский государственный медицинский университет им. Е.А. Вагнера МЗ РФ; [2]Городская клиническая больница им. М.А. Тверье, Пермь, Россия

Обследовано 228 женщин репродуктивного возраста, из них 88 беременных женщин с нарушением жирового обмена. У беременных с андроидным типом ожирения выявлены изменения показателей адипокинов: повышение лептина и снижение адипонектина. В группе женщин с ожирением выявлен дисбаланс белков обмена железа: трансферрин достоверно снижен. У беременных с андроидным типом ожирения ферритин повышен, что способствует формированию инсулинорезистентности и развитию гестационного сахарного диабета. Ключевые слова: беременность, адипокины, белки обмена железа, ожирение. В России у каждой третьей женщины репродуктивного возраста выявляется ожирение или избыточная масса тела, что серьезно осложняет течение беременности и родов [1]. Жировая ткань рассматривается как эндокринный орган. Установлено влияние ожирения при беременности на содержание витамина D3, статус адипокинов [2,3]. С увеличением количества жировой ткани в организме увеличивается дисбаланс адипокинов. Выявлена взаимосвязь между развитием инсулинорезистентности в адипоцитах и гиперферритинемией [4]. Цель работы: оценить содержание адипокинов и белков обмена железа в сыворотке крови беременных с ожирением. Исследование осуществлялось на базе клиники ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский Университет им. ак. Е.А.Вагнера» МЗ РФ. Всего обследовано 226 женщин репродуктивного возраста. Под наблюдением находилось 88 беременных с нарушением жирового обмена, установленному по индексу массы тела (ИМТ более 25 кг/м^2) в сроке беременности 9-11 недель (медиана 10 недель), которые составили основную группу. В группу сравнения вошли 120 здоровых беременных женщин в первом триместре с нормальной массой тела. Всем пациенткам в основной группе проводился

расчет коэффициента К – отношение окружности талии к окружности бедер в сантиметрах. Содержание адипонектина, лептина и трасферрина в сыворотке крови определяли методом ELISA на анализаторе иммуноферментных реакций АИФР-01 «Униплан». Уровень сывороточного ферритина определяли на автоматическом ИФА-анализаторе Alisei Q. S. (SEAC, Италия) методом твердофазного иммуноферментного анализа. Критериями исключения были уровень гемоглобина менее 110 г/л и наличие у пациентки клинической формы железодефицитной анемии. Содержание лептина в сыворотке крови беременных с ожирением в 4 раза выше (60,5±0,44 нг/мл), чем у беременных с нормальной массой тела (15,6±0,23 нг/мл). В сыворотке крови беременных с ожирением по андроидному типу содержание лептина было выше, чем в остальных группах (71,5±0,28 нг/мл). При этом содержание адипонектина с увеличением количества жировой ткани снижалось. Самое низкое содержание адипонектина выявлено у беременных с андроидным типом ожирения (6,17±0,09 нг/мл). Содержание трансферрина в сыворотке крови беременных с ожирением достоверно было ниже (291±35,1 мг/дл), чем в группе сравнения (385,5±22,0 мг/дл). В сыворотке крови беременных с андроидным типом ожирения выявлено двукратное повышение ферритина (53,48±0,66 нг/мл), относительно группы женщин с гиноидным типом ожирения. Влияние железа на инсулинорезистентность включает в себя изменение эндокринной функции жировой ткани и секреции адипокинов. В сыворотке крови беременных с ожирением уровень ферритина коррелировал содержанием лептина и находился в обратной корреляционной зависимости с содержанием адипонектина. Все это свидетельствует о потере защитных антиатерогенных свойств адипонектина, а низкий его уровень предшествует инсулинорезистентности. К III триместру беременности у пациенток только из группы андроидного ожирения в 14,8% случаях развился гестационный сахарный диабет. Таким образом, у беременных с андроидным типом ожирения выявлены значимые изменения показателей адипокинов: повышение лептина и снижение адипонектина. В группе женщин с ожирением выявлен дисбаланс белков обмена железа: в сыворотке крови снижено содержание трансферрина, а у беременных с андроидным типом ожирения повышено содержание ферритина, что способствует формированию инсулинорезистентности и развитию гестационного сахарного диабета.

1. Голикова Т.П., Дурандин Ю.М. Осложнения беременности и родов у женщин с ожирением //Вестник Российской Ассоциации акушеров-гинекологов. 2009.Т.2.С.12-14.
2. Макарова Е.Л., Терехина Н.А., Падруль М.М. Статус адипокинов в сыворотке крови беременных с ожирением // Клиническая лабораторная диагностика.2015.№9.Т.60.С.61-62.
3. Макарова Е.Л., Терехина Н.А., Падруль М.М. Влияние ожирения на содержание витамина D в сыворотке крови беременных // Медицинский алфавит.2017.Т.2.№21.С.37-39.
4. Green, A. Transferrin and iron induce insulin resistance of glucose transport in adipocytes/ Green A, Basile R, Rumberger JM. // Metabolism. 2006.55:1042–1045

ТОКСИЧНОСТЬ, ВЫЗВАННАЯ ИЗБЫТКОМ РЕГУЛЯТОРА ТРАНСКРИПЦИИ SFP1, ЗАВИСИТ ОТ ЕГО ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ И СПОСОБНОСТИ К АГРЕГАЦИИ

А.Г. Матвеенко[1], Н.А. Зайцева[1], В.Е. Рыжкова[1], Г.А. Журавлева[1,2]
[1]Кафедра генетики и биотехнологии и [2]Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Дрожжи являются удобным модельным организмом для изучения механизмов превращения белка в амилоидную или прионную форму. Наиболее изученный дрожжевой прион [PSI+] является наследуемым амилоидом, который формирует фактор терминации трансляции eRF3 (Sup35). Известно, что прион [PSI+] может быть токсичен для клетки. Одним из факторов, влияющих на токсичность [PSI+], является Sfp1, глобальный регулятор транскрипции. Ранее мы показали, что избыток Sfp1 в клетке усиливает прионную токсичность. Исследования токсичности, вызванной Sfp1, показали, что он способен образовывать детергент-устойчивые агрегаты in vivo. Агрегация Sfp1 ответственна за развитие прион-зависимой летальности в штаммах [PSI+], а дополнительная продукция шаперона Hsp40-Sis1 компенсирует летальность. Кроме того, агрегаты Sfp1 частично колокализуются с Sup35 и Sis1 в клетках [PSI+], но не колокализуются с NLS-Sis1, локализованным в ядре, что говорит о локализации агрегатов в цитозоли. Более того, Sfp1 образует агрегаты только когда соответствующий ген регулируется индуцируемым медью промотором CUP1. Сверхэкспрессия с помощью индуцируемого галактозой промотора GAL1 не приводила к образованию агрегатов, тогда как сильная конститутивная сверхэкспрессия под контролем промотора GPD (TDH3) приводила к обнаружению флуоресцентных фокусов лишь в небольшом количестве клеток. Тем не менее, токсичность в этом случае также немного снижалась в присутствии дополнительного Sis1. Мы провели делеционный анализ гена SFP1, который показал, что области, необходимые для агрегации Sfp1, отличаются от областей, необходимых для токсичности, вызванной сверхэкспрессией SFP1. Так делеция С-концевых доменов цинковых пальцев, которые обеспечивают функциональность Sfp1 как транскрипционного фактора, приводила к ослаблению токсичности, но не влияла на агрегацию Sfp1. Делеция N-концевого фрагмента приводила к потере способности белка формировать агрегаты, что также сопровождалось снижением эффекта токсичности. Таким образом, для возникновения токсичности при сверхэкспрессии SFP1 необходима агрегация функционального белка Sfp1. *Работа поддержана РЦ «РМиКТ» НП СПбГУ и грантом РФФИ 18-34-00536.*

РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ МОГУТ КОДИРОВАТЬ В СОСТАВЕ СВОИХ ПОЛИПРОТЕИНОВ БЕЛКОВЫЕ ДОМЕНЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В АНТИВИРУСНУЮ ЗАЩИТУ

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

Геномы транспозонов, включая ретротранспозоны, весьма пластичны. Так, хотя большинство автономных ретротранспозонов и ретровирусов кодируют, помимо обратной транскриптазы (RT), дополнительные незаменимые ферментативные белки, включая РНКазу H, протеазу и интегразу, несколько видов вспомогательных доменов, наличие которых в полипротеинах ре-

тротранспозонов не является обязательным, также было выявлено. Давно известно, что ДНК бактериальных мобильных генетических элементов, может включать в себя целый ряд несущественных генов, обеспечивающих адаптацию хозяйской клетки к конкретным негативным воздействиям. Эти вспомогательные гены могут придавать бактерии устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам, ароматическим соединениям и бактериофагам. Многие из свободно живущих микроскопических и макроскопических эукариот сталкиваются с аналогичными проблемами в своей среде обитания. Поэтому логичен вопрос, могут ли эукариотические геномы содержать транспозоны с похожими несущественными генами, придающими хозяину протективные детерминанты. Ранее мы представили доказательства интеграции генов вирусных РНК-хеликаз (SF1H) в геномы насекомых путем захвата вирусных генов ретротранспозонами. Мы предложили возможные гипотетические эволюционные сценарии, предполагающие, что интегрированные в эукариотический геном последовательности, продуцирующие вирусные транскрипты и белки РНК-содержащих вирусов, могут быть инструментом противовирусной защиты растений, грибов и животных. Наши новые данные выявили в полипротеинах ретротранспозонов новые вспомогательные белковые домены, участвующие в ковалентной и нековалентной модификации нуклеиновых кислот. В частности, мы предполагаем, что некоторые ДНК-метилазы, экспрессирующиеся в качестве вспомогательных белковых доменов в составе полипротеинов ретротранспозонов, могут быть вовлечены в защиту от ДНК-содержащих вирусов в микроскопических эукариотах, заражаемых фаго-подобными вирусами. Будет представлена гипотеза эволюционного происхождения и функциональной роли ретротранспозон-кодируемых белковых доменов, модифицирующих нуклеиновые кислоты, в ряду потенциальных молекулярных инструментов защиты клеток от вирусов.

MULTIPLE FUNCTIONS OF THE NSL COMPLEX SUBUNITS IN *DROSOPHILA MITOSIS*

Gera A. Pavlova[1], Julia V. Popova[1,2], Evgeniya N. Andreyeva[1], Lyubov A. Yarinich[1,3], Mikhail O. Lebedev[1,3], Alena V. Razuvaeva[1,3], Tatiana D. Dubatolova[1], Anastasiya L. Oshchepkova[1,4], Claudia Pellacani[5], Maria Patrizia Somma[5], Alexey V. Pindyurin[1,3], Maurizio Gatti[1,5]

[1]Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk; [2]Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk; [3]Novosibirsk State University, Novosibirsk; [4]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk, Russia; [5]IBPM CNR c/o Department of Biology and Biotechnology, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

Components of the Drosophila nonspecific lethal (NSL) complex, known to be as a major transcriptional regulator controlling expression of housekeeping genes. Previous studies demonstrated that several components of the NSL complex play roles at mitotic centrosomes. Dgt1 is necessary for γ-tubulin recruitment, Rcd1 for centriole duplication, and Rcd5 for both centriole duplication and PCM recruitment at the centrosomes. However the mechanisms through which these proteins regulate centriole duplication and centrosome maturation are currently unknown. Here we analyzed the mitotic functions of Rcd1, Rcd5, MBD-R2 and Wds in Drosophila S2 cultured cells by performing RNAi against corresponding genes, followed by phenotypic analysis of mitosis. Rcd1, Rcd5, MBD-R2 and Wds depletion resulted in defects in chromosome alignment and segregation. Similar defects have been previously observed in S2 cells depleted of Cid/Cenp-A or the kinetochore components Ndc80, Nuf2 and Kmn1. Consistent with these observations, WB analysis showed in Rcd1, Rcd5 and MBD-R2 RNAi cells the levels of both Cid and Ndc80 are substantially reduced compared to controls. We then used S2 cell lines that stably express Rcd1-eGFP, Rcd5-eGFP, MBD-R2-eGFP or Wds-eGFP fusion proteins to define localization of these proteins during the cell cycle. In vivo observations showed that during interphase eGFP-tagged proteins localize to the nucleus. However, during mitosis each protein re-localizes to a specific set of mitotic structures, including the centrosomes, the kinetochores and different regions of the midbody. Taken together, our results strongly suggest that the 4 components of the NSL complex work together in interphase to regulate transcription of housekeeping genes including those encoding key mitotic components. However, the differences in the subcellular localizations of the NSL components in mitosis suggest that they might have acquired some as yet undefined secondary “moonlighting” functions that directly contribute to the mitotic process. This work was supported in part by a RSFgrant (16-14-10288) for generation of cell lines expressing GFP-tagged proteins and ChIP data analysis and by the Fundamental Scientific Research Program of the SB of RAS (project 0310-2019-0005) for RT-qPCR experiments.

НОНСЕНС-МУТАЦИИ В ПРИОНОГЕННОМ ДОМЕНЕ ГЕНА SUP35 ДРОЖЖЕЙ ИНДУЦИРУЮТ ПРИОННОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ БЕЛКА SUP35

В.Н. Ураков, А.А. Дергалев, В.В. Кушниров

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

Спорадические формы прионных болезней можно рассматривать как результат нарушения фолдинга соответствующих прионогенных белков. Эти нарушения, которые традиционно рассматривают как случайные, также могут быть следствием редких и трудных для отслеживания событий — в частности, определенных мутаций в генах этих белков, возникающих в отдельных соматических клетках. В настоящей работе мы смоделировали ранние стадии описанного выше процесса, используя прионогенный белок Sup35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Известно, что возникновение прионного состояния белков требует сверхпродукции этих белков. Нас же интересовали мутантные варианты белка Sup35, индуцирующие прионогенез при нормальном уровне экспрессии. При помощи ПЦР мы мутагенизировали прионогенный N домен гена SUP35 и отобрали две мутантные аллели SUP35, которые, находясь в составе низкокопийной плазмиды, вызывали существенное увеличение частоты возникновения приона [PSI+] de novo в штамме [PIN+]. В обеих мутантных аллелях присутствовали нонсенс-мутации, приводящие к синтезу укороченных фрагментов Sup35 длиной 98 и 108 а.к., соответственно. Затем нами был дополнительно получен набор из 12 аллелей, кодирующих N-концевые фрагменты Sup35 длиной от 19 до 240 а.к. Оказалось, что фрагменты длиной от 75 до 122 а.к. приводили к значительному усилению прионогенеза, в то время как фрагменты длиной 73 а.к. и менее, а также фрагмент длиной 240 а.к. и полноразмерный белок Sup35 прионогенез не вызывали. Данный процесс зависел от присутствия приона [PIN+]. Полученные результаты согласуются с тем, что протеазоустойчивое ядро прионных полимеров Sup35,

необходимое и достаточное для поддержания множества вариантов приона [PSI+], составляет 72 а.к. (неопубликованные данные). Важно также отметить, что отобранные в работе варианты [PSI+] оказались способны поддерживаться в клетках после потери мутантной аллели SUP35. Таким образом, наличие нонсенс-мутаций в определенных участках гена SUP35 может индуцировать прионогенез белка Sup35. На основании полученных данных была высказана гипотеза о возможном механизме возникновения спорадических форм прионных заболеваний. *Работа была поддержана грантом РНФ № 17-14-01092 и Министерством науки и высшего образования РФ, а также грантом РФФИ № 17-04-00032.*

АНАЛИЗ НЕЙРОМЫШЕЧНЫХ КОНТАКТОВ ЛИЧИНОК *DROSOPHILA MELANOGASTER* С ДИСФУНКЦИЕЙ ГЕНА SWISS CHEESE

Э.Г. Шарапенков, П.А. Мелентьев, Е.В. Рябова, Е.М. Латыпова, С.В. Саранцева
Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

Ген swiss cheese (sws) является эволюционно-консервативным и участвует в контроле поддержания жизнедеятельности клеток нервной системы [1]. Нарушение экспрессии ортолога sws - гена NTE человека - вызывает развитие различных нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся синдромами спастичности и атаксии [2]. Нарушение экспресии sws или его ортологов ведёт к моторным нейропатиям и нарушению двигательной активности. Важной морфофункциональной единицей двигательной системы является нейромышечное окончание. Ранее нами было показано, что у гомозиготных по аллели sws1 личинок дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) третьего возраста увеличивалось число сателлитных бутонов в нейромышечных окончаниях; при этом количество активных зон, содержащих активные синапсы, напротив, уменьшалось. У мутантных по гену sws личинок в пресинаптических окончаниях было обнаружено увеличение числа петель микротрубочек, связанных с белком FUTSCH. Вместе с тем, в нейромышечных окончаниях заметно уменьшалось количество митохондрий [3]. С помощью транскриптомного анализа было выявлено несколько генов, экспрессия которых изменяется при дисфункции sws. Среди генов, отвечающих на подавление экспрессии sws в нейронах увеличением экспрессии более чем в 10 раз, идентифицированы CG15263, Dup99B, CG8628. Для установления роли этих генов в нейропатологии, вызванной дисфункцией SWS, были исследованы нейромышечные окончания личинок третьего возраста с дисфункцией sws при одновременном нарушении функции одного из указанных генов, которая достигалась либо наличием мутации в гене (CG15263MB03647), либо подавлением его экспрессии в нейронах с помощью запуска тканеспецифичной интерференции РНК (UAS-RNAi-CG8628, UAS-RNAi-DUP99B).

1. Kretzschmar D. et al. The swiss cheese mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in Drosophila. Journal of Neuroscience. – 1997. – Т. 17. – №. 19. – С. 7425-7432
2. Kmoch S. et al. Mutations in PNPLA6 are linked to photoreceptor degeneration and various forms of childhood blindness. Nature communications. – 2015. – Т. 6. – С. 5614.
3. Ryabova E. et al. Swiss Cheese, Drosophila Ortholog of Hereditary Spastic Paraplegia Gene NTE, Maintains Neuromuscular Junction Development and Microtubule Network. – InTech, 2018.

НОКАУТ ГЕНОВ IRF7 И IFITM3 ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Н.В. Ещенко[1], Е.В. Можаева[1], М.В. Сергеева[1,2], А.Д. Васильева[1,2], К.А. Васильев[2], С.П. Медведев[1,3], А.А. Малахова[1,3], Е.С. Журавлев[1], Д.В. Семенов[1], А.Б. Комиссаров[1,2], Г.А. Степанов[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [2]НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург;[3]ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

Целью настоящей работы является создание клеточной линии с повышенной пермиссивностью к вирусу гриппа А. Для этого была использована стратегия направленного нокаута генов системы регуляции противовирусного ответа с применением технологии CRISPR/Cas9 геномного редактирования на основе эмбриональных фибробластов почки человека 293FT. В качестве генов-мишеней были выбраны IRF7 и IFITM3, продукты которых участвуют в регуляции накопления и репликации вируса гриппа А. Данные ОТ-ПЦР и транскриптомного анализа (Illumina RNA-Seq) показали низкий базовый уровень мРНК этих генов в клетках 293FT, однако в условиях активации врожденного имунного ответа уровень экспрессии IRF7 и IFITM3 повышается в несколько раз. Для нокаута были сконструированы протоспейсеры, позволяющие вносить не только единичные разрывы, но и обеспечивать удаление протяженных участков генов-мишеней. На основе данных протоспейсеров были получены плазмидные конструкции, проведена трансформация клеток 293FT, получены и отобраны жизнеспособные и активно делящиеся моноклональные клеточные линии. Среди них были выделены те, что несут мутации, обеспечивающие сдвиг рамки считывания, который был вызван не только короткими инсерциями или делециями в генах, но и нарушением сплайсинга при удалении корректных экзон-интронных стыков. Для клонов с мутациями в гене IRF7 была проведена оценка продуктивности наработки модельного вируса гриппа H1N1. Было показано, что подавление экспрессии даже единичного гена приводит к достоверному повышению накопления вируса гриппа А. Таким образом, была подтверждена возможность использования нокаута генов системы регуляции противовирусного ответа для повышения продуктивности наработки вируса гриппа в клетках человека. *Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №18-75-10069.*

АГРЕГАЦИЯ ГЕНТИНГТИНА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *OGATAEA POLYMORPHA* И *O. PARAPOLYMORPHA*

А.В. Каргинов[1], О.В. Митькевич[1], А.И. Александров[1,2], М.О. Агафонов[1]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Патогенез многих нейродегенеративных заболеваний связан с образованием фибриллярных белковых агрегатов со специфической кросс-бета структурой, называемых амилоидами. Одно из таких заболеваний – болезнь Гентингтона, которая связана

с образованием амилоидных агрегатов мутантного белка гентингтина. Нормальный гентингтин содержит участок, имеющий от 14 до 34 остатков глутамина, а у патогенного мутанта размер этого полиглутаминового тракта превышает 34 остатка. Для изучения механизмов токсичности амилоидов этого белка для клетки часто используют в качестве модели дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Однако насколько обнаруженные на этом объекте эффекты являются универсальными, остается неясным. В данной работе мы предприняли попытку использовать другие виды дрожжей, *Ogataea polymorpha* и *O. parapolymorpha*, для изучения влияния агрегации гентигтина на физиологию клетки. Для этого были получены генетические конструкции, кодирующие полиглутаминовые тракты длиной 25 и 103 аминокислотных остатков слитые с зеленым флуоресцирующим белком GFP. Экспрессию этих конструкций обеспечивал сильный индуцируемый промотор гена MAL1. Агрегацию оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии по возникновению в клетках ярких точек флуоресценции. В клетках *O. parapolymorpha* не было выявлено агрегации ни нормального белка, ни мутантного. Однако в клетках близкородственного вида *O. polymorpha* мутантный белок образовывал видимые агрегаты. Наличие амилоидных агрегатов было подтверждено методом электрофореза в агарозном геле. Несмотря на наличие агрегации, не было выявлено токсического эффекта экспрессии мутантного белка. Эти результаты указывают на то, что близкородственные виды дрожжей Ogatea, возможно, различаются по наличию в них амилоидов, способствующих агрегации гентингтина. Отличия наших результатов от таковых для дрожжей S. cerevisiae свидетельствуют о том, что агрегация и токсичность модельного гентингтина могут в значительной мере зависеть от организма, в котором проводится исследование. *Работа была поддержана грантом Российского научного фонда № 171401092 и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.*

СВЯЗЬ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ЯДЕРНОЙ ЛАМИНЫ С КЛЕТОЧНОЙ МИГРАЦИЕЙ И УСТОЙЧИВОСТЬЮ К МЕХАНИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

С.В. Лаврушкина[1], Н.Л. Овсянникова[2,3], А.С. Юдина[2], В.С. Колмогоров[1,3,4], П.В. Горелкин[3,5,8], О.С. Стрелкова[3], О.А. Жиронкина[3], К.И. Перепелина[6,7], А.Б. Малашичева[6,7], И.И. Киреев[1,2]
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова; [3]NanoProfiling LLC, Технопарк Сколково; [4]Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»,[5]Medical Nanotechnology LLC, Технопарк Сколково, Москва;[6]Санкт-Петербургский государственный университет; [7]Лаборатория молекулярной кардиологии, Национальный медицинский исследовательский центр им. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия; [8]ICAPPIC Limited, Лондон, Великобритания

Ядерная ламина (ЯЛ), белковая оболочка, подстилающая внутреннюю мембрану ядра, не только защищает геном от повреждения и обеспечивает селективный транспорт молекул, но и за счет своих вязкоупругих свойств участвует в процессе миграции клеток и способствует их устойчивости к механическому напряжению. Данные механические свойства ЯЛ обеспечиваются ее структурными компонентами ламинами А- и В-типа. Известно, что нарушение функции ламинов А-типа приводит к развитию целой группы патологий (ламинопатий), одним из механизмов развития которых рассматривают дестабилизацию ядерной оболочки (ЯО) и повреждение генома. Кроме того, нарушение экспрессии генов ламинов сопровождает онкогенез. Причем как низкий, так и высокий уровни ламина А могут быть плохим прогностическим признаком. До сих пор остаются дискуссионными вопросы о патогенезе ламинопатий и онкологических заболеваний, составом ядерной ламины и механическими свойствами ЯО. В данной работе мы рассмотрели взаимосвязь молекулярного состава ЯЛ и механических свойств ЯО в норме и при патологиях, а также провели оценку миграции таких клеток. Оценка механической устойчивости мышечных клеток и производных линий (синтезирующие мутантные формы R249Q, G465D, R471C, R482L, R527C и R527P) была проведена в гипоосмотических условиях. Анализ результатов показал нарушение механических свойств ядра в присутствии мутаций, расширение расстояний между микродоменами ЯЛ и формирование агрегатов в составе сети. Изменения вязкоупругости ядра и подвижности опухолевых клеток HT1080 через узкие пространства при введении генетических конструкций, содержащих ген нормального ламина А, прогерина и shRNA, подавляющей синтез данной изоформы, были измерены с помощью сканирующего ион-проводящего микроскопа и миграционных системах, соответственно. Анализ полученных данных показал повышение жесткости ЯО в клетках, синтезирующих экзогенные ламин А/прогерин, и снижение эффективности миграции через фильтры с размером пор 3 мкм. *Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект №17-15-01290) и Программы развития МГУ (ПНР 5.13).*

ИЗМЕНЕНИЯ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ СИНУКЛЕИНОПАТИЯХ

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

Отличительной чертой болезни Паркинсона (БП) и других синуклеинопатий является образование белковых агрегатов, называемых тельцами Леви, основным компонентом которых является белок альфа-синуклеин, и последующая гибель нейронов. Было обнаружено, что вызванные гербицидом паракватом спорадические формы БП вызывают снижение выработки лактата, тогда как глицеральдегид-3-фосфат, субстрат глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД), накапливается. Эти данные, а также информация о связывании с ГАФД производными депренила, используемыми в терапии БП, указывают на важную роль ГАФД в патогенезе БП. Чтобы продемонстрировать изменения в клеточном метаболизме при синуклеинопатиях, мы получили клетки нейробластомы SHSY-5Y, стабильно экспрессирующие альфа-синуклеин дикого типа (WT) или мутант A53T. Мы сравнили скорость протекания гликолиза в культурах со сверхэкспрессией альфа-синуклеина по сравнению с немодифицированными клетками и обнаружили, что как поглощение глюкозы, так и выработка лактата были снижены. Эти результаты были подтверждены in vitro измерениями продукции лактата и активности ГАФД в клеточных лизатах. Мы также

проверили влияние гликирующих агентов метилглиоксаля и глицеральдегид-3-фосфата на эти параметры. Иммуноцитохимическое окрашивание выявило амилоидные агрегаты, присутствующие как в WT, так и в A53T-экспрессирующих клетках. Воздействие метилглиоксаля увеличивало количество агрегатов на клетку, но уменьшало их размер, что может быть одной из причин снижения активности ГАФД. Мы получили и охарактеризовали олигомеры и фибриллы альфа-синуклеина, чтобы проверить их взаимодействие с ГАФД и сравнить его с инактивацией фермента, вызванной мономером альфа-синуклеина. Подводя итог, наши результаты показывают важную роль патологического процесса агрегации альфа-синуклеина в инактивации ГАФД и, следовательно, дисфункции центрального углеродного метаболизма при БП. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 19-04-00421.*

ВЛИЯНИЕ КОНТРАКЦИИ СГУСТКОВ КРОВИ НА КИНЕТИКУ ИХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ (ФИБРИНОЛИЗ)

А.Д. Пешкова, Р.И. Литвинов
НИЛ «Белково-клеточные взаимодействия», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Фибринолиз представляет собой протеолиз полимерных фибриновых сетей, которые образуют структурную основу сгустков крови и тромбов. Расщепление фибрина сопровождается распадом тромбов, закупоривающих кровеносные сосуды, и восстановлением кровотока in vivo. Остается открытым вопрос о связи фибринолиза с естественной контракцией (ретракцией, сжатием) сгустков крови, которая происходит под действием актомиозинового цитоскелета тромбоцитов. Цель работы заключалась в сравнении скорости расщепления сжатых (контрактированных) и не сжатых сгустков. Из одного и того же образца крови формировали два сгустка, в одном из которых контракцию предотвращали путем ингибирования полимеризации актина (латрункулин А), миозина IIa (блеббистатин) или интегрина αIIbβ3 (абциксимаб). Для исследования внутреннего фибринолиза до контракции сгустка в кровь добавляли тканевый активатор плазминогена (t-PA), после чего инициировали свертывание крови тромбином. Кинетику лизиса определяли оптически по уменьшению размера сгустка. Для изучения внешнего фибринолиза в кровь добавляли 125I-фибриноген, формировали сгусток, создавали условия для контракции, а затем добавляли t-PA. Кинетку внешнего фибринолиза определяли по скорости высвобождения радиоактивных продуктов расщепления фибрина. Установлено, что при внутреннем фибринолизе контрактированные сгустки расщеплялись примерно в 2 раза быстрее по сравнению со сгустками с нарушенной контракцией. Напротив, внешний фибринолиз протекал гораздо медленнее в контрактированных сгустках. Неконтрактированные сгустки высвобождали в 2-4 раза больше продуктов протеолиза фибрина в течение первых 30 минут и продолжали лизироваться примерно в 4 раза быстрее, чем контрактированные сгустки в течение 4 часов после добавления t-PA. Эта дихотомия в чувствительности контрактированных и неконтрактированных сгустков крови к внутреннему и внешнему лизису объясняется тем, что скорость лизиса зависит от проницаемости сгустков для фибринолитических ферментов, а также от пространственной близости расщепляемых фибриновых волокон. Связь между контракцией сгустков крови и фибринолизом может иметь важные последствия для профилактики и лечения тромбозов. *Работа выполнена по Программе повышения конкурентоспособности КФУ и грантов №18-415-160004 РФФИ и РТ и №19-015-00075 РФФИ.*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АГРЕГАЦИИ α-СИНУКЛЕИНА НА ОСНОВЕ КЛЕТОК ЛИНИИ SH-SY5Y

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

α-синуклеин (α-syn) в норме экспрессируется во многих тканях человеческого организма, при этом максимальные уровни экспрессии наблюдаются в клетках коры головного мозга. При болезни Паркинсона и других синуклеинопатиях показано накопление этого белка в тельцах Леви. Механизмы образования таких белковых агрегатов, а также механизмы их нейротоксичности не до конца ясны. Для изучения влияния скорости накопления α-syn на его агрегацию в данной работе был проведен сравнительный анализ модельных систем на основе перевиваемой клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y. Для этого были использованы три экспериментальных системы: химическая трансфекция, лентивирусная трансдукция клеток и получение стабильно трансформированных клеточных линий. Указанными методами были получены клетки с повышенной экспрессией гена α-Syn дикого типа, а также мутантного α-syn A53T, для которого в литературе показана ассоциация с аутосомно-доминантным наследуемым типом болезни Паркинсона. Во всех случаях экспрессия осуществлялась под контролем конститутивного промотора цитомегаловируса CMV. Наличие трансгена в моноклональных стабильно трансформированных клеточных линиях проверяли методом ПЦР. Для всех типов клеток показано избыточное накопление целевого белка методом иммуноцитохимии с антителами, специфичными к α-syn. Из указанных модифицированных клеток, а также контрольных интактных клеток, были получены фракции растворимых и нерастворимых в 1% Triton X-100 белков. Параллельно с этим, методами кислотного осаждения примесных белков, а также кристаллизацией с сульфатом аммония, была получена фракция белков, обогащенная α-syn. Указанные фракции были проанализированы с помощью вестерн блот анализа, для обогащенных фракций анализ проводился после ПААГ-электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Полученные данные позволяют сравнивать степень олигомеризации α-syn мутантного и дикого типа в экспериментальных клеточных системах с разной скоростью накопления этого белка. *Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда 16-14-10027.*

TOWARDS UNDERSTANDING THE ROLE OF NUCLEOLAR NON3 PROTEIN IN DROSOPHILA MITOSIS

J.V. Popova[1,2], G.A. Pavlova[1], A.A. Ogienko[1], E.N. Andreyeva[1], A.A. Yushkova[1,3], A.V. Pindyurin[1,3]
[1]Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS; [2]Institute of Cytology and Genetics SB RAS; [3]Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The nucleolus is a non-membrane nuclear organelle playing a crucial role in ribosome biogenesis in eukaryotes. It is known that nucleolus morphology and function are associated with cell growth and proliferation as well as with cell cycle regulation. A set of nucleolar proteins are also directly involved in such important cellular process as mitosis, taking a part in the spindle assembly. A poorly studied Non3 protein of D. melanogaster, which belongs to the highly conservative Brix domain protein family, seems to be one of such proteins. While its yeast and human orthologues are known to be involved exclusively in the pre-ribosomal RNA processing and assembly of the 60S ribosomal subunit, it was previously shown that depletion of Non3 in Drosophila cultured S2 cells affects mitotic spindle length. However, the molecular mechanism of this phenomenon is unclear. Here, we have found that depletion of Non3 also results in other mitotic spindle defects in S2 cells including those in sister chromatid separation and segregation. Importantly, these phenotypes were not due to decrease in the total amount of tubulin, which is the main component of microtubules, in the cell. Consistent with this finding, preliminary immunostaining experiments performed using diploid drosophila tissues suggested that kinetochore chromatin assembly is affected in Non3 mutants. On the other hand, depletion of Non3 showed almost no effects on microtubule regrowth from kinetochores/chromosomes after depolymerization of mitotic spindles in S2 cells caused by either cold or colcemid treatment. To clarify the role of the Non3 protein in mitotic cell division, we have establish a system allowing to compare Non3 heterozygous and homozygous cell clones in different tissues of the same larva or fly by using the FLP-induced mitotic recombination. The system will allow to almost completely exclude genetic background effects. Finally, we have generated and characterized a new null-mutation of the Non3 gene, referred to as Non31100. *This work was supported by the grant from the Russian Foundation for Basic Research (project #18-34-00699).*

THE ROLE OF PATRONIN IN MITOTIC SPINDLE FORMATION IN *DROSOPHILA* S2 CELLS

A.V. Razuvaeva[1,2], G.A. Pavlova[1], J.V. Popova[1,3], E.N. Andreyeva[1], M. Gatti[4], A.V. Pindyurin[1,2]
[1]Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS; [2]Novosibirsk State University; [3]Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia; [4]IBPM CNR and Department of Biology and Biotechnology, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

Proper formation of a functional mitotic spindle requires the concerted action of several microtubule (MT)-binding proteins. Among these, there are proteins that bind microtubule ends. Although many proteins have been identified that regulate MT plus end dynamics, much less is known about factors involved in regulation of MT minus ends. Recent studies have identified the calmodulin-regulated spectrin-associated proteins (CAMSAPs), a new family of proteins that bind and stabilize MT minus ends in mammalian cells. In *Drosophila*, there is only one ortologue of CAMSAPs named Patronin (also known as Ssp4 or CG33130). We explored the role of Patronin in *Drosophila* mitosis using S2 tissue culture cells as a model system.

We have recently demonstrated that Patronin associates with kinetochore MT bundles from prometaphase through anaphase, and to astral and central spindle MTs during telophase. In living prometaphases, Patronin displays a characteristic dynamic behavior along kinetochore MT bundles, and our results collectively indicate that Patronin is required for the stability of kinetochore MTs [Pavlova et al., 2019]. Here, we have examined the role of Patronin in the process of kinetochore-driven MT formation. In Patronin-depleted cells, MT regrowth assays showed that kinetochore-driven MT bundles are formed with frequencies very similar to those in control cells, both after colcemid- and cold-induced MT depolymerization. However, in the absence of Patronin, these bundles incorporate less tubulin than their control counterparts. Time-lapse microscopy of Patronin-GFP behavior during MT regrowth showed that Patronin does not participate in the process of MT nucleation, but becomes associated with MTs only when the spindle is almost completely reformed.

Taken together, our results suggest that Patronin specifically binds and stabilize the minus ends within MT bundles including those growing from the chromosomes. *This work was supported by the grant from the Russian Foundation for Basic Research (project #18-34-00688).*

1. Pavlova GA, Razuvaeva AV, Popova JV, Andreyeva EN, Yarinich LA, Lebedev MO, Pellacani C, Bonaccorsi S, Somma MP, Gatti M, Pindyurin AV. The role of Patronin in *Drosophila* mitosis. BMC Molecular and Cell Biology. 2019. 20(Suppl 1):7.

РОЛЬ МЕДЬ-СВЯЗЫВАЮЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ ИЗ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ *METHYLOCOCCUS CAPSULATUS* (ШТАММ М) В ОКИСЛЕНИИ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА

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

Метанокисляющие бактерии используют метан в качестве источника углерода и энергии. Биологический метаболизм метана начинается с активации инертной С-Н-связи метана, катализируемое метанмонооксигеназой. Существует два вида метанмонооксигеназы: растворимая и мембраносвязанная. Существует взаимосвязь между концентрацией меди и экспрессией двух монооксигеназ. Для поглощения меди метанотрофы синтезируют низкомолекулярный медь связывающий хромопептид – метанобактин (мб). Не все метанотрофы способны синтезировать мб. В настоящее время доказано наличие генов, кодирующих мб только у нескольких штаммов метанотрофов, относящихся к филуму Alphaproteobacteria. Штаммы, относящиеся к филуму Gammaproteobacteria синтезуют другой класс медь-связывающих соединений (мсс). Ранее нами было показано, что мсс из *Methylococcus capsulatus* (штамм М) катализирует окисление аскорбиновой кислоты кислородом воздуха. Целью данной работы было изучение каталитических свойств мсс в реакции окисления аскорбиновой кислоты пероксидом водорода. Выделение мсс осуществляли из культуральной жидкости *M. capsulatus* (М) методом жидкостной хроматографии на колонке с носителем Diaion HP20 (Supelco). Реакцию окисления L-аскорбиновой кислоты (7×10^{-5} моль/л) пероксидом водорода ($0{,}64\times10^{-3}$ моль/л) и кислородом воздуха проводили в среде 0.05 М Na-ацетатного буфера, pH 5,5 объемом 3 мл при комнатной

температуре (приблизительно 21°C). Показано, что константа скорости окисления аскорбиновой кислоты пероксидом водорода в присутствии комплекса меди с cbc из M. capsulatus (M) снижается на треть по сравнению с реакцией при отсутствии комплекса меди с cbc. Реакция окисления аскорбиновой кислоты пероксидом водорода характеризуется значением константы скорости, превышающей приблизительно в 10 раз по сравнению с аналогичной реакцией окисления кислородом. Это можно объяснить высокой активностью пероксидных радикалов. Таким образом, впервые показано, что комплекс меди с мсс из *M. capsulatus* (M) катализирует окисление аскорбиновой кислоты кислородом воздуха, но ингибирует окисление аскорбиновой кислоты перекисью водорода. Это косвенно указывает на то, что мсс может участвовать в детоксикации продуктов восстановления молекулярного кислорода, в частности образуемой перекиси водорода, которая восстанавливается до воды.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ: КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ АСПЕКТОВ МЕХАНИЗМА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Т.В. Вьюнова, Л.А. Андреева, К.В. Шевченко, Н.Ф. Мясоедов
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Регуляторные пептиды относят к уникальному классу универсальных химических регуляторов, влияние которых распространяется от контроля стабильности функционирования клеток до управления целыми системами и органами, включая эмоциональные аспекты высшей нервной деятельности. В мозге млекопитающих специфические “пептидные” рецепторы идентифицированы только для небольшой части биологически активных нейропептидов, тем не менее, основные молекулярные мишени их действия расположены в ЦНС. Предложен комплексный методологический подход к изучению молекулярных аспектов механизма биологического механизма регуляторных пептидов. Исследование базируется на радиолиганд-рецепторном методе анализа и охватывает следующие аспекты: специфическое связывание пептидов на плазматических мембранах клеток мозга, формирование тканеспецифического синактона [1], влияние пептидов как аллостерических модуляторов на функциональную активность различных нейрорецепторов, а также отставленные во времени эффекты регуляции (изменения характера специфических взаимодействий меченных тритием аналогов эндогенных лигандов с соответствующими им рецепторами в ответ на хроническое или острое введение пептидов). В качестве модельных пептидов мы использовали Семакс, Селанк и Проглипрол (терапевтические и профилактические пептидные препараты), а в качестве специфических лигандов - меченные тритием аналоги эндогенных нейромедиаторов (Glu, GABA, Ach). Показано, что молекулярный механизм действия регуляторных пептидов основан на дозозависимой аллостерической модуляции различных нейрорецепторов. Каждый регуляторный пептид характеризуется уникальным набором подтипов «модулируемых» рецепторов. Для регуляторных пептидов довольно часто свойственно существование нелинейной зависимости концентрация - молекулярный эффект, а также низкий концентрационный порог начала действия. Полученные на модельных пептидах результаты позволяют приоткрыть фундаментальные основы механизма молекулярной регуляции функционирования нейрорецепторных систем головного мозга. *Работа проведена при поддержке гранта РФФИ-КОМФИ № 17-00-00104 и программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии”.*

1. Vyunova T.V. et.al. Synacton and Individual Activity of Synthetic and Natural Corticotropins. J.Mol Recognit (2017).

ИЗОФОРМЫ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА NXF1 (NUCLEAR EXPORT FACTOR 1) И ИХ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ ФУНКЦИИ У ЖИВОТНЫХ

Е.В. Голубкова, А.О. Якимова, В.Р. Гинанова, С.Ф. Кливер, А.И. Пасынков, Л.А. Мамон
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Основной функцией РНК-связывающего белка NXF1 (Nuclear eXport Factor 1) является обеспечение экспорта большинства мРНК из ядра в цитоплазму. Ранее мы показали, что у дрозофилы гену Dm Nxf1 (sbr) соответствует более 10 различных транскриптов и не менее трех белковых изоформ. Для двух описанных нами изоформ белка NXF1 у дрозофилы характерна органоспецифичность. У дрозофилы присутствует семенниково-специфичный белок NXF1, он укорочен с N-конца и не содержит сигнала ядерной локализации. У млекопитающих для гена Nxf1 не известны семенниково-специфичные белковые продукты, но есть семенниково-специфичные гены-паралоги семейства Nxf. Кроме того, общим для генов Nxf1 всех животных является существование транскрипта, сохраняющего гомологичный интрон. Интрон-содержащему транскрипту соответствует укороченная с С-конца изоформа белка, так как в интроне расположен предварительный стоп-кодон. У млекопитающих короткий белок, соответствующий интрон-содержащему транскрипту гена Nxf1, неслучайно распределяется в мозге грызунов, обогащая клетки гиппокампа и неокортекса. У дрозофилы изоформа белка, соответствующая интрон-содержащему транскрипту, также является нейро-специфичной. Семенниково- и нейро-специфичные белки NXF1 могут участвовать в метаболизме долгоживущих мРНК в сперминогенезе и нейрогенезе. Неслучайная локализация и конститутивного белка NXF1 в цитоплазме различных клеток дрозофилы может свидетельствовать о его специализации в отношении определенных мРНК.

БЕЛКОВЫЕ ПРОДУКТЫ ГЕНА *NXF1* У *DROSOPHILA MELANOGASTER* И ИХ РОЛЬ В МОРФОГЕНЕЗЕ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ДРОЗОФИЛЫ

А.И. Пасынков, Е.В. Голубкова, А.О. Якимова, Л.А. Мамон
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Ген *Nxf1* – эволюционно-консервативный ген, присутствующий у животных, а функцией его основного белкового продукта является экспорт мРНК из ядра. Однако, для гена *Nxf1* известно как минимум два белковых продукта, один из которых укорочен с С-конца. Появление второго белка связано с трансляцией альтернативного транскрипта, с сохраненным интроном, содержащим предварительный стоп-кодон. Функции этого белка не изучены. У *Drosophila melanogaster* ген *Dm Nxf1* имеет

серию мутантных аллелей с характерными аллеле-специфичными фенотипическими проявлениям и предоставляет уникальную возможность исследовать дополнительные функции гена *Nxf1*. Для мутантов по гену *Dm Nxf1* характерно нарушение расхождение хромосом в мейозе и митозе, изменение формы веретена первого деления мейоза у самок, нарушение цитокинеза в раннем сперматогенезе, что позволило нам предположить значение этого гена для формирования цитоскелета. Кроме того, мы отметили наличие аномалий различных струкур мозга у самцов, несущих одну из мутантных аллелей гена *Dm Nxf1*. Интересно, что по нашим данным укороченная изоформа белка NXF1, является нейро-специфичной – что может свидетельствовать о наличии у этой изоформы собственной функции в нервной ткани. В пользу такого предположения говорит также доменная структура этого белка – в результате преждевременной терминации трансляции из-за присутствующего в составе транскрипта интрона с преждевременным стоп-кодоном, в данной форме белка отсутствует домен связывания с ядерным поровым комплексом, исключая, таким образом, возможность участия укороченного NXF1 в ядерном транспорте мРНК. Отличия в доменном составе от полноразмерного NXF1, а также неслучайная локализация в клетках позволяют предположить, что функция укороченного белка NXF1 связана с судьбой мРНК в цитоплазме, а именно с сохранением и локализацией мРНК в составе рибонуклеопротеиновых гранул. В состав таких гранул могут входить и мРНК, необходимые для перестроения цитоскелета происходящего при клеточных делениях, росте отростков

КАРТИРОВАНИЕ ЭКТОДОМЕНА РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ IRR С ПОМОЩЬЮ ПАНЕЛИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

А.С. Горященко[1], О.В. Серова[1], А.А. Можаев[1,2], Т.Н. Ерохина[1], И.Е. Деев[1], А.Г. Петренко[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]ФИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

Рецепторные тирозинкиназы играют важнейшую роль в системе передачи сигналов в клетке - регулируют пролиферацию и дифференцировку клеток, клеточную миграцию и метаболизм, а также участвуют в контроле клеточного цикла. У человека известно 58 рецепторных тирозинкиназ, объединенных в 20 семейств. Семейство рецептора инсулина содержит три высокогомологичных рецептора: рецептор инсулина (IR), рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR) и рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR). Несмотря на то, что структурно-функциональной характеристикой IR занимаются уже много лет, до сих пор не получено кристаллической структуры полноразмерного рецептора. Если говорить о структурных изменениях в молекуле IR при взаимодействии с инсулином, то до недавнего времени была получена только структура комплекса инсулина с фрагментом внеклеточной части IR, и лишь в 2018 году методом электронной микроскопии наконец удалось получить структуру полноразмерного IR и его комплекса с инсулином, иммобилизованных на нанодисках. Данных о третьем члене семейства рецептора инсулина, IRR, еще меньше: до недавнего времени лиганда для него не было найдено, а его физиологическая роль оставалась загадкой. В нашей лаборатории было продемонстрировано, что IRR может активироваться слабощелочной внеклеточной средой, в то время как другие рецепторные тирозинкиназы имеют лиганды белковой или пептидной природы. Активация IRR щелочной средой вызывает специфические и дозозависимые конформационные изменения во внеклеточной части рецептора, приводящие к аутофосфорилированию внутриклеточных киназных доменов.

Для изучения структуры и функции рецептора IRR нами были получены и охарактеризованы моноклональные антитела, специфически распознающие внеклеточную часть рецептора IRR. Целью данной работы было определение доменов IRR, содержащих антигенные детерминанты этих антител. Для этого использовали ранее полученный набор химерных вариантов IRR с заменами целых доменов на аналогичные домены IR и мутантов, содержащих точечные аминокислотные замены. Кроме того мы обнаружили, что одно из антител может активировать IRR при нейтральном pH, а другое ингибирует активацию IRR щелочью. Таким образом, нами впервые описан активатор IRR пептидной природы, а охарактеризованную в данной работе панель антител можно в дальнейшем использовать для изучения структурных особенностей pH-чувствительности IRR.

КИНЕТИЧЕСКИЕ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ДЕАКТИВАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ NADH:УБИХИНОН-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ (ДЫХАТЕЛЬНОГО КОМПЛЕКСА I)

В.Г. Гривенникова, А.Д. Виноградов
Кафедра биохимии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Тридцать лет тому назад нашей группой было описано превращение протон-транслоцирующей каталитической активности NADH:убихинон-редуктазного участка дыхательной цепи митохондрий из «нормального» активного (А) состояния в неактивное (Д) и обратно (А/Д переход, Complex I A/D transition). Это явление привлекло внимание главных исследовательских групп, работающих в области биоэнергетики в Европе, США и Великобритании. В настоящее время ни его механизм, ни возможное физиологическое значение остается неизвестным и ограничивается гипотетическими предположениями. Основные факты, касающиеся А/Д перехода суммированы ниже. 1. Любой препарат дыхательной цепи митохондрий представлен смесью активной (А) и деактивированной (Д) форм комплекса I. 2. А/Д переход не наблюдается у прокариот. 3. Скорость А→Д перехода аномально чувствительна к температуре. 4. Трансформация комплекса в деактивированное состояние инициируется условиями, в которых его каталитическая активность запрещена (анаэробиоз, отсутствие субстратов). 5. Деактивация сопровождается (или инициируется) появлением SH-группы, блокирование которой препятствует обратному процессу (Д→А переход). 6. При добавлении субстратов Д-форма быстро, но существенно медленнее, чем обороты фермента в его обычном каталитическом цикле, превращается в А-форму. В настоящей работе мы сообщаем новые факты, касающиеся кинетических и термодинамических параметров деактивации комплекса I. 1. ATP и/или энергизация сопрягающей мембраны снижает скорость спонтанной деактивации комплекса I. Влияние ATP предотвращается блокированием протон-транслоцирующей активности Fo·F1 или удалением его F1-компонента. 2. Процесс деактивации прекращается при соотношении Д/А форм ~ 10 и это соотношение не зависит от температуры. Мы рассматриваем две возможности сохранения остаточной активности комплекса I после завершения деактивации. Согласно первой, в сопрягающих мембранах существует равновесие между этими формами.

Другая возможность состоит в существовании фракции фермента, вообще не подверженной процессу спонтанной деактивации. Существование такой фракции может быть обусловлено специфическим набором аннулярных фосфолипидов или посттрансляционной модификацией одной или нескольких субъединиц комплекса I.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00706.

Fo·F1-АТРаза/СИНТАЗА ПРОЧНОСОПРЯЖЕННЫХ СУББАКТЕРИАЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ *PARACOCCUS DENITRIFICANS:* КИНЕТИКА СИНТЕЗА АТР

Т.В. Жарова, А.Д. Виноградов
Кафедра биохимии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Почти общепризнано, что Fo·F1 – обратимо функционирующий комплекс, катализирующий либо гидролиз АТР, сопряженный с векторным переносом протонов (или Na^+) через мембрану, либо синтез АТР, используя свободную энергию такого переноса в обратном направлении. Подавляющее большинство данных, приведших к такому представлению, было выполнено при изучении АТР-гидролазной активности комплекса, легко регистрируемой при использовании либо его водорастворимого фрагмента (F1), либо Fo·F1, связанного с несопряженными мембранами и неспособного катализировать энерго-зависимый синтез АТР. В течение многих лет внимание нашей группы было сосредоточено на проблеме обратимости функционирования Fo·F1 комплекса с использованием прочносопряженных пространственно инвертированных субмитохондриальных фрагментов. Полученные результаты привели нас к представлению, впервые сформулированному еще в 1980 году [1], о том, что механизмы синтеза и гидролиза АТР различны [2]. В последние годы мы обратились к изучению суббактериальных фрагментов *P. denitrificans* – единственному доступному объекту, позволяющему прослеживать как естественный энерго-зависимый синтез АТР, так и обратную реакцию [3]. Анализ обоих процессов позволил сформулировать гипотезу о существовании двух независимо функционирующих изоформ Fo·F1: АТРазы и АТРсинтазы [4]. В настоящей работе сообщаются результаты изучения кинетики синтеза АТР и изменений мембранного потенциала в мембранах *P. denitrificans*, демонстрирующих классическое явление дыхательного контроля [4]. При значении pH среды 7,0, при котором гидролитическая активность Fo·F1 почти отсутствует, и 8,0, при котором эта активность соизмерима с АТР синтазной, кинетика синтеза или гидролиза АТР и электрических ответов мембран соответствует модели функционирования двух независимых (неравновесных) изоформ Fo·F1.

1. Minkov I. B., Vasilyeva E. A., Fitin A. F., Vinogradov A. D. (1980) Biochem. Int. 1, 478-485
2. Vinogradov A.D. (2000) J. Exp. Biol. 203, 41-49
3. Zharova T.V., Vinogradov A.D. (2004) J. Biol. Chem, 279, 12319-12324
4. Zharova T.V., Vinogradov A.D. (2017) Biochim. Biophys. Acta, 1858, 939-944
5. Zharova T.V., Vinogradov A.D. (2014) Biochim. Biophys. Acta, 1837, 1322-1329 Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00706

РОЛЬ N-ТЕРМИНАЛЬНЫХ КОРОТКИХ БЕЛКОВ SUP35 В АГРЕГАЦИИ И ПОДДЕРЖАНИИ [PSI+] ФАКТОРА

О.М. Землянко[1,2], Н.П. Трубицина[1], С.А. Бондарев[1,3], Г.А. Журавлева[1,3]
[1]Кафедра генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета; [2]Санкт-Петербургский научный центр РАН; [3]Лаборатория биологии амилоидов Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

Нарушение укладки белков может вызывать различные заболевания, в том числе и нейродегенеративные заболевания, связанные с агрегацией амилоида бета и PrP. Удобной моделью для изучения процесса прионизации служат дрожжи Saccharomyces cerevisiae, у которых в настоящее время описано 10 прионных факторов. Одним из наиболее изученных дрожжевых прионов является фактор [PSI+], прионная форма белка Sup35 (фактор терминации трансляции eRF3). В нативной конформации этот белок образует комплекс с фактором терминации Sup45 (eRF1), который осуществляет освобождение новосинтезированного пептида из рибосомы. Агрегация Sup35p, так же, как и мутации в жизненно важных генах SUP35 и SUP45 приводят к нарушению точности терминации трансляции, или нонсенс-супрессии. Ранее в нашей лаборатории была получена коллекция жизнеспособных нонсенс-мутантов по генам SUP35 и SUP45. В клетках дрожжей, несущих нонсенс-мутации, присутствуют укороченные варианты этих белков и снижено количество полноразмерного белка Sup35 или Sup45, соответственно. Было показано, что мутации в гене SUP45 приводят к синтетической летальности в сочетании с [PSI+] фактором уже в гетерозиготном состоянии, что нехарактерно для мутаций в гене SUP35. В сочетании с [PSI+] фактором мутации sup35-n (n – от nonsense) летальны в гомозиготе в гаплоидных клетках, тогда как диплоиды с мутациями в гемизиготе жизнеспособны. Возможно, к гибели клеток приводит снижение и без того небольшого количества белка Sup35 за счет включения его в агрегаты [PSI+]. При этом роль коротких фрагментов Sup35p в поддержании [PSI+] фактора и влиянии на жизнеспособность клеток остается неясной. В ходе текущей работы мы проводили анализ формирования амилоидных фибрилл короткими N-терминальными фрагментами Sup35 *in vitro* и сравнение физико-химических свойств этих фибрилл в зависимости от длины соответствующего фрагмента. Кроме того, изучали включение N-терминальных фрагментов в агрегаты [PSI+] *in vivo* и оценивали их влияние на частоту индукции [PSI+] фактора. Эта работа позволит выявить роль различных участков прионформирующего домена Sup35 в образовании и передаче [PSI+] фактора. *Работа выполнена при поддержке грантов РНФ 18-14-00050 и РФФИ 19-04-00173.*

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЦИТОЛИТИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ МОРСКОЙ АНЕМОНЫ *HETERACTIS CRISPA*

А.Н. Кветкина[1], Е.В. Лейченко[1,2], М.П. Исаева[1], Е.А. Зелепуга[1], О.С. Маляренко[1], А.П. Павленко[1,2], М.М. Монастырная[1], Э.П. Козловская[1]
[1]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.В. Елякова ДВО РАН; [2]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Актинопорины – биологически активные полипептиды (17-20 кДа) актиний, образующие функционально активные поры в сфингомиелин-содержащих мембранах. Большинство актиний продуцируют более чем одну изоформу актинопоринов, которые различаются точечными аминокислотными заменами, изоэлектрической точкой, молекулярной массой и цитолитической активностью. Предполагается, что появление множества изоформ актинопоринов в составе яда является одной из стратегий успешного выполнения защитной функции и охоты. Благодаря избирательному действию на клетки-мишени и высокой стабильности к температуре и протеолитической деградации, актинопорины рассматривают в качестве противоопухолевых, антибактериальных и кардиостимулирующих агентов. Особое внимание уделяется исследованиям действия актинопоринов на различные клеточные культуры, а также созданию иммуноконьюгатов с различными лигандами для селективного разрушения паразитов и опухолевых клеток. Исследование транскриптома актинии Heteractis crispa позволило установить, что актинопорины кодируются мультигенным семейством, включающим не менее 47 представителей. На основании филогенетического анализа и распределения электростатического потенциала актинопорины H. crispa были разделены на три кластера, представители которых различаются структурными особенностями, а также величиной и направлением N-концевого дипольного момента. Получено шесть рекомбинантных актинопоринов, представителей разных кластеров, гемолитическая активность которых, как было обнаружено, зависит от направления дипольного момента молекулы. На трех линиях опухолевых клеток была исследована цитотоксическая активность рекомбинантного актинопорина, rHct-A2. Показано, что rHct-A2 вызывал гибель 50% клеток рака толстой кишки (HT-29), рака молочной железы (MDA-MB-231) и меланомы (SK-MEL-28) в концентрациях 34, 46 и 63 мкМ, соответственно, и на 47% ингибировал рост колоний клеток HT-29 в концентрации 20 мкМ. Полученные результаты свидетельствуют о фармакологическом потенциале Hct-A2 в качестве противоопухолевого агента. *Данная работа поддержана грантом РНФ (проект № 18-74-10028).*

ОГРАНИЧЕННАЯ СКОРОСТЬ ДИФФУЗИИ АФК ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ: РОЛЬ В ЗАЩИТЕ ОТ СТРЕССА

О.В. Маркова[1], С.С. Соколов[1], Н.А. Киреева[2], Ф.Ф. Северин[1], Д.А. Кнорре[1,3]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и [2]Факультет почвоведения, МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Перекись водорода способна проникать через фосфолипидный бислой, однако скорость этого процесса ограничена и зависит от липидного состава бислоя. Недавно было показано, что Lam-белки участвуют в невезикулярном транспорте стеринов между мембранами клетки. Поскольку стериновый состав мембраны влияет на скорость диффузии экзогенной перекиси водорода в клетку, то активность этих белков может быть важна для адаптации клеток к экзогенному окислительному стрессу. Чтобы проверить это предположение мы исследовали проницаемость плазматической мембраны дрожжей Saccharomyces cerevisiae для H2O2. Мы оценили отношение скоростей разложения H2O2 интактными и пермеабилизованнымми клетками: пермеабилизация клеток дигитонином или CTAB приводила к 6-7 кратному увеличению скорости разложения H2O2. Мы обнаружили, что делеция гена ERG6, кодирующего фермент стерол 24-С-метилтрансферазу, приводит к увеличению барьерной функции мембраны, в то же время делеция генов ERG4 и ERG5 снижала ее. Мы не обнаружили статистически значимого изменения проницаемости плазматической мембраны по отношению к перекиси водорода в штамме дрожжей, в котором делетированы все четыре LAM гена. Однако штамм UPC2-1 — с мутацией, которая приводит к избыточному накоплению стеринов в клетке — демонстрировал повышенную проницаемость плазматической мембраны по отношению к H2O2. Наши данные говорят о том, что избыток эргостерина снижает барьерную функцию плазматической мембраны. Кроме того, мы обнаружили, что пермеабилизация отдельных клеток дрожжей, вызванная естественным стрессом — тепловым шоком, может значительно увеличивать резистентность клеток той же суспензионной культуры к экзогенной перекиси водорода. Таким образом, при наличии сильного ограничения скорости диффузии перекиси водорода через мембраны, контролируемая гибель части клеток может выступать в качестве стратегии коллективной защиты этих клеток от окислительного стресса. *Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ №18-14-00151.*

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ 3d-МЕТАЛЛОВ С ГЛЮКОНОВОЙ КИСЛОТОЙ НА БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *IN VITRO*

О.А. Князева, Е.А. Киреева, С.И. Уразаева
Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Уфа, Россия

Исследование влияния соединений 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu и Zn), дисбаланс которых отмечается при различных патологических состояниях, на белок-белковые взаимодействия, которые лежат в основе иммунных реакций, имеет актуальное значение. Система комплемента является одним из важнейших регуляторов приобретенного иммунитета, поэтому ее роль в патогенезе заболевания существенна. Обычно активация системы комплемента по классическому пути начинается с присоединения к комплексу иммуноглобулина G с антигеном субкомпонента первого фактора комплемента C1q. Цель работы – оценить влияние глюконатов 3d-металлов на взаимодействие субкомпонента комплемента C1q с комплексом антиген-антитело *in vitro*.

Глюконаты 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) были синтезированы в лаборатории координационных соединений ОСП ФГБНУ Уфимского института химии УфИЦ РАН [2]. Оценку влияния глюконатов 3d-металлов на взаимодействие C1q с комплексом антиген-антитело проводили по методике [3] с использованием сенсибилизированных гемолитической сывороткой эритроцитов барана. Показано, что способностью оказывать стимулирующее действие на взаимодействие C1q с комплексом антиген-антитело, обладают два соединения: CoGl (51%) и MnGl (19%). FeGl (21%) и CuGl (8%), напротив, оказывали ингибирующее действие, что приводило к блокировке классического пути активации комплемента. В то же время, глюконат цинка, обладающий по нашим данным наиболее выраженной иммунокорригирующей способностью [1], оказывал на комплемент нейтральное действие. Полученные результаты свидетельствуют о различных механизмах действия исследуемых соединений на белок-белковые взаимодействия.

1. Князева, О.А., Уразаева С.И., Конкина И.Г. и др. Антииммуносупрессивное действие глюконатов 3d-металлов при экспериментальном иммунодефиците/ О.А. Князева, С.И. Уразаева, И.Г. Конкина // Казанский медицинский журнал. – 2018. – № 2. – С. 255-259.
2. Конкина И.Г., Иванов С.П., Князева О.А., и др. Физико-химические свойства и фармакологическая активность глюконатов Mn(II), Fe(II), Co(II), Cu(II) и Zn(II) // Химико-фармацевтический журнал. 2002. Т. 36, № 1. С. 18-21.
3. Патент РФ 2669342, МПК G01N33/53. Способ определения влияния препаратов на взаимодействие комплемента с комплексом антиген-антитело / О.А. Князева [и др.]. – опубл. 10.10.18, Бюл. 28.

РОЛЬ БЕЛКА YB-1B ПЕРЕНОСЕ КЛЕТОЧНЫХ МРНК В ЭКЗОСОМЫ

О.А. Косинова[1], Д.Д. Яньшина[1], А.В. Гопаненко[1], С.Н. Тамкович[1,2], А.Е. Тупикин[1], М.Р. Кабилов[1], А.А Малыгин[1,2], Г.Г. Карпова[1,2]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Экзосомы – мембранные везикулы, которые секретируются различными клетками и участвуют в межклеточной коммуникации. Они переносят наборы белков, липидов и различные кодирующие и некодирующие РНК (мРНК, микроРНК, длинные некодирующие РНК). Выдвинута гипотеза о существовании специального отбора РНК в клетке для включения их в экзосомы, молекулярный механизм которого пока не установлен. С помощью анализа баз данных по экзосомальным РНК обнаружено, что большинство из них содержит в 3'-нетранслируемой области (НТО) мотивы ACCAGCCU, CAGUGAGC и UAAUCCCA [1]. Ранее мы показали, что белок YB-1 является единственным белком цитоплазматического экстракта клеток HEK293, специфически связывающим РНК-шпильки, содержащие любой из этих мотивов [2]. Оказалось, что такого типа шпильки в 3'-НТО мРНК отвечают за кооперативное связывание YB-1, и их консенсусные последовательности были выведены для каждого из мотивов [3]. С использованием метода PAR-CLIP (от англ. photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation) вышеуказанные консенсусные последовательности обнаружены в 3'-НТО почти половины мРНК-партнеров YB-1 на медианном расстоянии, равном 480 нт, от участков сшивки. Из них только те мРНК, которые транслируются с низкой эффективностью при относительно высоких уровнях в клетках, т.е. являются упакованными, выявлены в суммарной РНК из экзосом от клеток HEK293. Доля мРНК в суммарной экзосомальной РНК резко уменьшалась, если экзосомы были выделены из клеток с пониженным содержанием YB-1. На основании полученных данных можно предположить, что YB-1 играет роль в компактизации мРНК, содержащих консенсусные последовательности, требующейся для переноса таких мРНК в экзосомы. *Работа поддержана грантом РФФИ №18-04-00074 и частично Проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210022-4 и Проектом 5-100 Минобрнауки РФ.*

1. Batagov,A.O. et al. (2011) BMC Genomics, 12, S18.
2. Kossinova,O.A. et al (2017) BBA – Proteins and proteomics, 1865, 664–673.
3. Yanshina,D.D. et al (2018) Biochimie, 44, 134–143.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНОВ GIC1 И GIC2 НА ПРОЦЕСС ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

С.Е. Москаленко[1,2], Т.М. Рогоза[1,2], О.М. Землянко[2], Г.А. Журавлева[2]
[1]Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия

Терминация трансляции является завершающим этапом биосинтеза белка в клетке. Основными белковыми факторами, участвующими в терминации трансляции у эукариот, являются eRF1 и eRF3. У дрожжей факторы eRF1 и eRF3 кодируются генами SUP45 и SUP35, соответственно. Известно, что eRF1 и eRF3 взаимодействуют с различными белками, не являющимися компонентами аппарата трансляции, что может оказывать влияние как на эффективность белкового синтеза, так и на протекание других клеточных процессов. Ранее мы обнаружили взаимодействие белков eRF3 и Gic2 с помощью двугибридной дрожжевой системы. Известно, что белок Gic2 и его паралог Gic1 контролируют поляризацию, размер и форму клетки, определяют место образования почки, а также участвуют в регуляции перехода клетки из митоза в стадию G1. Также белки Gic1 и Gic2 регулируют поляризацию актинового цитоскелета клетки и ориентацию митотического веретена деления. Они являются эффекторами ГТФазы Cdc42, у которой есть консервативная последовательность для связывания с эффекторами. Целью нашей работы является изучение влияния белков Gic1 и Gic2 на процесс терминации трансляции у дрожжей. Для этого были изучены различные эффекты при сверхэкспрессии данных генов и их делеции у мутантов по генам SUP35 и SUP45, а именно проведен фенотипический анализ нонсенс-супрессии в полученных штаммах, оценена жизнеспособность клеток, проанализировано количество белков Sup35p и Sup45p. На основании полученных данных было показано, что белки Gic1 и Gic2 могут оказывать влияние на процесс терминации трансляции у дрожжей. *Работа поддержана грантами РНФ 18-14-00050, РФФИ 19-04-00173, а также выполнена в рамках гостемы № 0112-2016-0015.*

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕТА-АМИЛОИДОВ С АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

А.В. Протасов[1,2], О.А. Миргородская[1]
[1]НИИт гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

В условиях близких к физиологическим, изучено взаимодействие α2-макроглобулина (α2МГ) с пептидами Альцгеймера разной длины – βАР (1-38), βАР (1-40) и βАР (1-42). Предполагается, что именно это взаимодействие обеспечивает один из возможных путей выведения токсичных форм этих пептидов. Потеря способности α2МГ после прединкубации с пептидами ингибировать трипсин была использована для количественной оценки взаимодействия пептидов с α2МГ. При этом ингибирующая способность всех пептидов оказалась одинаковой. Для количественного анализа методом масс-спектрометрии необходимо провести предподготовку образцов, которая позволит получить соответствие соотношения интенсивностей пептида и стандарта их концентрациям. В противном случае соотношение интенсивностей могут отличаться до 3 раз. Варьирование состава среды и температуры оказывает существенное влияние на ингибирующие свойства пептидов, и эти изменения могут быть количественно определены. При масс-спектрометрическом анализе было определено количество пептида связанного с одной молекулой α2МГ. Причем показано, что это соотношение сохраняется при связывании пептида как со свободным с α2МГ, так и с комплексом α2МГ с трипсином. Трипсинолиз пептида βАР (1-40) как свободным трипсином, так и его комплексом с α2МГ показал, что последовательность гидролиза отдельных связей сохраняется. При этом показано, что при гидролизе связи 28K-29G пептиды теряют свою ингибирующую способность по отношению к α2МГ. Сопоставление скоростей гидролиза пептида свободным трипсином и трипсином в виде комплекса при равных концентрациях показало, что связывание трипсина с а2-МГ снижает ее на порядок. Таким образом, в сопоставлении с возможным протеолизом именно взаимодействие с а2-МГ является более эффективным возможным путем выведения активных форм бета-амилоидов из биологических сред.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ РАЗОБЩИТЕЛИ АКТИВИРУЮТ МНОЖЕСТВЕННУЮ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ У ДРОЖЖЕЙ

А.В. Азбарова[1,2], К.В. Галкина[1,2], И.М. Финкельберг[1], О.В. Маркова[2],R. Prasad[3], Д.А.Кнорре[2,4]
[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [3]Amity University Gurugram, Gurgaon, Haryana, India; [4]Первый Московский государственный медицинский университет им И.М. Сеченова, Москва, Россия

ABC-переносчики с широкой субстратной специфичностью, локализованные в плазматической мембране, защищают клетку от чужеродных для нее соединений — ксенобиотиков. Поскольку работа этих переносчиков сопряжена с гидролизом ATP, клетка нарабатывает их лишь при появлении ксенобиотика в цитоплазме. Мы предположили, что снижение эффективности клеточной энергетики предотвратит увеличение лекарственной устойчивости, индуцированное низкими дозами ксенобиотиков, так как сделает наработку ABC-переносчиков энергетически невыгодной. Чтобы проверить это предположение, мы исследовали действие разобщителей дыхания и фосфорилирования на индуцируемую лекарственную устойчивость пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Однако, мы обнаружили, что добавление разобщителей карбонилцианид-4-трифторметокси-фенилгидразона (FCCP) и пентахлорфенола (PCP), наоборот, увеличивает содержание основного ABC-переносчика дрожжей — Pdr5p, слитого с GFP. При этом соотношение сигнала от Pdr5-GFP в плазматической мембране и вакуоли не изменялось. Этот результат указывает на то, что повышение содержания белка в мембране связано с увеличением скорости его синтеза в клетке, а не со снижением скорости его деградации. Мы определили, что PCP повышает резистентность дрожжей *S. cerevisiae* и *Candida albicans* к азольным антимикотикам. Таким образом, мы показали, что повышение содержания Pdr5-GFP, вызванное разобщителями, приводит к увеличению лекарственной устойчивости. Мы предположили, что снижение трансмембранного потенциала митохондрий может активировать систему ретроградной сигнализации. Эта система передает сигнал о нарушении работы митохондрий в ядро и, в частности, вызывает увеличение экспрессии PDR5. Однако делеция генов, инициирующих ретроградную сигнализацию митохондрий YAP1 и RTG2, не влияла на накопление Pdr5-GFP под действием разобщителя. При этом, PCP не вызывал накопление Pdr5-GFP в клетках с делецией транскрипционных факторов PDR1 и PDR3. Наши данные указывают на то, что неспецифические ABC-переносчики нарабатываются клеткой и остаются эффективным способом защиты даже в таких условиях, когда митохондрии этих клеток полностью деэнергизованы. *Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №18-54-45001.*

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕТАБОЛИЗМА СТЕРИНОВ И РЕГУЛЯЦИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ABC-ПЕРЕНОСЧИКОВ

К.В. Галкина[1,2], Т.С. Широковских[1], А.И. Смирнова[2], С.С. Соколов[2], Ф.Ф. Северин[1,2], Д.А. Кнорре[2,3]
[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Липофильные катионы используются для адресации ингибиторов и антиоксидантов в матрикс митохондрий. Это позволяет снизить их нежелательные эффекты в цитоплазме и других компартментах клетки. Кроме того, предполагается, что накопление соединений в матриксе митохондрий препятствует их откачиванию из клетки ABC-переносчиками плазматической мембраны. Активность этих переносчиков представляет большую проблему при борьбе с патогенными микроорганизмами и хеморезистентными раковыми клетками. В своей работе мы исследовали взаимодействие липофильного катиона, додецилитрифенилфосфония (C12TPP) с эукариотической клеткой, используя в качестве модели дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Мы обнаружили, что C12TPP способен индуцировать экспрессию генов основных ABC-переносчиков дрожжей: PDR5, SNQ2 и YOR1. При этом, прединкубация клеток дрожжей с C12TPP препятствовала накоплению других субстратов

этих ABC-переносчиков в клетках. Мы обнаружили, что делеция генов PDR1 и ERG3 препятствовала этому эффекту. PDR1 кодирует транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию неспецифических ABC-переносчиков. ERG3 кодирует стерин C-5 десатуразу, катализирующую одну из терминальных реакций биосинтеза эргостерина. Чтобы понять, как связана регуляция PDR генов с биосинтезом эргостерина, мы исследовали накопление Pdr5-GFP в штаммах, где были нокаутированы гены, относящиеся к метаболизму или транспорту стеринов. Мы обнаружили, что ингибирование биосинтеза эргостерина на этапе синтеза сквалена с помощью репрессии белка Erg9p приводит к накоплению в плазматической мембране Pdr5-GFP. Аналогичный эффект наблюдался в штаммах, где были нокаутированы гены ERG2, ERG4 и ERG5. При этом нарушение транспорта стеринов не вызывало подобных изменений: мы не обнаружили увеличения содержания Pdr5-GFP в штамме, в котором нокаутированы все четыре LAM-гена, отвечающих за транспорт стеринов между плазматической мембраной и эндоплазматическим ретикулумом. Мы предполагаем, что нарушение биосинтеза эргостерина приводит к накоплению интермедиата метаболизма, который наравне с чужеродными соединениями способен индуцировать гены ABC-переносчиков. При этом делеция гена стерин C-5 десатуразы Erg3p, наоборот, препятствует накоплению этого интермедиата. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 18-14-00151.*

ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ МЕЖДУ РЕДОКС КОМПОНЕНТАМИ ЭНЕРГОПРЕОБРАЗУЮЩИХ NADH:ХИНОН ОКСИДОРЕДУКАЗ

Г.В. Гладышев, А.Д. Виноградов
МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биохимии, Москва, Россия

Митохондриальный Комплекс I и гомологичные NADH:хинон-редуктазы 1 типа (NDH-1) бактерий катализируют окисление NADH хинонами, сопряженное с векторной транслокацией 4 протонов через сопрягающую мембрану. Комплекс I содержит прочно связанный FMN, 7-8 железо-серных кластеров и связанный хинон. Механизм сопряжения транспорта электронов и векторной транслокации протонов неизвестен и является одной из главных нерешенных проблем современной биоэнергетики. Стехиометрия суммарной реакции $NADH + H^+ + Q + 4H+in <-> NAD^+ + QH_2 + 4H^{+out}$ исключает транслокацию протонов единственной петлей Митчела. Все опубликованные гипотетические модели рассматривают перенос электронов от железо-серного кластера N2 хинон как наиболее вероятное «место» сопряжения. Недавно мы показали АТР-зависимый сукцинат-поддерживаемый обратный перенос электронов на искусственный акцептор электронов гексаамминорутений (III) (HAR) Комплексом I в составе субмитохондриальных частиц (СМЧ) сердца быка. Оказалось, что этот путь нечувствителен к ингибированию NADH-связывающего центра фермента специфическим ингибитором – NADH-OH. Ранее мы показали, что NADH:HAR-редуктазная активность митохондриального, но не прокариотического (P.denitrificans), фермента аллостерически стимулируется АТР. Разумно было подтвердить или опровергнуть феномен нечувствительного к NADH-OH АТР-зависимого сукцинат-поддерживаемого восстановления HAR на NDH-1 в составе вывернутых плазматических везикул *P. denitrificans* (СБЧ), т.к. для этого препарата отсутствуют аллостерические эффекты АТР. В настоящей работе мы показали, что 1) NADH:HAR-редуктазные активности СМЧ и СБЧ характеризуются различающейся немихаэлисовской кинетикой, которую можно объяснить существованием двух различных центров и/или механизмов восстановления этого акцептора. 2) Комплекс I и NDH-1 отличаются по параметрам взаимодействия NADH-связывающего центра с NADH-OH. 3) Блокирование NADH-связывающего центра NDH-1 этим ингибитором не препятствует энергозависимому восстановлению HAR. Таким образом, предложенная нами модель обратного переноса электронов от QH2 на HAR экспериментально подтверждена для первого пункта сопряжения дыхательной цепи прокариот. *Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00706.*

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ПАССАЖНОЙ ИСТОРИИ

Д.Р. Ермолаева[1], Н.В. Шилова[2,3], Г.П. Вознова[2], А.Б. Комиссаров[4], А.А. Егорова[4], Н.В. Бовин[2]
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [3]ООО «Семиотик», Москва; [4] НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Важным элементом адаптации вируса гриппа (ВГ) к новому хозяину является подстраивание углевод-связывающего белка гемагглютинина (НА) под новые рецепторы. Известно, что НА вирусов птиц предпочтительно связывается с α2-3-связанными сиаловыми кислотами. При переходе к человеку, НА изменяет специфичность на α2-6. Чтобы вовремя отслеживать мутации птичьего гриппа, необходимо контролировать специфичность гемагглютинина ВГ, а также выявлять его наиболее аффинные лиганды. Классические методы исследования специфичности НА не позволяют проводить анализ на нативном материале, поэтому неотъемлемой частью работы является наращивание вирусной массы с использованием куриных эмбрионов (пассажи).

С помощью нового, чувствительного инструмента – гликочипа, содержащего более 400 гликанов, был исследован профиль специфичности НА вируса серебристой чайки H6N1 (Сарма/51с/2006г) до и после дополнительного пассажа на куриных эмбрионах. Детекцию вируса, связавшегося с лигандами чипа, осуществляли с помощью полиакриламидных конъюгатов, несущих 3'- или 6'-N-ацетилсиалиллактозамин и биотин для последующей визуализации результатов. Была подтверждена обнаруженная ранее в НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева двойственная специфичность НА вируса H6N1 по отношению и к α2-3 и к α2-6-связанной Neu5Ac, а также было установлено, что после одного дополнительного пассажа вируса H6N1 на куриных эмбрионах профиль связывания НА принципиально изменился: активность к «человеческим» α2-6-сиалилированным гликанам значительно снизилась, а к «птичьим» α2-3-сиалоздам возросла; исчезло взаимодействие с несиалилированным дисахаридом GalNAcβ1-3Galβ, при этом появилось значимое связывание с рядом сульфатированных гликанов, в частности, 4,6-O-Su_2-GalNAcβ1-4-(3-O-Ac)GlcNAcβ, 6-O-Su-Galβ1-3(6-O-Su)GlcNAcβ и 3-O-Su-GalNAcβ. С помощью гликочипа также были обнаружены другие, ранее не описанные для данного вируса лиганды, например, Neu5Gcα2-3-и Neu5Acα2-8-терминированные гликаны, активность по отношению к которым также значительно снизилась.

Таким образом, было показано, что даже один пассаж на куриных эмбрионах способен в значительной степени изменять рецепторную специфичность НА вируса гриппа, что может исказить реальное представление о его потенциальной патогенности и механизмах адаптации.

ПОИСК И ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ HIV-1 И HTLV-1 С ПОМОЩЬЮ БИБЛИОТЕКИ НОКАУТОВ GECKO И МЕТОДА НОКАУТИРОВАНИЯ SORTS

А.А. Зотова[1,2,3], Д.С. Комков[1], А.В. Филатов[2,3], Д.В. Мазуров[1,3]
[1]Институт биологии гена РАН, Группа клеточных и генных технологий; [2]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Вирус иммунодефицита человека (HIV-1) и Т-лимфотропный вирус человека первого типа (HTLV-1) являются патогенными для человека. Несмотря на то, что HIV-1 и HTLV-1 относятся к одному и тому же семейству РНК-содержащих ретровирусов и заражают преимущественно CD4 Т-лимфоциты, инфицирование приводит к развитию различных иммунопатологических процессов. HIV-1 снижает число CD4 Т-клеток, что является причиной синдрома приобретенного иммунодефицита человека (СПИДа). HTLV-1, напротив, после долгого латентного периода вызывает бесконтрольную пролиферацию зараженных Т-лимфоцитов и развитие острого Т-клеточного лейкоза с неблагоприятным прогнозом. Репликация обоих ретровирусов зависит от множества клеточных белков, в совокупности называемых факторами репликации. С развитием технологии глубокого секвенирования и полногеномных скринингов стали появляться огромные массивы данных, полученные в результате siРНК-, shРНК- и CRISPR/Cas9-скринингов в целях обнаружения факторов репликации. Это позволяет открывать новые и интересные с клинической точки зрения белки, играющие роль в репликации ретровирусов. Нами был разработан метод поиска факторов репликации HIV-1 и HTLV-1 с помощью библиотеки нокаутов GeCKO на основе CRISPR/Cas9 технологии редактирования генома. Мы провели серию независимых скринингов библиотеки нокаутов GeCKO в тесте ретровирусной инфекции, в результате которых были обнаружены гены-кандидаты на факторы репликации HIV-1, такие как SGK1, HUWE1. Кроме того, выявлены потенциальные факторы репликации HTLV-1, среди которых особенный интерес вызывают гены семейства импортинов KPNA1, KPNA4, а также ген тетраспанина CD82. Для дальнейшего изучения кандидатных факторов репликации получали нокаутные клеточные линии. Нокаутирование по генам внутриклеточных белков, в том числе KPNA1 и KPNA4, проводили новым методом SORTS (Surface Oligopeptide knock-in system for Rapid Target Selection) (A. Zotova et al. 2019). Метод позволяет с помощью клеточного сортера проводить быструю селекцию пула клеток, в которых произошел нокаут по генам, кодирующим внутриклеточные или секретируемые белки. На полученных нокаутных клетках планируется изучить роль данных потенциальных факторов репликации в ряде инфекционных тестов HIV-1 и HTLV-1. *Исследование поддержано грантом РФФИ №18-34-00712.*

ВЫЯВЛЕНИЕ ФУНКЦИЙ РИБОСОМНОГО БЕЛКА eL29 ЧЕЛОВЕКА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

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

Рибосомный белок eL29 человека – это структурный компонент большой (60S) субчастицы рибосомы, имеющий молекулярную массу 18 кДа и располагающийся на её поверхности. В отличие от многих рибосомных белков данный белок не является критически необходимым для процесса трансляции. Однако у мышей, нокаутных по гену *Rpl29*, наблюдали многочисленные серьезные отклонения в эмбриональном и постэмбриональном развитии [1], что позволяет ожидать у этого белка функций, связанных с регуляцией экспрессии специфических генов на уровне трансляции.

С использованием методов рибосомного профайлинга и количественной ПЦР мы показали, что понижение содержания рибосомного белка eL29 в клетках HEK293T приводит к изменению экспрессии ряда генов на уровне трансляции, не влияя при этом существенно на общую трансляционную активность клеток. В частности, при пониженном содержании eL29 уровни трансляции мРНК фосфоглицераткиназы 1 и мРНК рецепторного белка базигина снижаются почти в 2 раза, что свидетельствует о вовлечении данного белка в регуляцию экспрессии соответствующих генов, предположительно через взаимодействие с регуляторными элементами в их мРНК. С использованием метода PAR-CLIP (от англ. photoactivatable-ribonucleoside enhancing cross-linking and immunoprecipitation) [2] и основанной на клетках HEK293T линии, продуцирующей рибосомный белок eL29, содержащий FLAG-эпитоп на С-конце, выявлены мРНК-партнёры рибосомного белка eL29 и определены участки мРНК, контактирующие с данным белком. *Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00096 и частично Проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210022-4 и Проектом 5-100 Минобрнауки РФ.*

1. Oristian, D.S., Sloofman, L.G., Zhou, X. et al. Ribosomal protein L29/HIP deficiency delays osteogenesis and increases fragility of adult bone in mice // Mater. Sci., 2010, V. 27, N 1, P.28–35.
2. Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L. et al. Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP // Cell, 2010, V. 141, N 1, P.129–141.

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКА LPAP В TCR-АКТИВИРОВАННЫХ Т-КЛЕТКАХ ЗАВИСИТ ОТ PKC И ERK-КИНАЗ И ЯВЛЯЕТСЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫМ СИГНАЛЬНЫМ МЕХАНИЗМОМ

Н.А. Круглова[1,2], А.В. Филатов[1,2]
[1]ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России; [2]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Важнейшим участником антиген-специфической активации Т-лимфоцитов является тирозиновая фосфатаза CD45, детали функционирования которой не до конца поняты. Среди ее потенциальных регуляторов выделяется трансмембранный белок LPAP (Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein), образующий с CD45 прочный комплекс. LPAP не гомологичен ни

одному белку в протеоме человека, а его функция до сих пор неизвестна. Три линии мышей с нокаутом по LPAP демонстрируют различный фенотип. Имеются также единичные данные о роли этого белка в активации Т-клеток и развитии В-клеток. Мы предположили, что белок LPAP является звеном сигнального пути лимфоцитов и изучение фосфорилирования этого белка поможет пролить свет на его функцию.

Ранее мы идентифицировали четыре сайта фосфорилирования LPAP и охарактеризовали его индивидуальные фосфоформы. Однако было неизвестно, под действием каких стимулов и с участием каких ферментов это фосфорилирование происходит. Чтобы это выяснить, мы активировали Т-клетки с помощью серии стимулов и определили, что под действием PMA и антитела против антиген-специфического рецептора (TCR) происходило фосфорилирование LPAP по Ser-163 и дефосфорилирование по Ser-99 и Ser-172. Эти изменения наблюдались уже на 5 мин стимуляции и при действии через TCR возвращались к исходному состоянию через 2 ч, а в случае PMA носили стойкий характер. Чтобы определить ферменты, ответственные за эти события, было протестировано 27 ингибиторов различных киназ и фосфатаз. Результаты свидетельствуют о том, что фосфорилирование LPAP по Ser-163 зависит от активности новых изоформ PKC и киназы ERK1/2. Анализ аминокислотного мотива, в котором расположен сайт Ser-163, и сопоставление его с данными по мотивам киназы ERK1/2 и ее киназ-мишеней указывали на, что именно ERK1/2 участвует в фосфорилировании LPAP по Ser-163. Результаты *in vitro* киназного теста подтвердили, что киназа ERK1 вносит основной вклад в это событие. Мы также показали, что в отсутствие LPAP уровень CD45 падает на 75%, а в серии клонов с различным количеством LPAP наблюдается корреляция между экспрессией LPAP и CD45. Полученные данные позволяют предположить, что фосфорилирование LPAP по Ser-163 может являться регуляторным событием Т-клеточного сигнального каскада. *Исследование поддержано грантом РФФИ №18-34-00705.*

МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРАНСМЕМБРАННОГО СЕГМЕНТА НЕЙРАМИНИДАЗЫ-1 С ПЕРСПЕКТИВНЫМ ПЕПТИДНЫМ ПЕРЕХВАТЧИКОМ

А.С. Кузнецов[1,2,3], А. Биннасроун[4], П. Морис[4], Р.Г. Ефремов[1,2,3]
[1]НИУ «Высшая школа экономики»; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [3]Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Москва, Россия; [4]Университет Реймса Шампань-Арденны URCA, Франция

Нейраминидаза-1 (NEU1) – фермент, катализирующий отщепление терминальных остатков сиаловых кислот от олигосахаридов. В клетках человека NEU1 представлена в двух формах: лизосомальной и мембраносвязанной. Структурные особенности последней и её функция в составе комплекса рецептора эластина (ERC) не до конца ясны [1]. Доказано, что в мембране происходит димеризация NEU1, а мутации в последовательности второго трансмембранного домена (TM2) NEU1 снижают ферментативную активность. Это позволяет полагать, что димеризация TM2 является функционально важной для работы ERC [2]. Аномальная активность NEU1 зафиксирована при развитии атеросклероза. В соответствии с современными подходами, для воздействия на NEU1 в мембране предложено создать пептид-перехватчик [3]. Целью настоящей работы было сравнение структурно-динамических параметров фрагмента исходного TM2 NEU1 (E312-A336, NEU1-wt) и мутантной формы (NEU1-RKR) в вычислительном эксперименте. Применяли метод молекулярной динамики (МД) в явно заданной липидной мембране из пальмитоилолеилфосфатидилхолина. Мономеры и димеры [2] встраивали в липидный бислой, проводили минимизацию энергии, релаксацию системы и расчёт траекторий МД длиной 200 нс. Оценивали стабильность конформации пептидов, рассчитывали геометрические параметры и белок-белковые и белок-липидные водородные связи. Свободную энергию димеризации оценивали с применением метода «зонтичной выборки». Пептиды показали высокую степень конформационной стабильности в трансмембранной ориентации, структуры гомо- и гетеродимеров были близки. В то же время, угол наклона пептида NEU1-RKR был меньше, а формируемый им димер обладал большей степенью симметрии. Наибольшее число водородных связей белок-белок наблюдали в структуре гетеродимера. Наблюдали увеличение числа белок-липидных водородных связей в случае NEU1-RKR. Димеры, включающие мутантный пептид, были стабильнее димера NEU1-wt по результатам оценки свободной энергии ассоциации, при этом мутантный гомодимер и гетеродимер статистически неразличимы. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 18-54-15007).*

1. Duca L, et al. (2007) J. Biol. Chem. V. 282. No. 8. P. 12484-12491.
2. Maurice, P., et. al. (2016) Sci. Rep. V. 6. P. 38363.
3. Bublil, E.M., et. al. (2016) Biochemistry V. 55. No. 39. P. 5520-5530.

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

П.В. Скворцова, Е.А. Ермакова, Ю.Ф. Зуев
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

Одним из направлений развития современной медицины и фармакологии является рациональное использование природных факторов и соединений. Большим потенциалом в борьбе с устойчивыми к антибиотикам микроорганизмам обладают антимикробные пептиды (АМП). Большинство АМП воздействуют на мембраны микроорганизмов, нарушая их молекулярную упаковку и участвуя в образовании пор, что, в свою очередь, приводит к лизису клеток и к гибели микроорганизма. В качестве представителей АМП были выбраны два антимикробных пептида: мелиттин и мегин. Мелиттин, токсический компонент пчелиного яда, состоит из 26 аминокислотных остатков GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ и образует альфа спираль при взаимодействии с мембранами. Мелиттин часто используется в качестве модельного пептида для мониторинга липид-белковых взаимодействий в мембранах. Мегин, выделенный из кожи азиатской лягушки, имеет аминокислотную последовательность FLKGCWTKWYSLKPKCPF и также проявляет антимикробную активность. Пространственная структура мегина не известна и одной из задач данного проекта является расшифровка его пространственной структуры методом ЯМР высокого разрешения. В качестве модельной среды, имитирующей биомембраны, выбрана обращенная микроэмульсия (раствор обратных мицелл в

органической фазе) на основе анионного поверхностно-активного вещества (ПАВ) бис-2этилгексил-сульфосукцината натрия (АОТ). Основной задачей работы было исследование структуры и состояния границы раздела водной и органической фазы под влиянием мембранотропного мелиттина. Методами ЯМР-диффузометрии и кондуктометрии исследована реакция обращенных микроэмульсий на взаимодействие с исследуемыми АМП. Методы полноатомной и крупнозернистой молекулярной динамики применены для изучения механизмов взаимодействия АМП с модельными мембранами. Структура АМП контролировалась методами спектроскопии кругового дихроизма и флуориметрии. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и Правительства Республики Татарстан №18-44-160013.*

ERBB2-СПЕЦИФИЧНЫЙ БЕЛОК DARPin 9.29 ПОКАЗАЛ НИЗКУЮ СИСТЕМНУЮ ТОКСИЧНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ

О.Н. Шилова, Д.В. Киселева, С.М. Деев
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

«Золотым стандартом» препаратов для таргетной терапии рака являются гуманизированные моноклональные антитела, однако сейчас разрабатывается все больше альтернативных молекул, специфически связывающихся с онкомаркерами. Примером таких модулей являются дарпины – искусственные мономерные белки без дисульфидных связей на основе анкириновых повторов, обладающие по сравнению с антителами меньшим размером и большей химической стабильностью, позволяющей использовать их в конъюгированных препаратах и получать дарпины и рекомбинанатные белки на их основе в гетерологических системах экспрессии. Адресный модуль DARPin 9.29 был использован для создания противораковых белков, содержащих фрагменты экзотоксина A Pseudomonas aeruginosa: PE40, не имеющий первого домена, определяющего природную специфичность токсина, и LoPE, еще более миниатюризованный вариант с удаленными или мутированными иммунодоминантными эпитопами. Неспецифическая токсичность и иммуногенность белков DARPin, DARPin-LoPE и DARPin-PE40 были исследованы на здоровых иммунокомпетентных мышах линии BALB/c. Белки вводили внутривенно в количествах, подавлявших рост опухоли в ксенографтной модели рака молочной железы. Поскольку высокая иммуногенность белков бактериального происхождения ограничивает повторное применение таких препаратов, токсичность и иммуногенность белков оценивали после двух курсов инъекций. DARPin-PE40 показал более выраженную неспецифическую токсичность по сравнению с DARPin-LoPE, она проявилась в снижении веса тела мышей, более выраженной нефротоксичности и повышенной проницаемости кровеносных сосудов легких. При этом мыши, получавшие инъекции DARPin, не развили упомянутых патологий. Ко всем исследованным белкам вырабатывались антитела, наибольший их титр и самый долговременный иммунный ответ наблюдались в случае DARPin-PE40. Самый низкий титр антител наблюдался в группе мышей, получавших DARPin, что указывает на малый вклад модуля DARPin в иммуногенность исследованных адресных токсинов. Таким образом, белок DARPin 9.29 является перспективным компонентом для создания адресных противораковых агентов, поскольку сам по себе в терапевтических дозах не показал неспецифической токсичности и высокой иммуногенности. *Работа поддержана грантом РНФ №19-14-00112.*

МЕХАНИЗМ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛУТАМАТА В ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ, ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

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

Эксайтотоксичность, вызываемая гиперактивацией глутаматных рецепторов, рассматривается как одна из основных причин гибели нейронов при Болезни Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваниях. Моделирование данного процесса *in vitro* с использованием нейронов человека, получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК-нейронов) раскрывает уникальные возможности для поиска новых лекарственных средств. Однако процесс созревания ИПСК-нейронов, требует длительного культивирования *in vitro* и, по данным разных авторов, занимает от 30 до 90 дней, что осложняет эффективное применение данной модели. Ранее мы показали, что функциональные NMDA рецепторы экспрессируются уже на 14 день терминальной дифференцировки дофаминергических (ДА) ИПСК-нейронов, и аппликация высоких концентраций глутамата вызывает гибель субпопуляции клеток в данных культурах. В настоящей работе мы исследовали механизм токсического действия глутамата в ДА ИПСК-нейронах. Измерение внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]i$) с помощью флуоресцентного индикатора Fluo-4 показало, что в этих клетках увеличение $[Ca^{2+}]i$ при пролонгированной аппликации высоких доз (200–500 мкМ) глутамата носит транзиторный характер, не приводя к нарушению кальциевого гомеостаза. Используя метод TUNEL, мы установили, что культивирование в присутствии антагониста NMDA рецепторов МК-801 не предотвращало глутамат-индуцированную гибель изучаемых клеток. Таким образом, токсичность глутамата в ДА ИПСК-нейронах на данной стадии дифференцировки не связана с гиперактивацией NMDA рецепторов, и реализуется через другие механизмы. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 17-04-01661) и программы ФИМТ.*

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВО УЧАСТИЯ АНТИТЕЛ К ПОРИНАМ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* В РАЗВИТИИ ТИРЕОТОКСИКОЗА

О.Ю. Портнягина, Е.А. Зелепуга, В.А. Хоменко, О.Д. Новикова
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова, Владивосток, Россия

Острые инфекционные заболевания, возбудителями которых являются бактерии рода Yersinia (*Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*), относятся к тем инфекциям, которые могут служить причиной развития аутоиммунных патологий щитовидной железы (ЩЖ) у человека, в том числе болезни Грейвса (БГ). На модели *in vivo* была продемонстрирована способность антител к OmpF и OmpC поринам *Y. pseudotuberculosis* (YpOmpF и YpOmpC) инициировать усиленный синтез тироксина

(Т4) у экспериментальных животных. В результате иммунизации мышей белками были получены специфические сыворотки с высоким титром (4,7 -lg). По сравнению с контролем в сыворотках крови иммунных животных существенно повышался уровень Т4: в 5.47 раз и 22.3 раза для YpOmpF и YpOmpC соответственно. К заметному усилению синтеза Т4 приводила также иммунизация мышей кроличьими антителами к поринам. С помощью теоретических моделей было установлено структурное подобие антигенных эпитопов YpOmpF и TSHRh, выявленное методами ИФА и иммуноблоттинга и определяющее их перекрестное взаимодействие как антигенов. Анализ физико-химических свойств поверхности YpOmpF показал наличие локальных областей, сходных по свойствам таковых рецептора и комплементарных паратопам стимулирующих аутоантител к TSHRh (TSAb, M22 Pdb ID 3g04). Методом молекулярного докинга были построены модели пространственных структур комплексов мономера и тримера YpOmpF с TSAb. Сравнение расчетных данных по взаимодействию TSAb с порином показало, что величина энергии комплексообразования для мономера YpOmpF больше, чем для триммера белка. Кроме того, мономер YpOmpF может свободно взаимодействовать с TSAb, а при образовании тримера белка гидрофобная область в зоне взаимодействия с антителом закрывается. Таким образом, показано, что антитела к поринам, иммунодоминантным белкам наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*, способны, подобно стимулирующим аутоантителам к TSHRh, взаимодействовать с рецептором, вызывая гиперстимуляцию секреторных клеток ЩЖ и усиливая синтез тироксина (Т4). На примере БГ получено экспериментальное и теоретическое подтверждение того, что развитие аутоиммунных патологий может быть следствием перенесенной бактериальной инфекции за счет молекулярной мимикрии между антигенами бактерий и тканей человека. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ДВО РАН (Дальний Восток) № 18-5-043.*

ВЛИЯНИЕ OmpF ПОРИНА YERSINIA PSEUDOTUBERCUILOSIS НА ИНТЕРФАЗУ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

О.Ю. Портнягина, С. Кузьмич, В.А. Хоменко, М.П. Исаева, Л.С.Шевченко, О.Д. Новикова
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова, Владивосток, Россия

Бактериальные белки и пептиды относятся к веществам, обладающим выраженной антипролиферативной активностью. В настоящее время получены данные о противоопухолевом действии целого ряда белков микробного происхождения, таких как антибиотики, бактериоцины, ферменты, токсины, азурин. Об антиопухолевой активности поринов наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий практически ничего не известно. OmpF порин *Yersinia pseudotuberculosis* (YpOmpF) является иммунодоминантным белком НМ. Как и другие бактериальные порины, он обладает широким спектром биологической активности. Ранее мы показали, что YpOmpF проявляет токсичность в отношении клеток моноцитарного лейкоза человека (THP-1) (IC50=5,14 мМ). При оценке влияния YpOmpF на клеточный цикл THP-1 методом цитометрии установлено, что нативный YpOmpF изменяет соотношение клеток, находящихся на разных стадиях интерфазы клеточного цикла. В присутствии порина увеличивается число клеток в фазе синтеза ДНК (S), с 49 % до 70 %, полностью исчезают клетки в фазе подготовки к митозу (G2) и появляется небольшой процент апоптотических клеток. Далее в эксперименте были использованы рекомбинантные порины: полноструктурный (rYpOmpF) и мутантные с делециями некоторых наружных петель (ΔL1, ΔL4, ΔL6, ΔL8). Показано, что при инкубации THP-1 с rYpOmpF и мутантами, соотношение клеток на разных стадиях интерфазы тоже меняется, однако эти изменения не так выражены, как в случае с нативным YpOmpF. Интересно, то, что все рекомбинантные белки, кроме ΔL6 тормозят переход клеток из фазы покоя (G0) в фазу начального роста (G1) и вызывают появление клеток в состоянии апоптоза. Отличительным признаком опухолевых клеток является их способность образовывать колонии в мягком агаре. Мы оценили влияние рекомбинантных белков на колониеобразование клеток карциномы толстой кишки (HCT 116). Оказалось, что rYpOmpF и мутанты ΔL1, ΔL4 и ΔL8 тормозят рост опухолевых клеток, в отличие от ΔL6, который не ингибирует, а даже стимулирует образование новых колоний. Таким образом, установлено, что OmpF порин *Y. pseudotuberculosis* модулирует клеточный цикл, инициирует апоптоз и тормозит рост некоторых линий опухолевых клеток. Предполагается, что во взаимодействии с клеточными рецепторами, через которые запускаются эти процессы, участвует наружная петля L6 YpOmpF.

СРАВНЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК CBS-ПИРОФОСФАТАЗ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ, В ТОМ ЧИСЛЕ ИЗ ПАТОГЕНОВ. ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

Л.А. Дадинова[1], Е.Ю. Сошинская[1], В.А. Анашкин[2], И.Д. Дельцов3, Э.В. Штыкова[1,4]
[1]ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [4]Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

Неорганические пирофосфатазы (PPase) семейства II структурно разнообразны и интерес к ним 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. Регуляция CBS-PPase происходит по кооперативному механизму. Однако установление основных регулирующих механизмов взаимодействия между доменами представляет большую проблему, поскольку данные о структуре полноразмерного фермента отсутствуют. Методом малоуглового рентгеновского рассеяния совместно с эксклюзионной хроматографией (SEC-SAXS) нами были исследованы структуры белков CBS-PPase из *E. harbinense* и *E. lenta* (патоген, который находится в кишечном тракте человека). Мы обнаружили, что оба белка в растворе существуют в виде тетрамеров, однако способ формированиях их различен. Ранее нами было показано, что CBS-PPase из D. hafniense в растворе также формирует тетрамер. Механизм утилизации пирофосфата у *D. hafniense* и *E. lenta* происходит схожим образом, при этом CBS-PPase из *D. hafniense* содержит DRTTG домен, а у CBS-PPase из *E. lenta* он отсутствует. CBS-PPase из *E. harbinense* содержит несколько мутаций в регуляторной и каталитической частях и в отличие от CBS-PPase из

E. lenta не имеет кинетической кооперативности. 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. Сравнение структурных характеристик CBS-PPase из разных источников, в том числе из патогенов, необходимо для выявления особенностей функционирования белков, что в свою очередь может указать путь для разработки специфических антибактериальных препаратов. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00918, а также при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.*

ВЛИЯНИЕ ПОГОДНЫХ УСЛОВИЙ НА РНКазную АКТИВНОСТЬ СЕМЯН ДИКОРАСТУЩЕЙ СОИ

С.И. Лаврентьева[1,2,3], О.А. Терехова[1,2], К.С. Голохваст[3]
[1]Благовещенский государственный педагогический университет, Благовещенск;[2]Всероссийский научно-исследовательский институт сои, Благовещенск; [3]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Внутривидовое разнообразие отражает взаимодействие между генетическим потенциалом вида и факторами окружающей среды. На современном этапе в успешной реализации селекционных программ большое значение имеет идентификация генотипов. Наиболее удобными для описания генотипов являются генетические маркеры. Рибонуклеазы (КФ 3.1) − ферменты класса гидролаз, играющие ключевую роль в метаболизме РНК, участвующие в контроле экспрессии генов, иммунной защите и индукции апоптоза. Цель работы – сравнить удельную активность и множественные формы рибонуклеаз дикорастущей сои в зависимости от погодных условий. Материалом исследования служили линии дикорастущей сои (Glycine soja Sieb. et Zucc.) из Южной Кореи и двух районов Амурской области. Выращивание сои осуществляли в поле с. Бугровое Тамбовского района Амурской области с мая по октябрь в 2016, 2017 и 2018 годах. Погодные условия по исследуемым годам изменялись по количеству осадков и сумме активных температур. В белковых экстрактах определяли белок методом Лоури, удельную активность РНКаз спектрофотометрическим методом, множественные формы фермента методом электрофореза. Математическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10. Показано, что в благоприятный по климату, 2016 год, число множественных форм РНКаз в исследуемых линиях оставалось стабильным (4). Однако удельная активность фермента была максимальна, за исключением, установленной в семенах линии с. Усть-Ивановка. В сложный 2017 год, удельная активность РНКаз в линиях была отмечена невысокая, причем в корейской линии установлено минимальное значение по всем исследуемым годам, но повышение числа множественных форм фермента, по-видимому, компенсировало данный факт. В 2018 году, число множественных форм рибонуклеаз исследуемых линий дикорастущей сои возросло, а удельная активность фермента повысилась только в линии с. Усть-Ивановка до максимума за исследуемых 3 года. Таким образом, показана зависимость рибонуклеазной активности дикорастущей сои от погодных условий. Установлено, что повышение рибонуклеазной активности прослеживается в семенах дикорастущей сои, если климатические показатели находятся в зоне оптимума растения.

БЕЛОК ДРОЖЖЕЙ Upf1, УЧАСТВУЮЩИЙ В НОНСЕНС-ОПОСРЕДОВАННОЙ ДЕГРАДАЦИИ МАТРИЧНОЙ РНК, МОЖЕТ ЯВЛЯТЬСЯ ФАКТОРОМ ДЕТОКСИФИКАЦИИ ПРИОНА [PSI+]

О.В. Митькевич, А.А. Дергалев, В.Н. Ураков
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Терминация трансляции у эукариот контролируется взаимодействием белков eRF1 и eRF3 (известных соответственно как Sup45 и Sup35 в дрожжах). Ранее мы показали, что белок дрожжей Pub1, участвующий в образовании стресс гранул, регуляции экспрессии генов и организации тубулинового цитоскелета, также участвует в терминации трансляции. Мы показали также, что этот белок влияет на [PSI+], прионную форму белка Sup35. Делеция гена PUB1 (Δpub1) приводила примерно к 2-кратному увеличению количества прионных полимеров Sup35 в клетках, содержащих [PSI+]. Мы обнаружили, что одновременная делеция гена PUB1 и гена UPF1, кодирующего белок, участвующий как в нонсенс-опосредованной деградации матричной РНК так и в терминации трансляции, в клетках [PSI+] pub1-Δ upf1-Δ приводит к синтетической летальности. Оказалось, что делеции других генов семейства UPF (UPF2 и UPF3) одновременно с делецией PUB1 не приводили к синтетической летальности. Делеции всех трех генов семейства UPF не оказывали никакого влияния на экспрессию белков Sup35 и Sup45, а также на количество полимеров Sup35 в клетках [PSI+]. Мы показали, что сверхпродукция белков Upf1, Pub1, Pub1ΔC, Sup45 и Sup35C спасает [PSI+] pub1-Δ upf1-Δ клетки от синтетической летальности. Поскольку делеция UPF1 не приводила к уменьшению растворимого Sup35 (количество его полимеров не увеличивалось), то мы проверили влияние делеции этого гена на количество жизненно важного белка Sup45 в растворе. Оказалось, что в отсутствие белка Upf1 количество Sup45, связанного с прионными полимерами Sup35, возрастает почти в полтора раза. Поскольку количество полимеров Sup35 при делеции PUB1 увеличивается в 2 раза, то при одновременной делеции UPF1 количество растворимого (а значит функционально активного) Sup45 уменьшается почти в 3 раза, что уже становится летальным для клеток дрожжей. Таким образом, мы показали, что белок Upf1 так же, как и белок Pub1, является одним из важных факторов, снижающих токсичность [PSI+] приона в клетках дрожжей. *Работа была поддержана грантом РФФИ # 17-04-00032.*

РОЛЬ udTRF2-ЛИНКЕРНОЙ ОБЛАСТИ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ТЕЛОМЕР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА TRF2 С ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНОЙ

А.О.Травина[1], Н.В.Ильичева[1], А.П.Воронин[1], О.И.Подгорная[1,2,3]
[1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; [2]Санкт-Петербургкий государственный университет, Санкт-Петербург; [3]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Теломеры представляют собой ДНК-белковые комплексы на концах хромосом эукариот. Теломер-связывающие белки TRF1 и TRF2 возникли в результате дупликации генов и имеют сходную доменную структуру. В состав TRF2 входит плохо

охарактеризованный регион udTRF2, который отсутствует у TRF1. Гомология аминокислотной последовательности udTRF2 с rod-доменами ламинов указывает, что регион может быть вовлечен во взаимодействие теломер с ядерной мембраной. Мутации в гене LMNA, кодирующем белок ядерной мембраны ламин А, вызывают различные генетические заболевания, в том числе прогерию Хатчинсона-Гилфорда (HGPS). В клетках больных HGPS наблюдаются нарушения структуры ядерной мембраны, укорачивание теломер, сниженная пролиферативная активность. TRF2 взаимодействует с ламином А, но не с его мутантной формой, прогерином. Возможно, именно нарушение взаимодействия между ламином А и TRF2 приводит к неустойчивости теломер, наблюдаемой при HGPS. Прогерин вырабатывается и в стареющих клетках здоровых людей, что позволяет предположить, что в основе прогерии и естественного старения могут лежать сходные молекулярно-биологические механизмы. Ядерный экстракт и экстракт ядерной ламины получали из ядер клеток печени и селезенки мыши. Обнаружено, что часть TRF2 не высвобождается при обработке ядерного лизата ДНКазой и высоким солевым буфером, а совместно фракционируется с ядерным матриксом. Полипептид, соответствующий udTRF2, экспрессировали в *E. coli* RosettaBlue (DE3)-pET32a-udTRF2 и очищали с помощью осаждения сульфатом аммония и ионообменной хроматографии. Поликлональные антитела к udTRF2 получены иммунизацией морских свинок. Методом ко-иммунопреципитации рекомбинантного полипептида udTRF2 с экстрактом ядерной ламины показано, что udTRF2 связывается с белками ядерной ламины *in vitro*. Для определения других интерактантов проводили ко-иммунопреципитацию рекомбинантного udTRF2 с ядерным экстрактом. В качестве контроля неспецифического связывания антитела, иммобилизованные на сефарозе, инкубировали с ядерным экстрактом. Детекцию связавшихся белков планируется проводить с помощью масс-спектрометрии. Для исследования функционального значения udTRF2 *in vivo* с помощью сайтспецифического мутагенеза получен ген TRF2ΔL, кодирующий белок TRF2 с делецией udTRF2. *Работа поддержана грантом РФФИ 19-34-80032*

РОЛЬ ТЕТРАПЕПТИДА GEKG В ПОЛОЖЕНИЯХ 60-63 БЕЛКА US3 МАЛОЙ СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА В ЕЁ БИОГЕНЕЗЕ И ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Е.С. Бабайлова[1], А.А. Малыгин[1,2], А.В. Гопаненко[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

Консервативный рибосомный белок uS3 содержит декапептидный фрагмент в положениях 55-64 (нумерация по uS3 человека), который имеет уникальную способность сшиваться с различными производными РНК, содержащими альдегидные группы, когда uS3 находится в составе 80S рибосомы или её малой (40S) субчастицы. За эту способность отвечает единственный остаток лизина в положении 62 (K62) в данном фрагменте, алифатическая аминогруппа которого может образовывать сшивки с альдегидами посредством основания Шиффа. Было показано, что при трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе uS3 становится способным к сшиванию с альдегид-содержащими РНК только после того, как фактор инициации eIF3j покидает мРНК-связывающий канал 40S рибосомной субчастицы. Мы изучили функциональную роль K62 и его ближайших соседей в сборке 40S субчастицы и в трансляции с использованием полученных на основе клеток HEK293T культур, способных продуцировать FLAG-меченый белок uS3 или его мутантную форму, где аминокислотные остатки в положениях 60-63 замещены на аланины. Анализ содержания меченых белков в 40S субчастицах, 80S рибосомах и полисомах из соответствующих цельноклеточных лизатов и их цитозольных фракций показал, что вышеуказанные замены существенно снижают способность uS3 участвовать в сборке 40S субчастиц, но не влияют на их созревание и связывание с мРНК при инициации трансляции. Наиболее драматический эффект эти замены оказывали на стадию образования 80S инициаторного комплекса. Установлено, что 48S предынициаторные комплексы, собранные с участием мутантного uS3, были неспособны к связыванию с 60S субчастицами. Таким образом, полученные результаты позволили выявить новую, ранее неизвестную роль тетрапептида 60-GEKG-63 белка uS3 в процессе трансляции, которая ассоциирована с поддержанием правильной структуры 48S комплекса, предотвращающим преждевременное связывания мРНК в канале 40S субчастицы. *Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00609 и частично Проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210022-4 и Проектом 5-100 Минобрнауки РФ.*

СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ «ЧЕРНОГО» И «СЕРОГО» КЛАСТЕРОВ В В-ПАРВАЛЬБУМИНЕ И БЕЛКЕ S100P

А.А. Вологжанникова, М.Е. Пермякова, П.А. Хорн, С.Е. Пермяков, А.С. Казаков, А.И. Денесюк, К.А. Денесюк, В.Н. Уверский, Е.А. Пермяков
ФИЦ Пущинский научный центр РАН, Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, Россия

Анализ трехмерных структур кальцийсвязывающих белков суперсемейства «EF-руки» позволил нам обнаружить два высоко консервативных структурных мотива, расположенных на противоположных концах центрального β-листового линкера, соединяющего два домена «EF-рука», каждый из которых представляет собой кластер из трех аминокислотных остатков. Кластер I («черный») состоит в основном из ароматических аминокислотных остатков, взаимодействующих друг с другом за счет слабых водородных связей. Кластер II («серый») более вариабельный и состоит из ароматических, гидрофобных, полярных аминокислот и, предположительно, определяет способность белка к кальций-индуцируемым перестройкам в структуре белка. Экспериментально и теоретически исследована роль кластеров в поддержании структуры двух кальцийсвязывающих белков, β-парвальбумине крысы (β-ПА) и белке S100P человека. Кластеры I и II в β-ПА состоят соответственно из аминокислотных остатков F48, A100, F103 и G61, L64, M87. В S100P кластеры I и II состоят из остатков F15, F71, F74 и L33, L58, K30. Мы последовательно замещали эти остатки на аланин. Физические свойства полученных мутантов были изучены с помощью спектральных, теплофизических и биохимических методов. Сродство белков к ионам Ca^{2+} и Mg^{2+} оценивали методами собственной

флуоресценции и равновесного диализа. Обнаружено, что замены в кластере I β-ПА вызывают существенные изменения структурных и конформационных свойств белка (гидродинамический радиус его апо-формы, тепловая стабильность Ca^{2+}/Mg^{2+}-насыщенных форм, и полная энергия связывания ионов Ca^{2+} по сравнению с изменениями, вызванными заменами в кластере II). Замены на Ala в кластерах I и II белка S100P вызывали сопоставимые изменения его вторичной структуры. Тем не менее, анализ устойчивости S100P и его кластерных мутантов к тепловой денатурации и к денатурации гуанидингидрохлоридом показал, что замены на Ala в кластере I вызывают более выраженное снижение стабильности белка по сравнению с изменениями, вызванными заменами в кластере II. Эти результаты были подтверждены данными компьютерного анализа предрасположенности этих двух белков к внутренней разупорядоченности. Показано, что локальная предрасположенность к разупорядоченности и общий уровень разупорядоченности β-ПА сильно зависят от мутаций в кластере I, в то время как мутации в кластере II оказывают гораздо меньшее влияние. Полученные результаты показывают, что аминокислотные остатки кластера I в β-ПА и S100P дают более существенный вклад в поддержание структурной целостности и функциональных свойств белка по сравнению с аминокислотными остатками кластера II.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПЕПТИДАЗЫ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ И ИХ ИНГИБИТОРЫ КАК ИНДИКАТОРЫ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ И ЗАЩИТНОГО ПОТЕНЦИАЛА

Я.Е.Дунаевский[1], В.И.Домаш[2], Н.А. Алкин[1], М.А.Белозерский[1]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ М.В, Ломоносова, Москва, Россия; [2]Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Интерес исследователей к секретируемым пептидазам грибов и их ингибиторам обусловлен несколькими причинами, в частности, участием в разнообразных формах патогенеза и все расширяющимся биотехнологическим использованием. Нами показано, что с одной стороны, уникальные свойства некоторых ингибиторов пептидаз могут быть использованы для избирательного ингибирования только ферментов, важных для роста и развития организмов. В противоположность этому, существует широкий спектр других ингибиторов, способных обеспечить более эффективную защиту растений от атаки фитопатогенов и насекомых-вредителей. Совокупность проанализированных данных указывает на то, что открытие грибных ингибиторов расширяет спектр известных уже ингибиторов пептидаз, которые потенциально могут быть использованы как в медицинской практике, так и для защиты сельскохозяйственных культур. Вместе с тем получены данные, указывающие на возможную связь внеклеточных пептидаз с таксономическим статусом и экологическими особенностями грибов. Сравнительный анализ спектров внеклеточных пептидаз, секретируемых грибами, показал, что виды базидиомицетов в большей степени секретируют ферменты класса металлопептидаз , тогда как виды аскомицетных грибов, наоборот, преимущественно секретировали сериновые пептидазы. Активность по некоторым субстратам, в частности, пролин-специфичных пептидаз совпадала с принадлежностью грибов к определенным таксономическим и трофическим группам. Виды грибов-патогенов в отличие от сапротрофов активно расщепляли субстрат, специфичный для трипсиноподобных пептидаз. Сапротрофные грибы, в свою очередь, обладали более высокой относительной активностью аминопептидаз, однако, следует отметить, что вклад этих ферментов в деградацию белковых субстратов зависел от состава микробного сообщества: он был большим у почвенных грибов, и практически незначительным у штаммов Leucoagaricus gongylophorus в системе «грибного сада». *Работа поддержана грантами РФФИ 18-04-00008 and 19-04-00852.*

НОВОЕ ПОДСЕМЕЙСТВО АТР-ЗАВИСИМЫХ Lon-ПРОТЕАЗ. LonBA-ПРОТЕАЗА *BACILLUS SUBTILIS*

А.М. Куджаев, О.В. Карцева, В.А. Абрикосова, А.Г. Андрианова, Т.В. Ротанова
Институт биоорганической химии им. Ю.А. Овчинникова и М.М. Шемякина РАН, Москва, Россия

АТР-зависимые Lon-протеазы – высокоселективные бифункциональные ферменты системы контроля качества клеточного протеома, деградирующие мутантные, поврежденные и короткоживущие регуляторные белки. Lon-протеазы относятся к суперсемейству AAA+-белков и обнаруживаются во всех царствах живой природы. Субъединицы ферментов включают центральный АТР-азный модуль (AM), С-концевой протеолитический домен (PD), представленный серин-лизиновой пептидгидролазой, и некаталитический экстрадомен (ED), локализованный либо в N-концевой области либо внутри АТР-азного модуля. На основании различий окружения каталитически активных остатков пептидазных центров и архитектуры АТР-азных модулей в семействе Lon-протеаз выделено три подсемейства: А (ферменты прокариот и эукариот), В (ферменты архей) и С (ферменты бактерий). В последнее время, согласно классификации MEROPS, в подсемейство LonB-протеаз были включены ферменты неархейного происхождения, обнаруженные исключительно в бактериях отдела фирмикут. Сравнительным анализом первичных структур установлено, что новая группа ферментов подобна как протеазам LonB (по AM и ED), так и протеазам LonA (по PD). Тем самым выявлено новое подсемейство «гибридных» LonBA-протеаз. LonBA-протеаза *Bacillus subtilis* (BsLonBA) клонирована в клетках E. coli. Проведена оптимизация экспрессии и выделения фермента; обнаружена склонность BsLonBA к агрегации. Показано, что в отсутствие детергента (н-додецил-β-D-мальтопиранозид, DDM) BsLonBA представлена высокомолекулярными ассоциатами, которые диссоциируют до моно- и димеров в присутствии DDM. С помощью ограниченного протеолиза химотрипсином продемонстрировано, что субъединица BsLonBA сформирована устойчивыми доменами. Изучена пептидазная и АТР-азная активность фермента. Направленным мутагенезом доказана принадлежность BsLonBA к классу сериновых пептидгидролаз. Исследовано действие эффекторов LonA-протеаз и DDM на пептидазную функцию BsLonBA. Отсутствие аллостерического влияния нуклеотидов на энзиматические свойства BsLonBA может указывать на нарушения в системе сопряжения функционирования активных центров фермента. *Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00646.*

АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА, СОДЕРЖАЩИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ

Л.Е. Леонова, Т.В. Гришина, Е.В. Романовская, Е.В. Цветкова
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Молоко является не только уникальным и универсальным источником необходимых питательных веществ для новорожденных, но и содержит целый ряд биологически активных компонентов, необходимых для защиты, роста и развития организма. Некоторые функционально значимые белки и пептиды молока способны сохранять биологическую активность даже в агрессивной среде желудочно-кишечного тракта за счет образования высокомолекулярных белковых комплексов, способных обеспечивать защиту биологически-активных компонентов от протеолиза с сохранением биологических свойств. Целью работы было изучение биологически активных белков и пептидов, входящих в состав высокомолекулярных комплексов молока и сыворотки молока человека. В работе использовали препараты молока человека, сыворотки молока и высокомолекулярных фракций (более 50 кДа) сыворотки и экстрактов молока человека соляной и уксусной кислотами при pH 3, полученные методом ультрафильтрации. Исследуемые препараты охарактеризованы рядом электрофоретических методов в денатурирующих и не денатурирующих условиях в щелочной и в кислой среде, методом двумерного электрофореза, а также в нейтральной среде методом горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле для нативных белков с различным зарядом. В анализируемых образцах и основных хроматографических фракциях, полученных с помощью ОФ ВЭЖХ выявили отдельные биологически активные белки и пептиды (дефенсины нейтрофилов человека HNP 1-3 и HNP 4, лактоферрин, лактопероксидазу и миелопероксидазу) методами иммуноблоттинга и дот-иммуноферментного анализа. Показано, что высокомолекулярные и низкоподвижные белки, такие как лактоферрин, лактопероксидаза и миелопероксидаза, и низкомолекулярные пептиды с большей электрофоретической подвижностью - HNP 1-3 и 4, - выявляются в составе высокомолекулярных комплексов в исследуемых препаратах. Выделены и охарактеризованы два различных типа высокомолекулярных комплексов молока человека: комплекс №1, который имеет в своём составе преимущественно лактоферрин и содержит другие биологически активные белки и пептиды, такие как HNP 1-3 и HNP 4, лактопероксидазу, миелопероксидазу и лизоцим, тогда как белковый комплекс №2 содержит, в основном, α-лактальбумин, а также лактоферрин и HNP 1-3, и не содержит HNP 4, лактопероксидазу, миелопероксидазу и лизоцим.

ПРАВИЛО БАЛАНСА ЗАРЯДОВ В СБОРКЕ ИНТЕГРАЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Л.Ф. Минигулова[1], Н.И. Акберова[1], А. С. Козлова[1], А. К. Нургалиева[1], В.С. Скрипова[1], Р.Г. Киямова[1], М.В. Богданов[1,2]
[1]Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии, НИЛ Биомаркер, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия; [2]Кафедра биохимии и молекулярной биологии, Научно-медицинский центр Техасского университета в Хьюстоне, Медицинская школа МакГоверна, Хьюстон, США

Согласно недавно сформулированному и экспериментально проверенному «динамическому» Правилу Баланса Заряда (ПБЗ), характер заряда экстрамембранных доменов и заряд поверхности мембраны могут действовать согласованно, определяя топологию белка, а фосфатидилэтаноламин (ФЭ) выполняет свою топогенную функцию благодаря нейтральному заряду и асимметричному распределению в мембране. Чтобы найти ключевой молекулярный механизм различной иммуногенности мембранных белков, мы предположили, что поскольку изменения в микроокружении опухолевой клетки и липидном составе плазматической мембраны происходят регулярно, топогенез мембранного белка в первую очередь определяется ПБЗ. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b является идеальной моделью для проверки ПБЗ, так как его N-концевой домен заряжен отрицательно (-7), но по предсказанной топологии он должен локализоваться на внутренней стороне мембраны, что противоречит Positive Inside Rule. Нами была определена топология доменов NaPi2b в мембране клеток рака яичника линии OVCAR-4 с помощью соответствующих моноклональных антител методом лазерной конфокальной микроскопии. Для визуализации фосфолипидов на внешнем монослое мембраны были использованы лактадгерин-FITC, специфичный к фосфатидилсерину (ФС) и Ro09-0198, специфичный к ФЭ. Для изучения взаимосвязи между топологией экстрамембранных доменов NaPi2b и трансмембранным перераспределением фосфолипидов, клетки были инкубированы в условиях, моделирующих «стрессовое» микроокружение опухоли, а именно при гипоксии и низком pH. Показано, что N-концевой домен принимает перевернутую ориентацию, локализуясь на внешней стороне мембраны в «стрессовых» условиях, что совпадает с перераспределением на ту же сторону мембраны отрицательно заряженного ФС и нейтрального ФЭ. Более того, при восстановлении окружающей опухолевые клетки среды до pH 7,4 и условий нормоксии N-концевой домен возвращается к первоначальной ориентации. Полученные данные позволяют предположить, что N-концевой домен является перспективной мишенью для таргетной противоопухолевой терапии. Работа выполнена за счёт средств, выделенных в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ТОПОГЕНЕЗ И ФОЛДИНГ ЭКСТРАМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ ТРАНСПОРТЕРА NAPI2B В УСЛОВИЯХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МОЖЕТ ПРИВОДИТЬ К ВОЗНИКНОВЕНИЮ ОПУХОЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭПИТОПОВ

Л.Ф. Минигулова[1], В.С. Скрипова[1], А. К. Нургалиева[1], Д.Д.Решетникова[1], А.Д. Метелева[1], М.В. Богданов[1,2], Р.Г. Киямова[1]

[1]Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии, НИЛ Биомаркер, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия; [2]Кафедра биохимии и молекулярной биологии, Научно-медицинский центр Техасского университета в Хьюстоне, Медицинская школа МакГоверна, Хьюстон, США

Поиск специфичных мишеней для диагностики и терапии злокачественных новообразований является одной из самых актуальных проблем современной онкологии. В нашей работе мы выдвигаем новую концепцию появления опухоль-специфических эпитопов интегральных мембранных белков за счет изменения их топологии (конформации) в условиях, характерных для опухоли, а именно изменения липидного состава мембран, наличия мутаций, степени гликозилирования, изменения pH и гипоксии на модели фосфатного транспортера NaPi2b. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b (SLC34A2, NaPi-IIb, NPT2b) принадлежит к семейству транспортеров SLC34A2 и участвует в поддержании фосфатного гомеостаза в организме человека, экспрессируясь в ряде нормальных и опухолевых тканей. NaPi2b является интегральным мембранным белком с большим экстрамембранным доменом 4 (ЭМД4, 234-362 аа), N- и C-концевыми доменами, расположенными в цитоплазме и представляет собой удобную мишень для таргетной терапии. На сегодняшний день, ряд моноклональных антител, направленных против ЭМД4 транспортера проходят клинические испытания для лечения рака яичника и легкого. Нами клонирован район эпитопа в границах ЭМД4 (311-340 аа) для антител MX35 и L2 (20/3) и показано, что распознавание NaPi2b этими моноклональными антителами обусловлено дисульфидными связями, гликолизированием в районе эпитопа и отменяется мутацией в положении T330V. Мы показали, что в образовании дисульфидной связи участвует цистеин 350, которая стабилизирует большой экстрамембранный домен 4 транспортера, что важно для его транспортной активности. Выявлено, что топология белка и липидный состав клетки претерпевают значительные изменения в условиях гипоксии и низкого pH, при этом его N-концевой фрагмент может быть локализован снаружи опухолевой клетки, что делает его потенциальным опухоль-специфическим доменом транспортера. Полученные данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение при разработке новых таргетных противоопухолевых препаратов высокой специфичности. Работа выполнена за счёт субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

ВЛИЯНИЕ ЛИПИД-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ТЕМПЕРАТУРНУЮ ЗАВИСИМОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПОРИНОВ ИЕРСИНИЙ

Г.А. Набережных, Е.А. Зелепуга, Г.Н. Лихацкая, Е.В. Сидорин, В.А. Хоменко, О.Ю. Портнягина, Д.К. Чистюлин, О.Д. Новикова

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

Каналы неспецифических поринов наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий можно рассматривать как биологические нанопоры. Высокая стабильность этих белков обеспечивается обширной сетью внутримолекулярных и липид-белковых взаимодействий. В работе изучена температурная зависимость функциональной активности OmpF поринов двух видов иерсиний, *Yersinia pseudotuberculosis* (YpOmpF) и *Y. ruckeri* (YrOmpF), патогенных для человека и рыб соответственно. Для сравнения в эксперименте был использован OmpF порин E. coli (EcOmpF). Изменение функциональной активности поринов под действием температуры фиксировали по вытеканию флуоресцентной метки из липосом, состоящих из смеси липидов: лецитина, дицетил фосфата и холестерина. Резкое уменьшение выхода флуорофора наблюдалось при встраивании образцов поринов YrOmpF, YpOmpF и EcOmpF, прогретых при температуре 88, 72 и 52°C соответственно. По данным SDS-ПААГ электрофореза эти значения соответствуют температуре необратимого термоперехода для каждого из исследуемых белков. После прогревания в этих условиях в растворе обнаружены только термостабильные мономеры поринов, которые по данным динамического светорассеяния агрегируют, и их размеры увеличиваются от 5 до 62 нм. Данные эксперимента хорошо коррелировали с расчетами, выполненными с помощью теоретических моделей тримеров белков. По результатам компьютерного анализа энергия межсубъединичных нековалентных взаимодействий, стабилизирующих трехмерные структуры поринов EcOmpF, YpOmpF и YrOmpF составила, соответственно, -201,4, -214, 72 и -234,45 ккал/моль. Причиной потери функциональной активности исследуемых поринов при термоденатурации, обнаруженной с помощью липосомальной модели, могут быть как изменения в четвертичной структуре, так и необратимые конформационные изменения в структуре мономеров белка. Однако, в ходе измерения проводимости каналов методом бислойных липидных мембран длительное взаимодействие с липидным бислоем способствовало восстановлению поровой активности денатурированного YrOmpF. Так, через 1 ч после встраивания в бислой этого белка, прогретого при 85°C, характер изменения проводимости мембраны мало отличался от такового в присутствии нативного порина. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-03-00318.*

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ ОСТАТКОВ Lys ЦИТОХРОМА С НА ЕГО ПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ, ИНДУЦИРУЮЩУЮ ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЮ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Р.В. Черткова[1], А.М. Фирсов[2], И.Д. Гусев[1], Е.А. Котова[2], Ю.Н. Антоненко[2], Д.А. Долгих[1,3], М.П. Кирпичников[1,3]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Важным событием в цитохром с-зависимом апоптотическом пути является пермеабилизация внешней митохондриальной мембраны, в результате чего в цитозоль выходят апоптогенные факторы, в том числе цитохром с. Согласно одной из гипотез пермеабилизация митохондриальной мембраны может быть индуцирована пероксидазной активностью цитохрома с. Известно, что при нарушении координационной связи атома Fe гема с остатком Met-80 происходит превращение цитохрома с из электронного переносчика в пероксидазу. Стимуляция пероксидазной активности наблюдается, в частности, при взаимодействии цитохрома с с кардиолипином мембран. Положительный заряд цитохрома с обеспечивается в основном остатками Lys, которые располагаются преимущественно на фронтальной стороне молекулы вокруг гемовой впадины и образуют универсальный сайт связывания, вовлеченный в формирование реакционно-способных комплексов с партнерами цитохрома с – комплексами III и IV электрон-транспортной цепи. Логично предположить, что остатки из этого сайта в той или иной степени вовлечены и во взаимодействия с липидными мембранами. Целью настоящей работы являлось изучение роли поверхностных остатков Lys цитохрома с в его взаимодействии с кардиолипин-содержащими моноламеллярными липосомами, приводящем к индукции пероксидазной активности белка. Методом сайт-направленного мутагенеза была получена панель мутантных форм цитохрома с, содержащих одиночные, двойные или тройные замены остатков в положениях 8, 13, 72, 79, 86, 87 на нейтральные или отрицательно заряженные остатки. Соответствующие рекомбинантные белки получены согласно ранее разработанной схеме. В ходе исследования мутантных белков в системе липосом методом хемилюминесценции люминола показано, что замены остатков Lys приводят к значительной активации пероксидазной активности белка. В отсутствие липосом пероксидазная активность полученных мутантов оставалась низкой и была сопоставима с таковой немутированного цитохрома с. При помощи флуоресцентной спектроскопии показано, что пермеабилизующая активность данных вариантов цитохрома с в системе кардиолипин-содержащих липосом, нагруженных флуоресцентным красителем, достаточно хорошо коррелирует с их пероксидазной активностью. *Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.*

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА НОВОГО БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ

Т.Н. Бозин[1,2,3], К.Н. Чухонцева[2], И.В. Демидюк[2], Э.В. Бочаров[3,4]
[1]НИЦ «Курчатовский институт»; [2]Институт молекулярной генетики РАН; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [4]Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)», Москва, Россия

Протеализин (Pln) — цинксодержащая металлопротеаза из Serratia proteamaculans, прототип группы протеаз, распространённых у бактерий, грибов и архей. Имеющиеся данные указывают на то, что протеализин-подобные протеазы (ППП) участвуют во взаимодействии с высшими организмами и, возможно, являются факторами патогенности. В бактериальных геномах гены ППП ассоциированы с генами небольших (~13 кДа) гипотетических консервативных белков. Нами было показано, что у *S. proteamaculans* эти гены организованы в бицистронный оперон, а ассоциированный с Pln белок (Pass, protealysin-associated protein) играет роль ингибитора Pln и, по-видимому, регулирует его активность. Анализ аминокислотной последовательности Pass позволяет предположить, что этот белок относится к новому семейству белковых ингибиторов протеаз. Поэтому задачей данной работы стало изучение пространственной структуры нового ингибитора. Трёхмерная структура Pass установлена методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения с использованием образца рекомбинантного 13C-,15N-меченого белка, в котором для предотвращения димеризации была произведена замена C68S. На основе данных, извлечённых из спектров ЯМР, был рассчитан репрезентативный набор из 15 структур, характеризующийся отсутствием значимых нарушений наложенных при расчёте ограничений, хорошим соответствием наблюдаемого распределения углов φ, ψ карте Рамачандрана и достаточно низкими значениями попарных СКО. Гидрофобное ядро белка Pass формируется между β-слоем, состоящим из 4 антипараллельных β-тяжей, с одной стороны, и двумя протяжёнными α-спиралями, а также N- и C-концевыми участками основной цепи, с другой. В структуре имеются 2 подвижных петлевых участка, в одном из которых наблюдается динамический переход спираль-клубок (Pro25-Leu27), а на концах обоих участков, в области перехода в β-слой, локализованы консервативные остатки (Asp70, Gly19, Gly20). Это позволяет предполагать, что конформационные изменения этих участков важны для тонкой подстройки при связывании с Pln. Отсутствие структур гомологов и значимого структурного сходства с моделями белков из банка данных PDB позволяют сделать вывод о том, что Pass является представителем новой группы белковых ингибиторов протеаз с уникальной пространственной укладкой. *Работа поддержана грантом РФФИ №19-04-00756.*

ИММУНОГЛОБУЛИНЫ С НУКЛЕАЗНЫМИ АКТИВНОСТЯМИ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

Е.А. Ермаков[1,2], В.Н. Бунева[1,2], Г.А. Невинский[1,2]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Шизофрения является фенотипически неоднородным и плохо изученным заболеванием. В то время как этиология этого психического расстройства, по всей видимости, является мультифакториальной, дисфункция иммунной системы всё чаще рассматривается как важный патофизиологический механизм заболевания. Ранним признаком иммунологических нарушений является образование каталитических антител (АТ). В данной работе изучена каталитическая активность иммуноглобулинов класса G при шизофрении. В исследование включены 35 больных шизофренией и 20 здоровых доноров. Выделение IgG из

сыворотки крови проводили с помощью аффинной хроматографии на Protein-G-Sepharose. Показано, что гомогенные препараты поликлональных IgG обладают нуклеазными активностями. Обнаружена выраженная способность IgG больных шизофренией гидролизовать ДНК (плазмиду pBluescript), в то время как АТ здоровых доноров обладали низкой активностью. ДНКазной активностью обладали 80% АТ пациентов с шизофренией. Кроме того, обнаружена РНК-гидролизующая активность IgG при шизофрении, которой обладали 100% АТ пациентов. Исследование РНКазной активности на модельных субстратах показало ее уменьшение в ряду: cCMP>polyC>polyA>дрожжевая РНК. Особенно интересна обнаруженная способность каталитических IgG гидролизовать нейроспецифические микроРНК (miR-137, miR-9, miR-219), что может приводить к нарушению их экспрессии. При этом уровень каталитической активности коррелировал с тяжестью клинических симптомов шизофрении. Анализ РНКазной активности in-situ в геле показал, что L- и H- цепи IgG обладают РНКазной активностью и участвуют в формировании активного центра. Также методом MALDI-MS выявлено нарушение структуры L-цепи IgG больных шизофренией (образование укороченного транскрипта 17,3 кДа), что может быть связано с нарушением процесса синтеза антител плазматическими клетками и созревания В-клеток. Образование каталитических антител с нуклеазными активностями при шизофрении является новым доказательством иммунологических нарушений. При этом гидролиз нуклеиновых кислот, находящихся в кровотоке, может иметь протективную роль, поскольку их удаление снижает активацию TLR и уменьшает иммунный ответ. *Работа частично поддержана проектом ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210023-1 и стипендией Президента РФ (СП-2258.2019.4).*

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРОСОМАЛЬНОГО ЦИТОХРОМА B5 ЧЕЛОВЕКА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО В МОДЕЛИ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ, С ЦИТОХРОМОМ P450 3A4 ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО-ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

Л.А. Калужский[1], К.С. Курпединов[2], Д.С. Сонина[2], П.В. Ершов[1]
[1]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; [2]Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

В настоящее время для анализа белок-белковых взаимодействий (ББВ) широко применяются оптические биосенсоры, в основу работы которых положен эффект поверхностного-плазмонного резонанса (ППР) [1]. Нами была выполнена иммобилизация мембранного белка (микросомальный цитохром b5 человека) на чип биосенсора в состав ранее сформированной на чипе биосенсора модели липидной мембраны. Иммобилизация целевого белка осуществлялась благодаря гидрофобным взаимодействиям между гидрофобными участками молекулы и поверхностью чипа без какой-либо химической модификации. Фосфолипиды для приготовления липосом были выделены из растворённой в гексане общей фракции соевого лецитина путем пятикратного промывания избытком холодного ацетона, затем высушены и растворены в реактиве Фолча (соотношение хлороформ:метанол составляло 2:1). Липосомы были приготовлены в натрий-фосфатном (136,9 мМ NaCl, 19,0 мМ Na_2HPO_4, 3,2 мМ NaH_2PO_4, 2,7 мМ KCl) буфере (рабочий буфер) при воздействии ультразвука с последующим многократным пропусканием через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм. Подготовленные таким образом липосомы были затем иммобилизованы в рабочем канале на чипе серии L1 под контролем ППР биосенсора Biacore 3000 (GE Healhcare, США). Далее проводилась иммобилизация белка в модель липидной мембраны путём инжекции 40 мкг/мл раствора белка в рабочем буфере. В контрольном канале биосенсора формировали аналогичную модель липидной мембраны но не проводили иммобилизацию целевого белка. Позитивные сигналы биосенсора при регистрация взаимодействия цитохрома b5 с его известным белковым партнером - цитохромом P450 3A4 (транкированным по мембранному домену) свидетельствовали о применимости вышеописанного подхода, достижении необходимых уровней иммобилизации на чипе L1 и возможности исследовать ББВ. *Исследования были выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 19-04-00485).*

1. Nguyen H.H., Park J., Kang S, Kim M. Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. Sensors (Basel). 2015, 15(5):10481-510.

АНТИТЕЛА МОЛОКА, ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ МИКРОРНК

И.Ю. Компанеец, С.Е. Седых, Е.А. Ермаков, Г.А. Невинский
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Молоко млекопитающих содержит различные компоненты, которые защищают новорожденного от патогенов, а также регулируют дальнейшее развитие. К таким веществам относят: белки, липиды, сахара, нуклеиновые кислоты. Особый интерес представляют иммуноглобулины молока, обладающие различными каталитическими активностями: протеазной, фосфатазной, ДНКазной, РНКазной и другими. МикроРНК, регулирующие экспрессию многих генов, найдены во многих биологических жидкостях, в том числе и в молоке. Показано, что микроРНК регулируют экспрессию генов, связанных с развитием иммунной системы новорожденного. В данной работе проведен анализ гидролиза микроРНК IgG и sIgA молока. В работе исследована микроРНК, выделенная из цельного молока человека и разных фракций молока: клеточного осадка, липидной фракции, плазмы молока. Анализ выделенной РНК проводили с помощью Agilent 2100 Bioanalyzer на чипах RNA 6000 Pico, Small RNA. С помощью обратной транскрипции с использованием stem-loop праймеров и последующей количественной ПЦР в реальном времени проанализированы 25 микроРНК, представленных в молоке в разных количествах. Для нормализации экспрессии микроРНК подобраны референсные гены. Исследована РНКазная активность IgG и sIgA молока с использованием синтетических микроРНК в качестве субстратов. Иммуноглобулины молока проявляли РНКазную активность реакции гидролиза различных субстратов микроРНК, как высокоэкспрессирующихся в молоке, так и непредставленных в молоке, а также гомоолигорибонуклеотидов. *Работа поддержана грантом РНФ 18-74-10055.*

МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЙ ГЕМОГЛОБИН ЭРИТРОЦИТОВ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРОВИ

Э.И. Насыбуллина[1], О.В. Космачевская[1], К.И. Клюев[2], В.Н. Блиндарь[3], А.Ф. Топунов[1]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [2]НПЦ автоматики и приборостроения им. Н.А. Пилюгина; [3]НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия

Гемоглобин (Hb) в эритроцитах может связываться с мембранами за счет электростатических взаимодействий или ковалентно. Повышенное количество ковалентно связанного Hb может быть обусловлено изменениями структуры молекулы Hb или нарушениями в системе антиоксидантной защиты и действием различных ксенобиотиков, окислительных и гликирующих агентов. В настоящее время предложено рассматривать уровень ковалентно связанного с мембранами Hb (MBHb - Membrane-Bound Hb) в качестве дополнительного критерия оценки функционального состояния эритроцитов. Нами разработан простой метод определения MBHb в пробах крови, позволяющий проводить оценку концентрации Hb в рассеивающих средах с применением оптической спектрофотометрии. С помощью этого метода измерены уровни MBHb у онкологических больных. Материал для исследования предоставлен клинико-диагностической лабораторией РОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина. По данным обобщенной выборки отклонение MBHb от нормы у пациентов наблюдалось в 61%, в контрольной группе - 38% ($t=1,7$; $p<0,05$). По данным корреляционного анализа MBHb имеет высокую степень отрицательной корреляции с уровнем нейтрофилов, базофилов, лимфоцитов. MBHb также обратно коррелирует с СОЭ, эритропоэтином, ферритином и количеством ретикулоцитов. MBHb является чувствительным, но неспецифичным диагностическим показателем состояния крови, наподобие СОЭ и metHb. Поэтому измерение MBHb может быть назначено в качестве дополнительного показателя к общему анализу крови при диагностике и мониторинге воспалительных, инфекционных, онкологических заболевания, а также заболеваний системы кровообращения, метаболической патологии, интоксикационного синдрома. Полученные результаты о содержании MBHb были включены в разрабатываемую пилотную версию компьютерной экспертной системы BLOOD для диагностики анемий, сопровождающих онкологические заболевания. В экспериментах с суспензией эритроцитов установлены диапазоны значений MBHb, которым соответствует повышенная устойчивость эритроцитов к окислительному гемолизу. Высказана гипотеза, согласно которой Hb выступает в роли метаболического «реостата», регулирующего чувствительность и устойчивость эритроцита. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00561_мол_а).*

ИЗМЕНЕНИЕ ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ СПЛАЙСИНГОВЫХ ФАКТОРОВ КАК ОДИН ИЗ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

И.А. Семенов[1], П.В. Шнайдер[1], Ю.Н.Жукова[1], Р.И. Султанов[1,2], Г.П. Арапиди[1,2,3], К.С. Ануфриева[1,2], О.С. Лебедева[1], М.А. Лагарькова[1], В.М. Говорун[1], В.О. Шендер[1,3]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет); [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Ранее нами было продемонстрированно, что в ответ на действие цисплатина погибающие клетки рака яичника способны секретировать во внеклеточную среду компоненты сплайсосомы. Такие секретомы, в свою очередь, приводят к формированию химиорезистентности у опухолевых клеток, не подвергавшихся химиотерапии (ХТ), провоцируют смену фенотипа и программы сплайсинга в этих клетках. Исходя из этого, мы предположили, что изменение представленности сплайсинговых факторов в клетке может приводить к формированию химиорезистентности. Чтобы проверить эту гипотезу нами была получена модель клеточных линий рака яичника SKOV3 со сверхэкспрессией нескольких сплайсинговых факторов и исследовано, как при этом изменяется фенотип опухолевых клеток. Для создания модели нами были получены клеточные линии со сверхэкспрессией белков U2AF1, SRSF3 и SF3B1 с помощью лентивирусной инфекции конструкциями, содержащими ген целевого белка, сшитого с последовательностью FLAG, и ген EGFP. Было показано, что сверхэкспрессия сплайсинговых факторов повышает подвижность клеточных линий, экспрессию маркеров мезенхимального типа и устойчивость к действию цисплатина. Сверхэкспрессия U2AF1 вносила наибольший вклад в формирование агрессивного фенотипа, в связи с чем далее была проведена иммунопреципитация этого сплайсингового фактора из раковых клеток до и после обработки цисплатином для поиска белков-партнёров после ДНК-повреждения. Нами был обнаружен широкий список белков-партнёров U2AF1, затрагивающих как его основные (регуляция сплайсинга), так и ряд возможных неканонических (регуляция М-фазы клеточного цикла) функций. Так же было показано, что в ответ на действие цисплатина интерактом U2AF1 изменяется и приводит к связыванию с белками, участвующими в регуляции путей, ассоциированных с прогрессированием рака и формированием химиорезистентности. Так, показанные нами фенотипические изменения подтверждают предположение о важной роли белков сплайсосомы в формировании химиорезистентности. *Работа поддержана грантом РНФ 17-75-20205.*

ОСОБЕННОСТИ ПРЕЗЕНТАЦИИ МИЕЛИНОВЫХ АУТОАНТИГЕНОВ НА КОМПЛЕКСАХ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ВТОРОГО КЛАССА, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ HLA-DM

А. Мамедов[1], М. Захарова[1,2], О. Фаворова[2], О. Кулакова[2], А. Бойко[2], В. Кнорре[1], Н. Воробьева[3], Е. Хурс[4], И. Киселев[2], Н. Баулина[2], А. Габибов[1,5], А. Белогуров[1,5]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова МЗ РФ; [3]Институт биологии гена РАН; [4]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; [5]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Риск рассеянного склероза (РС) возрастает у лиц, несущих определенные варианты человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса II, тогда как некоторые из них могут иметь протективный эффект. Мы проанализировали распределение

аллелей высоко полиморфного локуса HLA-*DRB1* для более чем тысячи пациентов с РС и здоровых доноров русской принадлежности. Было показано, что носительство групп аллелей HLA-*DRB1**15 и HLA-*DRB1**03 связано с риском РС, в то время как носительство групп аллелей HLA-*DRB1**01 и HLA-*DRB1**11 является протективным. Анализ генотипов показал компенсаторный эффект аллелей риска и резистентных аллелей в *транс*. Определение антигенной специфичности рекомбинантной молекулы HLA-DRB1*01:01 продемонстрировало способность этого HLA распознавать фрагменты основного белка миелина (MBP), одного из аутоантигенов при РС. HLA-DRB1*01:01 связывал два фрагмента MBP, а именно энцефалитогенный MBP_{81-104} и С-концевой $MBP_{146-170}$, с аффинностью, сравнимой с классической антигенной детерминантой HLA-DRB1*01:01 - пептидом 306-318 гемагглютинина (HA) вируса гриппа. Определение кинетических параметров загрузки пептидов MBP и HA на HLA-DRB1*01:01, катализируемой HLA-DM, выявило значительно более низкую скорость обмена CLIP на пептиды MBP. Мы предполагаем, что наблюдаемые протективные свойства группы аллелей HLA-*DRB1**01 могут быть непосредственно связаны со способностью HLA-DRB1*01:01 кинетически различать пептиды экзогенной и эндогенной природы. *Данная работа поддержана грантом Российского научного фонда № 17-74-30019.*

МЕТАБОЛИЗМ УБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ РАЗЛИЧНОГО ТИПА ВЕТВЛЕНИЯ

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

Убиквитинирование является одной из основных посттрансляционных модификаций белков в эукариотических клетках. В дополнение к хорошо известной функции, такой как доставка субстратов к протеасоме, убиквитинирование также играет немаловажную роль в процессах репарации ДНК. Помимо прочего, полиубиквитиновые цепи также участвуют в регуляции клеточного цикла и функционировании иммунной системы. Большое разнообразие убиквитиновых сигналов обусловлено способностью убиквитина образовывать разветвленные цепи через изопептидные связи между ε-NH_2 группой любого из семи лизинов (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) одного убиквитина с С-концевым остатком глицина другого. Количество цепей каждого типа ветвление в клетке значительно различается. Предполагается, что разный тип ветвления цепей обуславливает их уникальные структурные и динамические свойства, что в свою очередь является причиной многообразия функций убиквитина. Механизмы функционирования убиквитиновых цепей в деградации белков протеасомой и репарации ДНК, образованных через остатки K48 и K63, соответственно, являются на настоящий момент наиболее изученными. Клеточные функции других, так называемых неканонических убиквитиновых цепей, не определены. В рамках данной работы был изучен внутриклеточный метаболизм убиквитиновых конъюгатов и субстратная специфичность протеасомы для убиквитиновых цепей различного типа ветвления с использованием сочетания проточной цитометрии и высокопроизводительного секвенирования. Полиубиквитиновые цепи, ветвящиеся по лизинам K11 и K48, оказались наименее стабильны и в значительной степени стабилизировались при добавлении ингибитора протеасомы PS-341. Цепи со связями через лизины K29, K33 и K63 показали большую стабильность и менее выраженную реакцию на добавление ингибитора протеасомы. Интересно отметить, что цепи с ветвлением по лизину K6 были неустойчивыми и одновременно были индифферентны к добавлению PS-341, тогда да как цепи с ветвлением по лизину K27 были наиболее стабильными, но аналогично K6 не реагировали на добавление ингибитора протеасомы. Таким образом, обработка клеток ингибитором протеасомы приводила к накоплению различных вариантов полиубиквитиновых цепей, что подтверждает способность протеасомы распознавать неканонические полиубиквитиновые цепи. На основе дикого типа убиквитина с заменой K27R нами было подтверждено круциальное значение лизина K27 для стабилизации клеточного пула убиквитина. *Данное исследование выполнено в рамках проекта РНФ № 19-74-00139.*

АУТОФОСФОРИЛИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ c-Met И “СИРОТСКОГО” РЕЦЕПТОРА Erbb2 ВНЕКЛЕТОЧНОЙ СЛАБОЩЕЛОЧНОЙ СРЕДОЙ

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

Рецепторная тирозинкиназа c-Met (или Met) является мишенью для фактора роста гепатоцитов (HGF) и играет важную роль в нормальных и патологических условиях. Активация сигнального пути Met связана с несколькими клеточными процессами, такими как пролиферация, выживание, подвижность, ангиогенез, инвазия и метастазирование. Мы обнаружили способность Met активироваться при слабой щелочной обработке. Для выявления потенциальных рецепторов, активирующихся щелочью, эукариотические клетки обрабатывали щелочной средой и смотрели профиль фосфорилирования белков по тирозину. Далее используя иммуноаффинную хроматографию, мы определили Met как основной белок клеточной мембраны в клетках CAKI-1, который реагирует на изменения pH. Активация Met щелочью происходила при pH>8,0 и была дозо-зависима. Специфичность ответа Met на щелочь подтверждали обработкой ингибитором Met киназы SU11274, а также нокаутом рецептора Met с использованием системы редактирования генома CRISPR/CAS9. Оба подхода полностью блокировали ответ фосфорилирования Met в клетках CAKI-1. Аналогичная pH-зависимая активация Met наблюдалась в клеточной линии HeLa. ErbB2 является тирозинкиназой рецептора онкогена, связанной с раком молочной железы. Он является членом минисемейства рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). ErbB2 в настоящее время рассматривается как “сиротный” рецептор, поскольку сам по себе он не связывает EGF-подобные лиганды и может быть активирован только тогда, когда сверхэкспрессируется в злокачественных клетках или находится в комплексе с ErbB3, другим членом минисемейства EGFR. Однако, мы показали, что ErbB2 может быть активирован инкубацией в слабощелочной (pH 8–9) культивационной среде в клетках, трансфецированных ErbB2. Активация рецептора ErbB2 щелочью дозо-зависима и независит от буфера. Эндогенный рецептор ErbB2 в клеточной линии A431 также активируется внеклеточной щелочной средой. Таким образом, мы описываем новые лиганд-независимый механизмы активации рецепторов ErbB2 и рецептора Met. *Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.*

ДЕГРАДАЦИЯ ЗРЕЛЫХ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ ЛИЗОЦИМА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТРИПСИНА

О.В. Степаненко[1], М.И. Сулацкий[1], О.И. Поварова[1], И.М. Кузнецова[1], К.К. Туроверов[1,2], А.И. Сулацкая[1]
[1]Институт цитологии РАН; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Литературные данные свидетельствуют о возможном участии некоторых внутриклеточных протеаз в деградации амилоидных фибрилл in vivo. Однако механизм их действия исследован недостаточно. В связи с этим настоящая работа была направлена на изучение влияния трипсина на стабильность и физико-химические свойства зрелых амилоидных фибрилл на основе лизоцима, полученных при различных условиях фибриллогенеза. Эксперименты были выполнены при нейтральных pH, в которых ферментативная активность трипсина максимальна. Была исследована стабильность фибрилл лизоцима, полученных при различных pH и ионной силе буферного раствора, при их переводе в растворы с нейтральным pH, а также стабильность мономерного лизоцима в условиях получения фибрилл и условиях проведения эксперимента. Далее с применением методов визуализации амилоидных фибрилл, исследования их физико-химических свойств и взаимодействия с флуоресцентными зондами было получено подтверждение деградации зрелых амилоидных фибрилл лизоцима в присутствии трипсина. Установлен следующий механизм действия трипсина на исследуемые амилоидные фибриллы: на первом этапе в присутствии протеазы происходит фрагментация фибрилл, однако образующиеся короткие фрагменты фибрилл остаются упорядоченными, после чего происходит «разрыхление» структуры этих фрагментов. Мы предполагаем, что трипсин оказывает влияние как на водородные связи, за счет которых бета-листы, формирующие остов фибриллы, взаимодействуют между собой, так и непосредственно на структуру белков, формирующих фибриллы. Показано, что образованные в результате воздействия трипсина укороченные фрагменты обладают более высокой токсичностью для клеток по сравнению со зрелыми амилоидными фибриллами лизоцима. Полученные результаты являются шагом к пониманию механизмов взаимодействия протеаз с амилоидными фибриллами в организме, а также их возможного влияния на патогенность этих белковых агрегатов. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-74-10100; исследование воздействия трипсина на зрелые амилоидные фибриллы лизоцима) и программы МКБ (исследование стабильности мономерного лизоцима в различных условиях).*

АРХИТЕКТУРА И СВОЙСТВА НОВОГО ШАПЕРОНИНА БАКТЕРИОФАГА *AR9 BACILLUS SUBTILIS*

Л.П. Курочкина[1], П.И. Семенюк[1], Т.Б. Станишнева-Коновалова[2], О.С. Соколова[2]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и [2]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Шаперонины являются одним из наиболее изученных классов молекулярных шаперонов и обеспечивают правильное сворачивание (фолдинг) новосинтезированных полипептидных цепей и денатурированных под воздействием стресса белков за счет энергии гидролиза АТФ. Шаперонины имеются у всех типов прокариотических и эукариотических клеток, а также архей. Их принято делить на две группы: к группе I относят шаперонины, найденные в бактериях и эукариотических органеллах, к группе II – шаперонины, экспрессируемые в археях и цитозоле эукариот. Мы впервые обнаружили, что и вирусы бактерий (бактериофаги) кодируют шаперонин-подобные белки. Ранее нами получены экспериментальные доказательства функционирования в качестве шаперонинов двух таких белков из бактериофагов EL *Pseudomonas aeruginosa* и OBP *Pseudomonas fluorescens*. В данной работе мы получили и охарактеризовали различными методами новый предсказанный в бациллярном фаге AR9 шаперонин, кодируемый геном 228. Продуцируемый E. coli рекомбинантный продукт гена (gp) 228, был выделен из клеток и очищен ионообменной хроматографией на Q-сефарозе. По данным аналитического ультрацентрифугирования и нативного электрофореза, а также на основе анализа изображений частиц, полученных с помощью высокоразрешающей электронной микроскопии (негативное контрастирование образцов), установлено, что gp228 собирается преимущественно в гептамерное кольцо. Однако, в отличие от однокольцевого шаперонина OBP, небольшая часть белка имеет двухкольцевую морфологию, характерную для большинства известных шаперонинов, включая и фаговый EL. Показано, что рекомбинантный gp228 обладает шапероноподобной активностью, поскольку так же, как OBP и EL, в присутствии АТФ при повышенных температурах защищает фаговые эндолизины от агрегации. Шаперонин AR9 обладает слабой АТФазной активностью, а для функционирования ему не требуется кошаперонин. Биоинформатический анализ и сравнение свойств шаперонина AR9 со свойствами фаговых EL и OBP, а также с шаперонинами I и II групп позволяет предположить, что шаперонины, кодируемые бактериофагами, существенно отличаются не только от других известных шаперонинов, но и различаются между собой, что свидетельствует о структурном и функциональном разнообразии их группы. *Работа поддержана грантами РФФИ №18-04-01281 Л.П.К. и №19-04-00605 О.С.С.*

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ОДИНОЧНОГО КАНАЛА OmpF ПОРИНА ИЗ *YERSINIA RUCKERI*

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

Электрофизиологические эксперименты на неспецифических поринах *E. coli* показали, что большую часть времени их каналы находятся в открытом состоянии, Однако они могут подвергаться спонтанному закрытию в ответ на изменение условий среды или на увеличение потенциала на мембране. В литературе имеются противоречивые гипотезы относительно механизма этого явления, физиологическая роль которого до сих пор остается неясной. *Yersinia ruckeri* – грамотрицательная бактерия, вызывающая иерсиниоз у рыб, преимущественно лососевых пород. Методом бислойных липидных мембран исследованы свойства одиночного канала OmpF порина *Y. ruckeri* (YrOmpF). Показано, что белок проявляет типичную для поринов грамотрицательных бактерий активность, образуя в искусственной мембране каналы со средней проводимостью 250 пСм (в

0.1 M KCl) и небольшой асимметрией (12%). Проводимость встроенного в бислой канала YrOmpF в кислой среде не уменьшалась вплоть до pH=3.0, в этих условиях не отмечалось также тенденции к закрытию поры. Однако предварительная экспозиция белка в кислом буфере приводила к потере его функциональной активности, не восстанавливаемой и после нейтрализации среды. Очевидно, липидное окружение предохраняет молекулы YrOmpF от конформационных изменений, лишающих белок способности образовывать в мембране проводящие каналы. Существенным отличием канала исследуемого белка оказались более высокие значения критического потенциала закрытия (при pH=7.0 Vc=232 мВ, при pH=5.0 Vc=164 мВ) по сравнению с OmpF порином *E. coli* (при pH=7.0 Vc=124 мВ, при pH=5.0 Vc=164 мВ). С помощью теоретических моделей пространственной структуры YrOmpF и классического порина E. coli (OMPF PDB ID) проведен сравнительный анализ распределения зарядов в устье и внутри канала и дана количественная оценка связей между аминокислотными (АК) остатками, локализованными в петле L3 и на внутренней стенке барреля. Такое сравнение представляло особый интерес, поскольку порин из *Y. ruckeri* значительно отличается по содержанию функционально важных кислых АК остатков в петле L3. Сопоставление полученных для обоих белков расчетных данных позволило установить, что в случае YrOmpF петля L3 имеет более жесткую конформацию, что, очевидно, влияет на стабильность открытого состояния его канала и обусловливает более высокое значение Vc. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-03-00318.*

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ БАЦИТРАЦИНА И КОЛИСТИНА И ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ В СИСТЕМАХ ИММУНОАНАЛИЗА

Т.С. Серченя, И.И. Вашкевич, Л.В. Дубовская, О.В. Свиридов
Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Пептидные антибиотики бацитрацин и колистин широко используются в ветеринарии для стимулирования роста, профилактики и лечения заболеваний сельскохозяйственных животных. Поэтому с целью обеспечения биобезопасности человека во многих странах мира установлены максимально допустимые уровни остаточных количеств этих антибиотиков в животноводческом сырье и продуктах питания и используются различные методы контроля, в том числе иммуноанализ. Разработка современных технологий иммуноанализа включает синтез конъюгатов бацитрацина и колистина в качестве гаптенов с инертными белками-носителями и детектирующими агентами. В нашей работе создана панель иммунореагентов для разработки систем иммунохимической детекции и контроля данных пептидных антибиотиков. Синтезированы и охарактеризованы 12 производных бацитрацина и колистина, включая 4 иммуногена, с помощью которых получены антитела к двум антибиотикам. Для конъюгирования использовали 6 макромолекул (тироглобулин, гемоцианин улитки, декстран, рекомбинантный лактоферрин, альбумин быка, овальбумин, пероксидаза) и биотин. Химическую модификацию проводили по карбоксильным и аминогруппам гаптенов при мольном соотношения 1:2-1:500 с применением различных методов биоконъюгации – карбодиимидной конденсации, реакции активированных эфиров, периодатного окисления, малеимидно-тиольного и глутаральдегидного. Модифицированные пептиды характеризовали с помощью MALDI-TOF и спектрофотометрически. Синтезированные производные использовали не только для получения антител, но и для создания 6 иммунохимических систем. В иммунохроматографическом анализе готовили тест-полоски с иммобилизованными в аналитической зоне антибиотиками, конъюгированными с белками. В прямом иммуноферментном анализе на твердой фазе иммобилизовали антитела, а для детекции использовали конъюгаты антибиотиков с пероксидазой. В непрямом анализе иммобилизовали белковые конъюгаты антибиотиков или комплексы авидин – биотинилированный антибиотик, для связывания с антигеном применяли специфические антитела, а для детекции – антивидовые антитела, меченные пероксидазой. Модифицированные пептидные антибиотики и разработанные конструкции могут найти применения при создании наборов реагентов для контроля содержания бацитрацина и колистина в пищевой продукции животного происхождения.

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАРЯДА НА ПОВЕРХНОСТИ ВИРИОНОВ И ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ СО СПИРАЛЬНОЙ СТРУКТУРОЙ

О.А. Баранов, М.В. Архипенко, Е.А. Евтушенко, Н.А. Никитин, И.Г. Атабеков, О.В. Карпова
Кафедра вирусологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Физико-химические характеристики вирусных частиц, в том числе распределение зарядов на их поверхности, могут внести определенный вклад в понимание структуры вирионов и молекулярных механизмов развития инфекции. В настоящее время существует ряд работ, в которых определяли изоэлектрическую точку вирионов, а также описывающих особенности формирования заряда некоторых икосаэдрических вирусов растений. Однако распределение заряда на поверхности вирусных частиц, имеющих спиральную структуру капсида, на данный момент не изучалось. В работе было изучено распределение заряда на поверхности спиральных вирусов растений, относящихся к различным таксономическим группам (вирус табачной мозаики, X-вирус картофеля, вирус мозаики альтернантеры), а также роль РНК и белка оболочки в формировании поверхностного заряда. Известно, что большинство спиральных вирусов растений имеют суммарный отрицательный заряд. Для выяснения распределения заряда на поверхности вирусных и вирусоподобных частиц (ВПЧ), не содержащих вирусную РНК, впервые были использованы магнитные наночастицы (МЧ), состоящие из водной дисперсии оксидов железа диаметром 50 нм, покрытых гидрофильным полимером с диэтиламиноэтилом в качестве функциональной группы, несущей положительный заряд. Для всех исследованных вирусов было показано наличие зоны с повышенной плотностью отрицательного заряда на одном торце вириона: МЧ эффективно взаимодействуют только с одним торцом вирионов. В экспериментах по связыванию МЧ с ВПЧ, полученными из вирусного белка оболочки в отсутствие РНК, и с вирионами, обработанными нуклеазами, было показано отсутствие специфического взаимодействия: связывание МЧ происходит со всей поверхностью ВПЧ и обработанными нуклеазами вирионами, при этом многие ВПЧ, вирионы и сами МЧ остаются свободными. Таким образом, было впервые продемонстрировано неравномерное распределение поверхностного заряда у вирионов вирусов растений и ключевая роль вирусной

РНК в его формировании. Изучение распределения заряда на поверхности спиральных вирусов растений, а также роли электростатических взаимодействий, может служить основой для понимания природы фитовирусов, в том числе принципов их взаимодействия с зараженной клеткой. *Работа поддержана грантом РФФИ 18-04-00028 А.*

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЖБЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В РАСТВОРАХ НЕСТРУКТУРИРОВАННЫХ И ЖЕСТКИХ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

А.М. Кусова, А.Э. Ситницкий, Ю.Ф. Зуев
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

При анализе различных процессов в высококонцентрированных биологических системах in vivo и in vitro необходимо принимать во внимание максимально возможное разнообразие межмолекулярных взаимодействий, влияющих на термодинамику и кинетику явлений, транспорт, агрегацию, структуру и конформацию макромолекул. Нами предложен комплексный подход для изучения подвижности и взаимодействий белковых молекул на примере неструктурированного α-казеина αS-CN) и жесткого глобулярного α-химотрипсина (ChTr). Коэффициенты самодиффузии и взаимной диффузии белков были получены с помощью методов ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и динамического рассеяния света (ДРС). Анализ экспериментальных данных, основанный на фрикционном формализме неравновесной термодинамики, позволил получить набор вириальных коэффициентов, содержащих информацию о типах и вкладах различных взаимодействий. Из всего набора наибольший интерес представляет второй вириальный коэффициент, т.к. он может быть получен в численном виде в рамках модели потенциала средней силы, объединяющей различные типы межмолекулярных взаимодействий. Предложенный многоступенчатый подход позволил выяснить, что основной вклад во взаимодействие между молекулами неструктурированного αS-CN вносит заряд-зарядовое взаимодействие, в то время как в случае жесткого ChTr вклад от различных взаимодействий эквивалентный. Однако это связано не со степенью жесткости белковой структуры, а с существенно большим суммарным электрическим зарядом αS-CN по сравнению с ChTr. В случае ChTr основными вкладами являются электростатическое отталкивание, диполь-дипольное взаимодействие и потенциал Гамакера. Установлено, что рассмотренный подход хорошо описывает межбелковые взаимодействия независимо от степени упорядоченности белковой структуры, что позволяет предполагать его универсальность. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и Правительства Республики Татарстан № 18-415-160011.*

МУТАЦИИ В ПОРОВОЙ ОБЛАСТИ И TRP ДОМЕНЕ ТЕПЛОВОГО РЕЦЕПТОРА TRPV1 СПЕЦИФИЧЕСКИ ВЛИЯЮТ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КАНАЛА

К.И. Лубова[1], А.О. Чугунов[1], Я.А. Андреев[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) является одним из ключевых белков, участвующих в восприятии болезненного тепла. Несмотря на то что на сегодняшний день TRPV1 является одним из самых хорошо изученных ионных каналов всего TRP семейства, лечение болевых синдромов, вызванных дисфункцией TRPV1, всё ещё остается серьёзной терапевтической проблемой. Таким образом, актуальной задачей стоит понимание механизмов активации, десенситизации и регуляции TRPV1. Мы обнаружили пять новых аминокислотных остатков TRPV1, участвующих в тепловой и капсаицин-опосредованной активации канала. Известно, что ток ионов через пору TRPV1 регулируется верхними и нижним воротами. Молекулярно-динамические расчёты показали, что самое узкое место в верхних воротах сформировано остатком Gly 643. Мы продемонстрировали, что замена даже следующим наименьшим остатком аланина в этой позиции ослабляет активацию канала. С другой стороны, наш анализ показал, что «узким местом» нижних ворот являются Ile 679 и Ala 680 - двойная мутация I679A + A680G привела к фенотипу «всегда открытый канал». Далее, наше моделирование показало, что движения Asn 676, расположенного в полости между воротами, стабилизируют закрытое и открытое состояния канала. Дальнейшие вычисления предложили замену Asn на Ser, чтобы оказать наименьшее влияние на структуру канала. Однако даже такой мутант оказался нефункциональным, что указывает на чрезвычайную важность Asn 676 для функциональности TRPV1. Наконец, мы обнаружили, что движения цитозольного домена TRP также могут влиять на проводимость поры. *In silico* анализ коррелированных движений поры и примыкающего к поре TRP домена показал, что остаток Lys 688 в этом домене образует ионный мостик, фиксирующий движения всего TRP-домена. Действительно, замена Lys на небольшой и гибкий Gly привела к значительному увеличению чувствительности канала, в то время как замена Lys на жесткий Pro имела противоположный эффект. Таким образом, наши результаты дают лучшее понимание молекулярной механики, лежащей в основе функционирования TRPV1. *Проект поддержан РНФ, грант 16-15-00167.*

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ИЗУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ ФЕНИЛАЦЕТОНМОНООКСИГЕНАЗ ИЗ *THERMOBIFIDA FUSCA* И СИСТЕМ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ НА ЕЁ ОСНОВЕ

П.Д. Паршин[1,2], У.А. Мартысюк[1,4], С.С. Савин[1,2], А.А. Пометун[1,2,3], В.И. Тишков[1,2,3]
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет; [2]ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; [3]Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [4]Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва Россия

Монооксигеназы Байера-Виллигера являются группой ферментов представляющих большой интерес для биотехнологий, но их применение ограничено низкой стабильностью. Фениалцетонмонооксигеназа (PAMO) из *Therbobifida fusca* лишена этого недостатка. Фермент обладает высокой стабильностью, состоит из одной FAD-содержащей субъединицы массой 65кДа, использует NADPH в качестве переносчика электронов и проявляет максимальную активность по отношению к небольшими

ароматическим кетонам и сульфидам. Кроме того, PAMO способна катализировать процессы в присутствии органических растворителей.

Для очистки ферментов методом аффинной хроматографии необходимо получить фермент с последовательностью из 6 или более аминокислотных остатков гистидина (HisTag). Его добавление может влиять на свойства фермента, поэтому в данной работе были получены ферменты с различным его расположением, с целью выбора фермента с наилучшими свойствами.

Из-за высокой стоимости NADPH, проведение процессов с PAMO требует использования систем регенерации кофактора. Одним из ферментов, широко используемым для этой цели является формиатдегидрогеназа (FDH). Данный фермент катализирует окисление формиат иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD^+ до NADH. Так как PAMO использует в качестве кофермента NADPH, в работе использовался полученный ранее в нашей лаборатории фермент из *Pseudomonas* sp.101 с измененной коферментной специфичностью с NAD^+ на $NADP^+$. Кроме того, для повышения эффективности систем регенерации существует подход создания систем химерных белков.

Целью данной работы было получение генов фенилацетонмонооксигеназ с различным расположением His-Tag и двух систем гибридных белков на основе FDH и PAMO, с использованием различных формиатдегидрогеназ. Была проведена оптимизация условий экспрессии полученных генов и очистки выделенных ферментов. Для свободных PAMO с His-Tag была изучена каталитическая эффективность ферментов в процессе окисления бензилацетона. В случае полученных систем FDH-PAMO были изучены каталитические характеристики фенилацетонмонооксигеназной и формиатдегидрогеназной реакций. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 19-34-70036.*

РОЛЬ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА Phe98, His239 и Arg243 В УЗНАВАНИИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗОЙ ЧЕЛОВЕКА SMUG1

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

ДНК-гликозилазы инициируют путь эксцизионной репарации оснований, по которому удаляются небольшие поврежденные основания в ДНК. Специфичная к одноцепочечной ДНК монофункциональная урацил-ДНК-гликозилаза человека SMUG1 узнает остатки дезоксирибоуридина и его C5-производных в ДНК и гидролизует их N-гликозидную связь. Ранее в наших работах был описан кинетический механизм конформационных изменений в процессе взаимодействия SMUG1 дикого типа с ДНК-субстратом. В данной работе исследовалась конформационная динамика взаимодействия мутантных форм SMUG1 F98W, H239A и R243A с модельными ДНК-субстратами. Замена данных аминокислот позволила установить их роль в узнавании поврежденного основания и катализе. Конформационные переходы в ферменте и ДНК изучались методом предстационарной кинетики и молекулярной механики. Конформационная динамика биомолекул наблюдалась в реальном времени с использованием метода остановленной струи с детекцией флуоресценции остатков триптофана в белке или 2-аминопурина и FAM/BHQ1 пары в ДНК. Сопоставление данных наблюдения флуоресценции и анализа накопления продукта (электрофорез в ПААГ) позволили улучшить модель механизма специфического связывания SMUG1 с ДНК и определить роль остатков Phe98, His239 и Arg243. Полученные результаты показали, что замена Phe98 и His239 на Trp и Ala, соответственно, приводит к почти полной инактивации фермента, что подчеркивает важность этих остатков в распознавании субстрата и образовании каталитически активного комплекса фермент-субстрат. Обнаружено, что замена Arg243 на Ala облегчает диссоциацию комплекса SMUG1 с продуктом реакции, что указывает на роль Arg243 в связывании ДНК. *Моделирование структуры комплексов фермента и изучение конформационной динамики проводилось при поддержке грантов Российского научного фонда (№ 16-14-10038) и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-04-00012), соответственно*.

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ РАСЩЕПЛЁННЫХ И НЕРАСЩЕПЛЁННЫХ βαβ-ЕДИНИЦ

А.М. Каргатов
Институт белка РАН, Пущино, Россия

βαβ-Единица является основной супервторичной структурой α/β-белков. Она состоит из двух β-тяжей, параллельно упакованных в составе общего β-листа и соединённых с помощью одной или нескольких α-спиралей. В подавляющем большинстве случаев полипептидная цепь βαβ-единицы образует правую суперспираль. β-Тяжи, входящие в состав βαβ-единицы, могут лежать рядом или разделяться одним или несколькими β-тяжами, образуя в первом случае нерасщеплённую βαβ-единицу, а во втором – единожды, дважды и т.д. расщеплённую. В грубом приближении все α/β-белки могут быть представлены в виде комбинаций различных типов βαβ-единиц. Было показано, что α-спирали в нерасщеплённых, единожды и дважды расщеплённых βαβ-единицах отличаются чередованием гидрофобных и гидрофильных аминокислотных позиций при отсчёте с N-конца. При этом в нерасщеплённых преобладают гидрофобные ряды N4-N7-N10-N11 и N6-N7-N10, в единожды расщеплённых – N4-N7-N8-N11, а в дважды расщеплённых – N4-N5-N8-N12. При отсчёте с C-конца гидрофобный ряд имеет вид C4-C7-C8 независимо от степени расщеплённости. Также обнаружена зависимость между степенью расщеплённости βαβ-единицы и длиной α-спирали. Преимуществом обладают такие длины α-спиралей, при которых их гидрофобные позиции при отсчёте с N-конца совпадают с гидрофобными позициями при отсчёте с C-конца, создавая чёткий гидрофобный кластер. Так, среди нерасщеплённых βαβ-единиц часто встречаются α-спирали длиной 10 (совпадают позиции N4/C7, N7/C4), 13 (N6/C8, N7/C7, N10/C4) и 14 остатков (N7/C8, N11/C4), среди единожды расщеплённых – 10 (N4/C7 и N7/C4), 11 (N4/C8, N8/C4) и 14 остатков (N7/C8, N8/C7, N11/C4), а среди дважды расщеплённых – 7 (N4/C4), 11 (N4/C8, N5/C7, N8/C4) и 15 остатков (N8/C8, N12/C4). В ряде случаев это позволяет с высокой вероятностью определить тип βαβ-единицы просто по длине α-спирали. *Данная работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-00242.*

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ СЕРОТОНИНОВЫХ 5-HT3 РЕЦЕПТОРОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДАМИ X-RAY, EM, MD

А.В. Попинако
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Механизмы структурной адаптации белков экстремофильных организмов к условиям обитания в аспекте особенностей их фермент-субстратных взаимодействий на данный момент остаются малоизученными, что определяет актуальность исследований в данной области. В данной работе исследование механизмов структурной адаптации проводилось на примере семейства короткоцепочечные алкогольдегидрогеназы (SDR). Для детального исследования особенностей взаимодействий с субстратами, локализации субстратов в активном центре SDR был проведен докинг, молекулярная динамика при температурах 85 и 27 °C и структурный анализ для ряда SDR. В качестве основного модельного объекта была выбрана SDR из гипертермофильной археи *Thermococcus sibiricus* (TsAdh319). TsAdh319 отличается исключительной стабильностью и активностью в водно-органических и солевых средах при высоких температурах. Температурный оптимум для превращения спиртов в альдегиды превышает 95°C. Кинетические параметры ферментативных реакций при данных температурах близки к значениям, характерным для мезофильных аналогов при умеренных температурах. Соответственно, по данным молекулярной динамики, флуктуации остатков активного центра SDR из мезофильных бактерий и TsAdh319 аналогичны при температуре среды обитания организмов. Помимо уникальных полиэкстремофильных свойств, TsAdh319 обладает широкой субстратной специфичностью (спирты, дикарбонильные соединения и сахара). Сайт связывания субстрата TsAdh319 (нумерация 3TN7 PDBID) содержит остатки S137, D138, V139, G147, Y150, G179, A180 и G186. Карбонильный кислород субстрата образует две водородные связи с гидроксильной группой S137 и Y150. Геометрический анализ связывания показал изменение длины данных связей при температуре 85°C по сравнению с 27°C. Остаток S137 участвует в стабилизации связывания субстрата. *Исследования методами молекулярной динамики выполнены при финансовой поддержке РНФ (проект №19-14-00164). Расчеты проводились с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного комплекса МГУ имени М.В.Ломоносова и центра коллективного пользования «Комплекс моделирования и обработки данных исследовательских установок мега-класса» НИЦ «Курчатовский институт», http://ckp.nrcki.ru/.*

ЛИПОСОМЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

Е.Ю. Сошинская[1], Л.В. Кордюкова[2], Н.В. Федорова[2], М.В. Петухов[1,3,4], Э.В. Штыкова[1,3]
[1]ФИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН; [4]Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

Мембранные белки играют важную роль в таких биологических процессах, как транспорт ионов, перенос электронов и многие другие. Общеизвестно, что мембранные белки трудно изучать, так как они нерастворимы в воде, однако изучение их структуры может помочь в разработке лекарственных средств и новых подходов к лечению большого числа заболеваний, включая раковые. Поэтому при исследовании мембранных белков их встраивают в искусственные аналоги клеточных мембран: мицеллы, амфифильные полимеры, бицеллы, нанодиски или липосомы [1]. В настоящей работе с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) было проведено исследование структуры двух типов липосом, собранных из липидов, полученных из двух разных источников. Первый тип - это липосомы, полученые из синтетических липидов, которые традиционно используются для исследования липосомальных структур. Второй – это липосомы, образованные из липидов, выделенных из оболочки вируса гриппа А. Липосомы, содержащие природные липиды, являются более приближенной моделью клеточной мембраны. Кривые малоуглового рассеяния от липосом были получены на источнике синхротронного излучения PETRA III, DESY, Гамбург. Интерпретация данных МУРР и построение моделей были проведены путем создания трехмерных липосомальных структур, используя в качестве строительных единиц структуры атомного разрешения отдельных липидов – так называемый квази-атомистическом подход. Форма липосом задавалась в общем случае в виде эллипсоидов, параметры которых определялись по кривым малоуглового рассеяния с учетом полидисперсности. Таким образом, два типа липосом были структурно охарактеризованы, и было проведено сравнение их структурных параметров. В частности, было показано, что природные липосомы с 24-часовой инкубацией, в отличие от синтетических, склонны к образованию многослойных структур. *Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, грантов РФФИ 18-54-00019 и 17-00-00487.*

1. Emilio A.Saita, Diego de Mendoza. (2015). Thermosensing via transmembrane protein–lipid interactions. Biochimica et Biophysica Acta. Volume 1848, Issue 9. Pages 1757-1764.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ ОБЪЁМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК Pol λ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ

П.В. Чалова, Н.И. Речкунова, В.М. Голышев, В.В. Коваль
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Ключевым фактором в понимании механизмов и функции пространственных структур белковых молекул является представление об их формировании и организации. Изучение пространственных структур биологических комплексов требуется не только при разработке лекарственных средств, но и помогает понимать фундаментальные основы клеточных процессов. Значительную сложность для клетки представляет репарация комбинированных (кластерных) повреждений, состоящих из повреждений разного типа, исправляемых комплексом систем репарации. Понимание фундаментальных механизмов исправления

повреждений ДНК необходимо для оценки устойчивости геномной ДНК к повреждающим факторам и возможности предотвращения последствий генотоксических воздействий. Полученные результаты позволят установить детальный механизм и состав комплекса репарации сложных повреждений ДНК, включающих производные бенз[а]пирена – одного из распространенных канцерогенов окружающей среды. Целью настоящий работы является изучение механизма репарации объемных повреждений ДНК, образующихся при действии производных бенз[а]пирена (BPDE-N2-dG), и исправляемых системой ЭРН - ДНК-полимеразами. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что на нарушение геометрии всей структуры Pol λ самое существенное влияние оказывает наличие массивного остатка dG-BP в транс-конфигурации. Важно отметить, что транс-конфигурация dG-BP в существенно большей степени нарушает геометрию ДНК-белкового комплекса Pol λ, т.к. массивный остаток BP внедряется в структуру комплекса Pol λ с ДНК в области белковой α-спирали 510-521. Работа поддержана РФФИ (18-04-00596) и Министерством науки и высшего образования РФ по программе повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров (Проект 5-100). *Работа выполнена с использованием вычислительных мощностей Сибирского суперкомпьютерного центра СО РАН www2.sscc.ru*

СТРУКТУРА И РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА «МИНИМАЛЬНОГО» LSM БЕЛКА ИЗ АРХЕИ *HALOBACTERIUM SALINARUM*

А.Д. Никулин[1], Ю.А. Буюклян[1,2], Н.В. Леконцева[1], М.С. Фандо[1]
[1]Институт белка РАН, Пущино; [2]Южно-Уральский государственный гуманитарно-педагогический университет, Челябинск, Россия

РНК-связывающие Sm/Lsm белки представлены как в бактериях, так в эукариотах и археях. Принадлежность к структурному семейству Lsm белков определяется структурно-консервативным Sm-мотивом, состоящим из N-концевой α-спирали и пяти β-тяжей. Lsm белки формируют четвертичную структуру в виде кольцевых гексамеров (бактериальные Hfq) или гептамеров (архейные SmAP и эукариотичекие Sm/Lsm). Несмотря на схожую структурную организацию, Lsm белки бактерий и эукариот имеют различающиеся функции. Бактериальные Lsm белки Hfq являются регуляторами трансляции многих генов, обеспечивая взаимодействие малых регуляторных РНК с целевыми мРНК. Эукариотические Sm белки формируют каркас сплайсосомы, а Lsm - участвуют в процессинге РНК. Функции архейных белков SmAP до настоящего времени не выяснены, хотя определен целый ряд структур этих белков и подтверждена их способность связывать РНК. SmAP белок из археи Halobacterium salinarum отличается от большинства Lsm белков. Он не имеет характерных для бактериальных белков Hfq неупорядоченных N- и C-концевых последовательностей, но также и характерных для архейных и эукариотических белков вставки - петли L4, таким образом представляя собой «минимальный» Sm/Lsm-домен. Ранее предполагалось, что наличие петли L4 определяет формирование гептамеров, а её отсутствие – гексамеров Lsm белков. Мы определили структуру белка и показали, что он формирует гомогептамеры, как и архейные SmAP белки с петлей L4. Функциональные тесты показали, что белок имеет только один, характерный для всех Lsm белков, РНК-связывающий участок, имеющий повышенное сродство к олиго(У) последовательностям РНК. *Работа поддержана грантом РФФИ №18-04-00222*.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА КОНТРОЛЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПУТИ ЭШВЕЛЛА В *ESCHERICHIA COLI* ФАКТОРАМИ ТРАНСКРИПЦИИ UXUR И EXUR

А.Д. Никулин[1], Н.В. Леконцева[1], Т.А. Бессонова[2,3], У.С. Швырева[2], М.С. Фандо[1], С.В. Тищенко[1], М.Н. Тутукина[2], Ю.А. Пуртов[2], О.Н. Озолинь[2]
[1]Институт белка РАН, Пущино; [2]. Институт биофизики клетки РАН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Пущино; [3]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Помимо глюкозы, независимыми источниками углерода для роста клеток в естественных условиях может служить целый ряд других сахаров, например D-гексуроновые кислоты по метаболическому пути Эшвелла. Этот путь является альтернативой метаболических путей окисления глюкозы в бактериях и обеспечивает выживание клеток при экстремальных условиях. Он контролируется транскрипционными факторами - паралогами UxuR и ExuR, принадлежащими к GntR семейству белков. Степень гомологии представителей этого семейства не превышает 25%. Для исследования механизма контроля метаболического пути Эшвелла в клетках *Escherichia coli* нами выделены в препаративных количествах белки UxuR и ExuR и начата работа по их кристаллизации. Методом поверхностного резонанса плазмонов проанализировано взаимодействие белков UxuR и ExuR с фрагментами ДНК, содержащими ранее идентифицированные сайты связывания белков. Показано, что белки UxuR и ExuR связывают полученные фрагменты ДНК с высоким сродством. Фрагмент ДНК, содержащий последовательность нуклеотидов, которая может узнаваться обоими белками, связывается с белками по-разному. Белок UxuR имеет к нему сродство примерно схожее со сродством к «своему» фрагменту, а белок ExuR проявляет очень низкое сродство. Также показано, что присутствие глюкуроната или галактуороната натрия увеличивает сродство белков к специфическим фрагментам ДНК примерно на порядок. *Работа поддержана грантом РНФ №18-04-00322.*

ДИНАМИКА АССОЦИАЦИИ ДНК С БЕЛКОМ DPS В НАНОКРИСТАЛЛАХ

К.Б. Терешкина[1], Э.В. Терешкин[1], Н.Г. Лойко[2], В.В. Коваленко[1], Ю.Ф. Крупянский[1]
[1]Институт химической физики им Н.Н. Семенова РАН; [2]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

В данной работе рассматриваются особенности образования стабильных комплексов между ДНК и молекулами ДНК-связывающего белка DPS (DNA-binding protein from starved cells), обеспечивающего внутриклеточную (био-) кристаллизацию нуклеоида бактерий в неблагоприятных условиях с образование нанокристаллов DPS-ДНК непосредственно внутри живой

клетки при различных видах стресса (голодание, температурный, окислительный и др.) Проведено исследование молекулярных механизмов связывания ДНК с одиночными додекамерами DPS, додекамерами DPS в кластерах и кристаллах. Для определения возможных положений ДНК в кристаллах белка DPS, построены участки кристаллов, расшифрованных нашей группой на станции ID23-1 синхротрона ESRF (PDB ID: 6GSM). Моделирование проведено методом молекулярной динамики с использованием крупнозернистых моделей (силовое поле MARTINI 2.1_DNA)в программе Gromacs: NPT ансамбль, температура 300К поддерживалась с помощью стохастического термостата; давление – с помощью термостата Парринелло-Рамана с постоянной времени 2 пс. Быстрые степени свободы ограничивались с помощью алгоритма LINCS. Радиусы обрезания для кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий брались равными 1.5 нм. Шаг интегрирования – 2фс, длины траекторий от 0.02 до 0.5 мкс. Показано, что ДНК образует чрезвычайно стабильные комплексы с молекулами DPS. Внутри кристаллов выделены три типа протяженных взаимно ортогональных и один тип коротких каналов, в которых может располагаться ДНК. Методами термодинамического интегрирования рассчитаны изменения свободной энергии Гиббса в процессах связывания олигонуклеотидов (24 пары оснований, 5’-AAGTCGACCCTAGAGGATCTTTGT-3’) с основными молекулами DPS, образующими указанные каналы и перенос молекул из одного канала в другой. Показано, что ДНК может располагаться во всех обнаруженных типах каналов, однако наиболее энергетически выгодным является её встраивание в один из трёх типов ортогональных каналов. Найдены структурные особенности комплексов ДНК-DPS и предложена модель расположения ДНК внутри нанокристаллов исходя из проведённых расчётов. *Работа выполнена в рамках Госзадания Минобрнауки России 0082-2014-0001, № АААА-А17-117040610310-6. Расчеты проведены на базе МВС-10П в МСЦ РАН, проект СНРН2. Экспериментальные данные получены в ESRF.*

ТРИТИЕВАЯ ПЛАНИГРАФИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВИРУСОВ

Е.Н. Богачева[1], А.А. Долгов[1], А.Л. Ксенофонтов[2], Г.А. Бадун[3], Л.А. Баратова[2]
[1]ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН; [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Структура спиральных вирусов растений часто остается неизвестной, что связано с трудностью исследования ее классическими методами с высоким разрешением, такими как рентгеноструктурный анализ, криоэлектронная микроскопия и высоким содержанием в них подвижных неупорядоченных фрагментов. Структура вирусов довольно давно исследуется с помощью тритиевой планиграфии (ТП), которая стала ценным подспорьем к существующим физико-химическим методам [1]. Метод ТП основан на замене водорода на тритий в стерически доступных углеводородных участках при бомбардировке объектов потоком атомарного трития. Анализ распределения тритиевой метки на уровне аминокислотных остатков по длине макромолекулы детализирует структуру поверхности макромолекул и их комплексов. Объединение данных, полученных методом ТП, с результатами теоретических предсказаний структуры белка и разработанного нами имитационного алгоритма позволяет предложить модели структуры белка оболочки и вириона для тобамо-, поти- и потексвирусов. Мы предложили алгоритм определения ориентации субъединиц Х-вируса картофеля и уточнения координат атомов аминокислот в вирионе с помощью ТП. Алгоритм заключается в: 1) компьютерном моделировании бомбардировки вируса изотропным потоком атомов трития и 2) определении ориентации субъединиц в вирусах на основании сопоставления данных ТП и пространственных ограничений при сборке субъединиц в спиральный чехол вируса. Недавние исследования проведены на сферических частицах вируса табачной мозаики, полученных путем термическойперестройки. Впервые получена информация о стерической доступности аминокислот на поверхности этих частиц и определены участки изменения структуры по сравнению с исходным вирусом [2]. *Работа поддержана грантом РФФИ (18-04-00525) и финансированием ФИЦ ИХФ РАН (0082-2014-0001, № АААА-А17-117040610310-6).*

1. Баратова Л.А., Богачева Е.Н., Гольданский В.И., Колб В.А., Спирин А.С., Шишков А.В. Тритиевая планиграфия биологических макромолекул. М.: Наука. 1999. 175с.
2. A.L. Ksenofontov, N.V. Fedorova, G.A. Badun et al. (2019) Surface characterization of the thermal remodeling helical plant virus. In press. DOI 10.1371/journal.pone.0216905.

СТРУКТУРА β-α-, α-β- и β-β-ДУГ В abCd-ЕДИНИЦАХ И SH3-ПОДОБНЫХ ДОМЕНАХ В ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКАХ

Е.В. Бражников, А.В. Ефимов
Институт белка РАН, Пущино, Россия

Проведен анализ структуры перетяжек в β-α- и α-β-дугах в abCd-единицах и в β-β-дугах L-модулей в SH3-подобных доменах. Всего в негомологичных белках исследовано 327 abCd-единиц (236 PDB-файлов) и 60 негомологичных SH3-подобных доменов. Исследованы β-α- и α-β-дуги в abCd-единицах с прямым и обратным ходом полипептидной цепи. В β-α-дугах abCd-единиц с прямым ходом цепи около половины перетяжек состоят из 2 аминокислотных остатков, которые в основном имеют конформацию «β(m)αβα(n)». В них нет глицинов и пролинов, а в позиции «β» часто встречается аспарагиновая кислота. Для таких дуг в перетяжках из одного остатка с конформациями «β(m)εα(n)» или «β(m)α(L)α(n)» чаще других встречается глицин. В α-β-дугах abCd-единиц с прямым ходом цепи чаще других встречаются перетяжки из четырех аминокислотных остатков, и в них нет преимущественной конформации перетяжек. В β-α-дугах abCd-единиц с обратным ходом цепи чаще других встречаются перетяжки из 7 аминокислотных остатков, которые имеют конформацию β(m)α(L)ββαββα(n). В α-β-дугах abCd-единиц с обратным ходом цепи чаще других (32%) встречаются перетяжки из 1 аминокислотного остатка (все Gly) с конформацией дуг α(m)εβ(n) или α(m)α(L)β(n). В SH3-подобных доменах перетяжка β-тяж–петля–β-тяж принадлежит L-образному модулю, в котором β-тяжи расположены под углом ~90° в разных β-слоях, упакованных ортогонально, и вместе с петлей образуют в пространстве полвитка правой суперспирали. L-Модули с βmαααβn- и βmαααβαβn-конформациями, где m и n –число остатков в первом и втором β-тяжах, встречаются наиболее часто (57 и 8% соответственно). Показано, что пространственные структуры L-модулей каждого типа хорошо совмещаются при наложении друг на друга. Проведенный в данной работе анализ

структуры перетяжек в дугах в abCd-единицах и SH3-доменах содержит полезную информацию для предсказания пространственной структуры белков и для молекулярного моделирования *de novo* дизайна белков, содержащих эти структуры. *Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-00242-а*

1. Бражников Е.В., Каргатов А.М., Ефимов А.В. (2016) Матем. биол. и биоинф., 11, № 2, 159–169. doi: 10.17537/2016.11.159.
2. А. М. Каргатов, Е. В. Бражников, А. В. Ефимов (2018) Мол. биол., 52, № 6, 1074–1081. doi: 10.1134/S0026898418060095.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ Б ИЗ *S. PROTEAMACULANS*

Д.А. Корженевский[1], Д.Е. Петренко[1], А.Ю. Николаева[1], В.И. Тимофеев[1,3], Ю.К. Агапова[1], А.В. Власкина[1], П.В. Дороватовский[1], А.Г. Михайлова[2], Т.В. Ракитина[1,2]
[1]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [3]Институт кристаллографии ФИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

Олигопептидаза Б (ОПБ) является сериновой пептидазой с трипсиноподобной субстратной специфичностью, принадлежащей к семейству пролил-олигопептидаз (ПОП). ПОП обладают характерной двухдоменной пространственной структурой, в которой каталитическая триада находится в интерфейсе между С-концевым каталитическим и N-концевым β-пропеллерным доменами. Известно, что многие ОПБ являются факторами патогенеза тяжёлых протозойных и, предположительно, бактериальных инфекций. Данный факт определяет важность структурных исследований ОПБ, которые до сих пор проводились только на протозойных ферментах. Ранее нами было установлено, что функционально-важные солевые мосты, обнаруженные в междоменном интерфейсе протозойных ОПБ, не являются консервативными в случае ОПБ из γ-протеобактерий, в частности, фермента из *Serratia proteamaculans* (ПСП) (Mikhailova et al., 2017). В рамках поиска альтернативных структурных факторов, стабилизирующих активную конформацию ПСП, мы исследовали, как аланиновые замены заряженных аминокислотных остатков, окружающих H652 каталитической триады, и их партнеров из β-пропеллерного домена, модулируют активность и субстратную специфичность ПСП. Было обнаружено, что комбинация двух активирующих мутаций E125A и D649A подавляет специфические эффекты точечных замен, но способствует восстановлению активности мутанта K655A, сохранившего только 5% активности. В отсутствии пространственной структуры ПСП в закрытой (активной) форме, для объяснения наблюдаемого феномена мы использовали компьютерные методы моделирования по гомологии и молекулярной динамики (МД). Комплексы ПСП с пептидами, содержащими R в положении P1 и R или K в положении P2, были подвергнуты МД симуляции. Полученные МД траектории были использованы для анализа межмолекулярных контактов в субстрат-связывающем кармане, а также солевых мостов в междоменном интерфейсе. В результате, было установлено, что характер основного остатка в P2 положении субстрата влияет на конформационную динамику и межмолекулярные взаимодействия пептидных субстратов. Кроме того были выявлены возможные варианты междоменных солевых мостов, стабилизирующих активную (закрытую) конформацию ПСП и, предположительно, других ОПБ из γ-протеобактерий. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №17-14-01256.*

РОЛЬ ПЕРЕТЯЖЕК В ОТБОРЕ АНТИПАРАЛЛЕЛЬНОЙ ИЛИ ПАРАЛЛЕЛЬНОЙ УКЛАДКИ ТЯЖЕЙ В БЕТА-БЕЛКАХ С ОРТОГОНАЛЬНОЙ УПАКОВКОЙ

Е.А. Бошкова
Институт белка РАН, Пущино, Россия

В настоящей работе рассмотрена структура β-белков с ортогональной упаковкой. Цель работы - выяснение механизма отбора укладки β-тяжей, который определяет итоговую третичную структуру белка. Для работы отобраны 127 негомологичных β-белковых доменов из разных суперсемейств. Белки взяты из ранее созданной нами системы структурной классификации белков PCBOST. Анализ показал, что основную роль в отборе способа укладки тяжей при переходе в ортогональный слой играет переходная петля (дуга) между тяжами. Более распространена антипараллельная укладка β-тяжей (76% случаев). При этом ход сворачивания белка можно смоделировать как простое пошаговое добавление β-тяжей по одному на краю растущего домена. Переходные петли, обеспечивающие антипараллельную укладку β-тяжей, имеют разнообразную структуру. Для них характерно наличие изломов, например - остатки Gly в αL- или ε-конформации. Параллельная укладка образуется при встраивании в растущий β-лист параллельного β-тяжа, расположенного дальше по цепи или приходящего из другой цепи белка. Для ее формирования требуется более строгий шаблон дуги. Он представляет собой структуру: (β)m D αααααααα…(β)n, где (β)m - бета-тяж на N-конце рассматриваемого участка; (β)n - β-тяж на C-конце, расположенный в ортогональном слое; D - остаток Asp, Asn или другой небольшой аминокислотный остаток, являющийся, по сути, первым остатком альфа-спирали; α - прочие остатки альфа-спирали, длиной 7-14 аминокислотных остатков. По-видимому, длинная, прошитая водородными связями α-спираль, соединенная с β-тяжем без перетяжки, играет роль жесткой оси. α-Спираль не позволяет следующему по цепи β-тяжу встроиться в растущий β-лист, оставляя пространство для пристраивания параллельного β-тяжа из другого участка полипептидной цепи. Таким образом, структура переходной дуги определяет ход сворачивания белка и его итоговую третичную структуру. *Данная работа поддержана грантом РФФИ №.17-04-00242.*

ГЛИЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗА ЧЕЛОВЕКА КАК ФАКТОР ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ мРНК

Е.С. Виноградова[1], А.А. Танцура[1,2], О.С. Никонов[1], Е.Ю. Никонова[1]
[1]Институт белка РАН, Пущино; [2]Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия

В настоящий момент нет четкого понимания функционирования вирусных IRES (внутренних сайтов посадки рибосомы) и регуляции синтеза вирусных белков, особенно для IRES I типа, в ходе инициации трансляции на которых используется большое количество дополнительных белковых факторов (ITAF). Ощущается острая нехватка структурной информации, которая могла бы пролить свет на трехмерную организацию таких IRES и их комплексов с белками. Инициация трансляции на всех

исследованных на сегодняшний день IRES I типа зависит от наличия ITAF, список которых до сих пор полностью не определен. Одним из ITAFs, необходимых для эффективной инициации трансляции полиовирусной мРНК, является глицил-тРНК-синтетаза человека (GARS). Этот белок взаимодействует с апикальной частью домена V IRES полиовируса, которая мимикрирует под антикодоновую шпильку глициновой тРНК и содержит глициновый антикодон. Нами было показано, что глицил-тРНК синтетаза человека специфически связывает фрагменты IRES I вирусов, таксономически удаленных друг от друга, с близкими константами. Это указывает на универсальность механизма регуляции инициации трансляции при помощи глицил-тРНК синтетазы для таких вирусов и на схожесть пространственных структур соответствующих участков их мРНК. GARS имеет трехдоменную структуру, при этом за узнавание глицинового антикодона отвечает антикодон-связывающий домен. Анализ РНК-белкового интерфейса между ABD и tRNAGly показывает, что ABD способен образовать с tRNAGly стабильный комплекс и в отсутствие остальных доменов GARS. Основываясь на имеющейся структурной информации, мы построили теоретическую модель фрагмента V домена IRES I и его комплекса с ABD. Модель имеет повышенное (по сравнению с гомологичной частью tRNAGly) число водородных связей с белком, что объясняет большее сродство GARS к IRES, чем к tRNAGly. Эти данные позволяют рассматривать антикодон-связывающий домен GARS в качестве возможной базы для создания ингибитора инициации трансляции вирусных мРНК. На данный момент мы уже приступили к разработке и конструированию такого ингибитора.

МИКРОБНЫЕ ХОЛЕСТЕРИН ОКСИДАЗЫ: ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛУЧЕНИЯ И ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

А.А. Добыш, М.А. Шапиро, А.В. Янцевич
Институт биоорганической химии НАН, Минск, Беларусь

Холестерин в организме человека является предшественником различных стероидных гормонов, желчных кислот, витамина D и других биологически активных соединений, является структурным компонентом клеточных мембран. Повышение уровня холестерина в крови приводит к нарушениям метаболизма различной степени тяжести, что обуславливает необходимость периодического контроля. В лабораторной диагностике для определения уровня холестерина в сыворотке крови и других клинических образцах, а также в пищевых продуктах используются методы, основанные на ферментативной активности микробных холестерин оксидаз. Данные ферменты применяют в качестве биокатализаторов при производстве стероидных препаратов. Холестерин оксидазы катализируют окисление 3β-гидроксильной группы холестерина в кето-группу с участием молекулярного кислорода и образованием пероксида водорода [1]. Помимо прочего, микробные холестерин оксидазы, являясь фактором патогенности, рассматриваются в качестве потенциальных мишеней в антибактериальной терапии [2]. Все вышеперечисленное указывает на необходимость получения рекомбинантных форм холестерин-оксидаз и проведения их структурно-функциональных исследований. Цель и задачи: получение микробных холестерин оксидаз *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptomyces lavendulae* в активной форме и исследование структурно-функциональных характеристик. Анализ влияния условий экспрессии на выход целевых белков, анализ аминокислотных последовательностей белков с целью установления функционально значимых структурных элементов и подбора участков транкирования, исследование физико-химических свойств ферментов, включая температурную стабильность, оптимум pH, влияние детергентов на активность белка, субстратную специфичность и профиль образующихся продуктов. Результаты: 1. Получены холестерин оксидазы из *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Streptomyces lavendulae*. 2. Установлены физико-химические свойства данных белков и особенности ферментативного катализа. 3. Охарактеризована каталитическая активность данных ферментов, установлены продукты катализа. 4. Выдвинуты предположения о структурных детерминантах специфичности фермента.

(1) Vrielink, A.; Ghisla, S. FEBS J. 2009, 276, 6826–6843.
(2) Reiss, R.; Faccio, G.; Thöny-Meyer, L.; Richter, M. BMC Biotechnol. 2014, 14:46.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МУТАЦИИ T330V И ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ НА СТРУКТУРУ ЧЕТВЕРТОГО ЭКСТРАМЕМБРАННОГО ДОМЕНА (EMD4) НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b

А.С. Козлова[1], Н.И. Акберова[1], Р.Г. Киямова[1], М.В. Богданов[1,2]
[1]Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия; [2]Школа медицины МакГоверна, Университет Техаса, Хьюстон, США

Натрий зависимый фосфатный транспортер 2b (NaPi2b) – мембранный белок играет важную роль в поддержании фосфатного гомеостаза в организме человека. Транспортер NaPi2b экспрессируется в ряде нормальных и опухолевых тканей и является перспективной мишенью для терапевтических антител Rebmab200. Известно, что мутация T330V блокирует взаимодействие NaPi2b с антителами MX35, распознающими район эпитопа в четвертом экстрамембранном домене NaPi2b (EMD4, 234-362aa), с 4 цистеинами, которые могут образовать дисульфидные связи. Для предсказания трехмерной структуры EMD4 использовали метод *de novo*. К структуре EMD4 были добавлены аминокислоты PRO 233 и ALA 363, расположенные в прилежащих к EMD4 трансмембранных доменах, эти аминокислоты были зафиксированы для имитации «заякоревания» в мембране соседних трансмембранных участков. Было подготовлено 6 систем: EMD4, EMD4 с дисульфидными связями C303-C350, EMD4 C322-C328, EMD4 T330V, EMD4 T330V C303-C350, EMD4 T330V C322-C328. Молекулярную динамику систем проводили с использованием силовых полей CHARMM36, NAMD_CHARMMRUN в явном растворителе, каждую систему предварительно стабилизировали в течение 130 нс, после чего проводили симуляцию равновесной молекулярной динамики длиной 300 нс. Общее время симуляции составило 2.580 мкс. Проведённый конформационный анализ траекторий молекулярной динамики трехмерных структур EMD4 NaPi2b демонстрирует влияние мутации T330V на структуру и поведение EMD4. Кроме того, наличие дисульфидных связей влияет на вторичную структуру и подвижность EMD4 в целом, и в районе эпитопа. Полученные данные свидетельствуют, что мутация T330V и дисульфидные связи в районе EMD4 предположительно могут влиять

на распознавание транспортера антителами. *Работа выполнена при финансовой поддержке программы повышения конкурентоспособности КФУ.*

ВЫСОКОАФФИННОЕ МОНОДОМЕННОЕ АНТИТЕЛО, СПЕЦИФИЧНОЕ К ЦИТОКИНУ ИНТЕРЛЕЙКИН 17А: СТРУКТУРА И МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ЦИТОКИНОМ

О.С. Костарева[1], И.А. Коляденко[1], С.Р. Евдокимов[2], В.М. Екимова[2], А.Г. Габдулхаков[1], М.Б. Гарбер[1], С.В. Тищенко[1]
[1]Институт белка РАН, Пущино; [2]ЗАО «БИОКАД», Санкт-Петербург, Россия

Цитокин интерлейкин 17А (IL-17A) синтезируется широким спектром иммунокомпетентных клеток. При заболеваниях ревматическим артритом и псориазом уровень IL-17A резко возрастает, поэтому способы ингибирования интерлейкина активно изучаются. Новым перспективным терапевтическим агентом против IL-17A являются гуманизированные производные неканонических иммуноглобулинов семейства верблюжьих, содержащих только тяжёлые цепи, так называемые монодоменные антитела (VHH). Монодоменное антитело VHH, образующее стабильный комплекс с IL-17A (KD=90 pM), является составной частью антитела BCD-085 (в 2019 году зарегистрировано как нетакимаб) и антитела BCD-121. Эти препараты разработаны российской биотехнологической компанией Биокад и в настоящее время выведены на этап клинических испытаний среди пациентов, страдающих псориазом и ревматоидным артритом. Структурные исследования VHH и его комплекса с IL-17A позволят выявить причины такого прочного взаимодействия антитела с антигеном. К настоящему времени мы получили препарат VHH, определили его кристаллическую структуру и провели моделирование взаимодействия с цитокином. Ген VHH клонирован в плазмиду pET-28a. Белок наработан в клетках штамма-суперпродуцента на основе клеток BL21(DE3)/Rosetta *Escherichia coli*. Очистка белка проводилась с помощью аффинной хроматографии на смоле Ni-NTA агароза с последующей гель-фильтрацией на смоле Superdex G-75. Белок был закристаллизован, на станции ID23-1 синхротронного излучения ESRF (Гренобль, Франция) с одного из кристаллов собран набор дифракционных данных с разрешением 2.45 Å. Структура определена методом молекулярного замещения и депонирована в банк данных белковых структур (PDB ID: 6RBB). Моделирование взаимодействия VHH с IL-17A показало, что основная часть контактов монодоменного антитела с цитокином приходится на неканонический участок CDR –H3. *«Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-74-10156)» Мы благодарим Группу структурной биологии ESRF за возможность доступа к синтхротрону.*

ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ L1 МЕТАЛЛО-β-ЛАКТАМАЗЫ С ПОЗИЦИЙ КВАНТОВО-ТОПОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЭЛЕКТРОННОЙ ПЛОТНОСТИ

Е.О. Левина[1,2], М.Г. Хренова[2,3], А.А. Астахов[2,4], В.Г. Цирельсон[2,4]
[1]Московский физико-технический институт (Государственный университет); [2]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [3]МГУ им. М.В. Ломоносова; [4]Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Растущее число случаев резистентности бактерий к существующим антибактериальным препаратам диктует необходимость создания новых соединений с заданной фармацевтической активностью. Поиск трехмерной структуры новых макромолекулярных комплексов и установление энергетического профиля ферментативной реакции часто ведется комбинированным методом квантовой механики / молекулярной механики (КМ/ММ). Однако в существующем варианте он не позволяет предсказывать каталитические свойства родственных субстратов в активном центре фермента. Для преодоления этого ограничения нами предлагается использовать комбинацию методов КМ/ММ и квантово-топологического анализа электронной плотности (QTAIM) в активном центре фермент-субстратных комплексов. Нами исследован процесс гидролиза десяти цефалоспоринов L1 металло-β-лактамазой (L1 MβL), который протекает за счет нуклеофильной атаки OH-, приводящей к разрыву C-N связи β-лактамного кольца с последующим переносом протона на атом N через каталитический аспартат. Экспериментально установлено, что перенос протона является лимитирующей стадией данной реакции [1]. После КМ/ММ моделирования, для структур, соответствующих стационарным точкам на ППЭ, проведен QTAIM анализ особенностей электронной плотности активных центров, входящих в КМ подсистемы, при явном учете эффектов окружения ММ подсистемы. Локализованы основные критические точки связей (BCP), ассоциируемые с межмолекулярными взаимодействиями в квантовых подсистемах изученных комплексов. Оказалось, что дескрипторы связывания в BCP внутримолекулярной N···H связи в структурах цефалоспоринов, находящихся в переходном состоянии лимитирующей стадии реакции, демонстрируют наличие значимой корреляции с экспериментальными значениями k_cat. Наилучший результат получен для зависимости значений k_cat от индексов делокализации электронов, δ(N,H), (R2 = 0.975) при аппроксимации зависимостью вида k_cat=aln(b·δ(N,H)); a= -164.7±9.9,b=50.8±0.7. Аналогичные зависимости такого рода для других связей отсутствуют. Полученный результат может быть использован для прогноза гидролитической активности L1 MβL в отношении цефалоспоринов нового поколения. *Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 18-74-10056).*

1. Wang, Z.; Fast, W.; Benkovic, S. J.// Biochemistry. 1999. V.38 P. 1001

СТРУКТУРНАЯ ДИНАМИКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА БЕЛКА NEIL2 ЧЕЛОВЕКА С ДНК

П.В. Чалова[1,2], А.А. Ломзов[1,2], В.В. Коваль[1,2]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]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. Фер-

мент NEIL2 обладает ДНК-гликозилазной активностью по отношению к 5'-гидроксиурацилу и других окисленных производных цитозина. Данный белок обладает АР-лиазной активностью, расщепляет ДНК остов путём β-элиминирования (β,δ) с образованием одноцепочечного разрыва. В результате реакции расщепления остается 3'-концевой ненасыщенный сахар и продукт с концевым 5'-фосфатом. В базе данных PDB представлена кристаллическая структура вирусного ортолога человеческих белков NEIL2/NEIL3, Mimivirus Nei2 (MvNei2), полученная методом рентгеноструктурного анализа. Основываясь на данной структуре, мы провели моделирование трехмерной структуры комплекса белка NEIL2 с модельным олигонуклеотидным дуплексом. Трёхмерная структура NEIL2 была получена моделированием по гомологии на веб-сервисе phyre2. С использованием моделирования по методу молекулярной динамики определены критически важные точки узнавания поврежденной ДНК с помощью NEIL2. Полученная 3D-структура комплекса NEIL2 с ДНК и её динамика позволяют установить структурные особенности взаимодействия в фермент-субстратном комплексе в процессе узнавания повреждения. *Работа поддержана РФФИ (18-04-00596) и Министерством науки и высшего образования 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 с использованием вычислительных мощностей Сибирского суперкомпьютерного центра СО РАН www2.sscc.ru.*

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МИНОРНЫХ КОМПОНЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА: КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ

Ф.Н. Гильмиярова[1], Н.А. Колотьева[1], В.И. Кузьмичева[1], О.А. Гусякова[1], Е.А. Рыскина[2]
[1]Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, Самара; [2]Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Молекулы малой молекулярной массы сегодня выходят на передний план, становясь актуальным предметом фундаментальных исследований. В то время как науке стало многое известно об особенностях взаимодействия белков друг с другом, недостаточно изученным остается вопрос о регулировании этих процессов на уровне более тонких структур, а именно о том, какой вклад в межбелковые взаимодействия вносят минорные компоненты метаболизма, постоянные спутники и участники разнообразных внутри- и внеклеточных превращений, составляющие микроокружение крупных молекул. Цель нашего исследования – изучение биологической активности минорных компонентов метаболизма с применением методов in silico и in vitro. В качестве объекта изучения нами были выбраны такие интермедиаты как лактат и пируват. Предсказаны биологические эффекты данных молекул с использованием прикладной программы для компьютерного моделирования PASS. Изучение смоделированных эффектов проводилось in vitro с применением экспериментальной системы белок-лиганд, основанной на изменении степени взаимодействия антигенов А и В групп крови по системе АВО с анти-А и анти-В естественными и моноклональными антителами при добавлении в систему метаболитов малой молекулярной массы. Осуществлялась постановка реакции гемагглютинации с индикацией степени агглютинации балльно по W. Marsh. Статистический анализ данных проводили в среде прикладных программ SPSS 12.0 и MS EXCEL 2010. Полученные методом компьютерного прогнозирования результаты показывают вероятность влияния пирувата и лактата на межмолекулярные процессы поддержания метаболического баланса путем регуляции белкового, углеводного, липидного обменов, антиоксидантных процессов, тканевого дыхания. Серия проведенных экспериментов отчетливо показала более активное влияние лактата на белок-лигандные взаимодействия антигена с антителом, в отличие от пирувата, что, вероятно, является результатом суммарных модификаций, вызванных этим метаболитом и регистрируемых по скорости и полноте процесса агглютинации. Представленные данные свидетельствуют о многообразии функций, выполняемых лактатом и пируватом – малыми молекулами, которые выводят нас за рамки привычного восприятия этих интермедиатов лишь как участников биохимических превращений и служат фундаментом для дальнейших исследований.

ГЛЮТЕНАЗЫ НАСЕКОМЫХ ДЛЯ ЭНЗИМОТЕРАПИИ ЦЕЛИАКИИ

Е.Н. Элпидина, В.Ф. Терещенкова, Е.А. Дворякова, И.Ю. Филиппова
МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

Глиадины – это главные запасные белки семян пшеницы, составляющие основной компонент глютена. Они содержат до 50% остатков глутамина и до 30% пролина, что обеспечивает устойчивость к действию пептидаз широкого спектра действия. Пищеварительные пептидазы человека гидролизуют глиадины лишь до достаточно крупных пролин- и глутамин-богатых пептидов, которые вызывают целиакию у чувствительных людей. Поиск глютеназ, способных эффективно гидролизовать образующиеся токсические пептиды глиадинов, считается перспективным направлением в разработке путей лечения целиакии. К числу глютеназ относятся пептидазы, специфично расщепляющие связи, образованные остатками глутамина (постглутаминрасщепляющие пептидазы, ПГРП) и пролина (пролин-специфические пептидазы, ПСП). Насекомые-вредители запасов зерновых, в том числе жуки-тенебриониды *Tenebrio molitor* и *Tribolium castaneum*, используют глиадины в качестве пищевых субстратов и должны обладать комплексами глютеназ, включающими ПГРП и ПСП. Исследуя весь комплекс пищеварительных пептидаз *T. molitor* мы показали, что постглутамин-расщепляющей активностью обладают главные пищеварительные пептидазы насекомого – цистеиновые. Анализ транскриптомов кишечников тенебрионид показал, что они содержат 29 (*T. molitor*) и 25 (*T. castaneum*) цистеиновых катепсинов из семейства C1 папаина, включающих как гомологов лизосомальных катепсинов млекопитающих, так и видоспецифичные катепсины L и B. Именно эти видоспецифичные катепсины с высоким уровнем экспрессии мРНК и являются пищеварительными пептидазами тенебрионид. Препараты пищеварительных катепсинов обладают пост-глутаминрасщепляющей активностью и гидролизуют аналоги токсических пролин- и глутамин-богатых пептидов глиадинов. Биоинформатический анализ комплекса ПСП тенебрионид показал, что он включает 9 типов ПСП. Биохимическими методами выявлено, что 2 ПСП, дипептидилпептидаза 4 и пролилкарбоксипептидаза, секретируются в кишечник и являются

пищеварительными ферментами, а пролидаза локализована в цитоплазме эпителия кишечника и может участвовать в гидролизе всасываемых в клетки дипептидов. Мы показали, что эти три фермента способны участвовать в гидролизе аналогов токсических пептидов глиадинов и предложили схему полного гидролиза токсических пептидов глиадинов с участием ПГРП и ПСП тенебрионид.

ПРИРОДА БОКОВОЙ ГРУППЫ ЛИГАНДА, РАСПОЛОЖЕННОЙ В S1'-СУБСАЙТЕ МЕТАЛЛОКАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т, ОПРЕДЕЛЯЕТ ГЕОМЕТРИЮ ТЕТРАЭДРИЧЕСКОГО ПЕРЕХОДНОГО КОМПЛЕКСА

В.Х. Акпаров[1], В.И. Тимофеев[2,3], И.Г. Халиуллин[4], Г.Е. Константинова[1], Т.В. Ракитина[3,5], И.П. Куранова[2,3], В.К. Швядас[6]

[1]ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт»; [2]Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН; [3]НИЦ «Курчатовский институт»; [4]Московский физико-технический институт; [5]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; [6]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Карбоксипептидаза Т из *Thermoactinomyces vulgaris* (КПТ) имеет схожие с панкреатическими узкоспецифичными карбоксипептидазами А и В структуру и строение активного центра, но отличается широкой субстратной специфичностью и способна расщеплять и субстраты этих карбоксипептидаз, и пептиды, содержащие отрицательно заряженные боковые группы в P1'. Для изучения структурных основ субстратной специфичности КПТ мы получили кристаллические структуры комплексов КПТ с аналогами переходного состояния сульфамоил-L-лейцином и сульфамоил-L-глутаминовой кислотой (SLeu и SGlu). Сравнение этих структур с ранее определенными структурами комплексов КПТ с SArg и SPhe показало, что конформации каталитически важных остатков Tyr255 и Glu270, расстояния между этими остатками и соответствующими группами лиганда, а также расстояние Zn-S, моделирующее расстояние между ионом цинка и тетраэдрическим sp3-гибридизованным атомом углерода превращаемой связи, изменяются в зависимости от природы бокового радикала субстрата в положении S1'. Одновременно с изменением длин связей, например, Zn-S (3.2> 3.18> 3.1>3.08 нм) в ряду SGlu>SArg>SPhe>SLeu изменяются константы ингибирования (3,9E-03> 3.4E-04>3.5E-05>8.9E-06 M) КПТ указанными выше аналогами переходного состояния. Эффективность (kcat/Km) катализируемого КПТ гидролиза соответствующих трипептидных субстратов изменяется в обратном порядке ZAAL> ZAAF>ZAAR> ZAAE. Таким образом, боковая группа лиганда (субстрата или аналога переходного состояния), взаимодействуя с S1'-субсайтом КПТ, определяет геометрию переходного комплекса, его стабилизацию и каталитические свойства фермента. В случае КПВ взаимная ориентация каталитических аминокислотных остатков, а также расстояния между Glu270 и SArg/SPhe значительно меньше зависит от природы соответствующего бокового радикала субстрата. Обнаруженное нами влияние природы боковых групп на структурную организацию переходного состояния является важным фактором, определяющим каталитическую активность и широкую субстратную специфичность карбоксипептидазы Т. *Работа по выращиванию кристаллов, получению рентгенодифракционных наборов, решению и уточнению структур комплексов поддержана грантом РНФ 17-14-01256, определение кинетических констант и констант ингибирования поддержано грантом РФФИ 19-04-00220*.

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК В СОСТАВЕ КОМБИКОРМА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ

Н.П. Канцерова, Л.А. Лысенко, Е.Д. Тушина, И.В. Суховская, Н.Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

Рост животных напрямую связан с накоплением костной и мышечной тканей, причем последняя играет особенно важную роль в ростовых процессах у рыб, поскольку составляет примерно половину массы их тела. Известно, что мышечный рост обусловлен преобладанием синтеза белка над его деградацией, которая рассматривается как высокоселективный и строго контролируемый механизм биологической регуляции. Белковая деградация в скелетных мышцах рыб осуществляется лизосомально-аутофагической, кальпаиновой и, в меньшей степени, убиквитин-протеасомной протеолитическими системами. У интенсивно растущих рыб (до половой зрелости), наряду с максимальной скоростью биосинтеза, наблюдается интенсивный белковый распад, который необходим для контроля качества синтезируемых белков. Искусственное выращивание рыб сопряжено со многими стресс-индуцирующими факторами, такими как высокая плотность посадки, гипоксия, летний подъем температур; последний особенно негативно отражается на состоянии культивируемой радужной форели (Oncorhynchus mykiss) – холодноводного вида. Они сказываются в виде снижения темпов прироста рыбы, подверженности бактериальным инвазиям, высоком проценте летальности. В экспериментах с радужной форелью, проводимых на аквахозяйстве в течение двух выростных сезонов, оценивалась эффективность обогащения корма рыб смесью дигидрокверцетина и арабиногалактана, биологически активными добавками, получаемыми из отходов заготовки лиственницы. Дигидрокверцетин – биофлавоноид, обладающий антиоксидантной активностью. Арабиногалактан – полисахарид с пробиотической активностью. Выживаемость и скорость роста форели, получавшей с кормом биологически активные добавки, были выше по сравнению с таковыми показателями у рыб контрольной группы. Активность протеолитических ферментов цитозоля, кальпаинов и протеасомы, отражала темп роста рыб и белкового обмена, достигая более высоких значений у форели экспериментальной группы в течение всего выростного сезона, и особенно в периоды действия и восстановления после действия повреждающих факторов (зимовального голодания, в период высоких температур, инфекционного заболевания). *Финансовое обеспечение исследования осуществлялось при поддержке Российского научного фонда (проект № 17-74-20098).*

РАСПОЗНАВАНИЕ ОБЪЕМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК XPD ГЕЛИКАЗОЙ *C. THERMOPHILUM*

И.О. Петрусева[1], Й. Купер[2], Ж. Каппенбергер[2], Н.В. Лукьянчикова[1], К. Кискер[2], О.И. Лаврик[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия; [2]Центр экспериментальной медицины им. Рудольфа Вирхова, Институт структурной биологии, Университет г. Вюрцбурга, Германия

Эффективная работа систем репарации ДНК критически важна для жизни клетки. Скорость элиминации из ДНК объемных повреждений системой эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН) в клетках эукариот в значительной степени определяется эффективностью их распознавания осуществляемого субъединицей фактора TFIIH, геликазой XPD. Остановка XPD при контакте с объемным повреждением делает его видимым для белков, участвующих в последующем репаративном процессинге. Механизм работы XPD человека (hXPD) в ходе ЭРН не вполне ясен, его изучение поможет понять, как химическая и пространственная структура повреждения связаны с эффективностью его удаления. Решение этой задачи важно в контексте сохранения индуцированных цитотоксических повреждений и поиска ингибиторов ЭРН. Представления о механизме действия и структуре hXPD основаны на результатах ее исследований методами биохимии, сравнительного мутагенеза, а также результатах исследований структуры архейных белков-аналогов XPD. Белки архей содержат все необходимые для проявления ДНК-геликазной активности домены, но работают как изолированные мономеры, что ограничивает возможности их использования как модели hXPD. Новый белок аналог – геликаза из *C. thermophilum* (ctXPD) как и hXPD осуществляет специфические белок-белковые взаимодействия и функционирует в составе комплексов [1]. Анализ взаимодействия рекомбинантных ctXPD и ctXPD/p44 с модельными ДНК, содержащими распознаваемые белками ЭРН синтетические повреждения nFlu, nAnt, Fap-dC [2, 3], показал, что сродство ctXPD к модифицированным ДНК повышено, геликазная активность по отношению к частичным дуплексам с повреждениями снижена на порядок, а АТР-азная повышена. Таким образом, ctXPD подобно hXPD останавливается при встрече с объемным повреждением, что говорит о сходстве механизмов их работы. Данная модельная система представляется перспективной для использования в дальнейших биохимических и структурных исследованиях механизма верификации. *Финансирование работы осуществлялось за счет средств гранта РФФИ № 19-04-08.*

[1]. Kuper J, Braun C, Elias A et al.// PLoS Biol. 2014. V. 12 № 9. P. 1-13.
[2]. Evdokimov A, Petruseva I, Tsidulko A et al.// Nucleic Acids Res. 2013. V. 41. № 12. P. 1-10.
[3]. Evdokimov A, Tsidulko A, Popov A et al.// DNA repair. 2018. V. 41. № 61. P. 86-98.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ «СТРУКТУРА-ФУНКЦИИ» ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* МЕТОДОМ САЙТ-НАПРАЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

Т.С. Юрченко[1,2], С.Б. Болотова[1], С.С. Савин[1,2], А.А. Пометун[1,2,3], В.И. Тишков[1,2,3]
[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»;[3]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

NAD^+-зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) катализирует реакцию окисления формиат-иона до углекислого газа с сопряженным восстановлением NAD^+ до NADH. ФДГ широко распространена в различных организмах и играет важную роль в жизнедеятельности клеток. При неблагоприятных условиях ФДГ является ферментом стресса. Данный фермент находит применение в синтезе оптически активных соединений в качестве биокатализатора реакции регенерации NADH. Использование подобных ферментативных систем экономически и экологически выгодно в связи с тем, что ферменты, в отличие от большинства катализаторов, обладают высокой специфичностью и нетоксичны для окружающей среды. Однако для их функционирования необходимы мягкие условия, которые труднодостижимы в режиме крупнотоннажных производств. В связи с этим повышение стабильности и каталитической эффективности ферментов является важной и актуальной задачей. Следовательно, изучение ФДГ представляет, как фундаментальный, так и практический интерес.

Объектом исследования настоящей работы является ФДГ из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus*. В нашей лаборатории ген этого фермента был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli*. Проведенные ранее эксперименты показали, что ФДГ из *S. aureus* (SauFDH) обладает высокой температурной стабильностью по сравнению с ФДГ из других источников. К недостаткам SauFDH относятся высокие значения констант Михаэлиса по NAD^+ и формиату. Основная цель данного исследования заключается в поиске значимых аминокислотных остатков и улучшении каталитических параметров SauFDH методом сайт-направленного мутагенеза.

Рекомбинантная SauFDH была закристаллизована и была решена структура апо- и холо-форм фермента. По результатам анализа полученных структур предложены положения для замен, а после компьютерного моделирования отобрали и получили наиболее перспективные мутантные ферменты. Были изучены их каталитические свойства и температурная стабильность. Полученные данные подтвердили значимость выбранных остатков - было достигнуто снижение K_M по NAD^+ в 4 раза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 17-04-01662, 18-34-20098).

ПАРАДОКСАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ ПОВЫШЕНИЯ ПРЕДЕЛЬНОГО ВЫХОДА ПРОДУКТА РЕАКЦИИ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ МОЖЕТ БЫТЬ ОБЪЯСНЁН КООПЕРАТИВНЫМИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯМИ

В.И. Бархатов, А.В. Кривошей, П.В. Вржещ
Международный учебно-научный биотехнологический центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В ходе двух последовательных реакций, циклооксигеназной (COX) и пероксидазной (POX), катализируемых гомодимерным ферментом простагландин-Н-синтазой (PGHS), происходит необратимая инактивация фермента. Нестероидные противовоспалительные препараты ингибируют циклооксигеназную активность PGHS. Несмотря на многочисленные исследования и разнообразие выпускаемых препаратов, механизмы их действия до конца не установлены. В работе мы показали, что при низких концентрациях ингибиторов напроксена, толметина, ибупрофена и фенопрофена наблюдается парадоксальный эффект

повышения предельного выхода продукта COX реакции (при предсказуемом уменьшении начальной скорости). Для этих ингибиторов (кроме фенопрофена) также обнаружили феномен отрицательной кооперативности при связывании ингибитора. На примере напроксена было показано, что добавление ингибитора циклооксигеназной реакции повышает предельный выход продукта пероксидазной реакции при отсутствии влияния на начальную скорость, и данный эффект воспроизводится для различных субстратов пероксидазной реакции. Обнаруженные эффекты находят своё объяснение в рамках кооперативных взаимодействий между субъединицами фермента и активными центрами COX и POX реакций в пределах субъединицы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-01150а с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета и оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М.В. Ломоносова.

ФЛЭП-ЭНДОНУКЛЕАЗА FEN1 СТИМУЛИРУЕТ ПРАЙМАЗУ-ПОЛИМЕРАЗУ PrimPol

Д.И. Гагаринская[1], Е.О. Болдинова[1], Е. А. Белоусова[2], Е.О. Мальцева[2], С.Н. Ходырева[2], О.И. Лаврик[2], А.В. Макарова[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН, Москва; [2]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

PrimPol человека – ДНК-праймаза и ДНК-полимераза, участвующая в репликации поврежденных молекул ДНК. Показано, что PrimPol взаимодействует с флэп-эндонуклеазой FEN1 и комплекс двух белков может быть выделен из клеток *E. coli*. ДНК-полимеразная активность PrimPol в значительной степени стимулируется FEN1. С помощью делеционного картирования были идентифицированы два района PrimPol, которые потенциально могут быть вовлечены во взаимодействие. Показано, что делеции в неструктурированной петле каталитического кора (делеция аминокислотных остатков 203-258) и С-концевой области (делеция остатков 471-560) нарушают стимуляцию ДНК-полимеразной активности PrimPol. В то же время делеция 475-560 остатков (475LFKE560) не приводила к снижению стимуляции активности PrimPol флэп-эндонуклеазой FEN1, что может указывать на локализацию участка взаимодействия PrimPol с FEN1 между остатками 471-475. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-14-00354.*

ПОЛУЧЕНИЕ ИНГИБИРУЮЩИХ АПТАМЕРОВ К PrimPol

К.А. Бондаренко, Д.И. Гагаринская, Е.О. Болдинова, А.В. Макарова
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Действие многих современных химиотерапевтических препаратов основано на блокировании репликации быстро делящихся опухолевых клеток с помощью повреждения ДНК. ДНК-праймаза и ДНК-полимераза человека PrimPol осуществляет реинициацию репликации после повреждений ДНК, в том числе после цисплатиновых сшивок, и является перспективной мишенью для создания препаратов для борьбы с химиотерапевтической резистентностью. Аптамеры представляют собой небольшие олигонуклеотидные молекулы, отобранные из библиотек случайных последовательностей ДНК и РНК и образующие прочные комплексы с молекулами-мишенями. Связываясь в функционально важных участках молекулы, аптамеры эффективно ингибируют активности многих белков-мишеней. По специфичности и аффинности аптамеры не уступают антителам, но обладают низкой иммуногенностью. С помощью систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX — «Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment») были получены ДНК-аптамеры к PrimPol человека. После 13 циклов отбора ДНК-аптамеры были клонированы. Получено 22 аптамера, которые на основе нуклеотидной последовательности можно разделить на четыре группы. Все полученные аптамеры содержат структуры G-квадруплекса. На основе нуклеотидной последовательности и прогнозируемой вторичной структуры были отобраны 9 аптамеров длиной 75 нуклеотидов. Три из них обладают ингибирующей активностью по отношению к PrimPol человека. Ранее было высказано предлоложение, о том, что PrimPol может инициировать синтез ДНК только на ДНК-матрицах определенной последовательности. Мы предположили, что центральные участки аптамеров, предположительно, распознаваемые PrimPol, могут служить такими "сигналами" или "точками" инициации синтеза ДНК de novo. Использование центральных консервативных участков полученных аптамеров в качестве ДНК-матриц для тестирования праймазной активности позволило выявить три последовательности, в значительной степени стимулирующих праймазную активность PrimPol. *Работа поддержана грантом РФФИ 18-04-00777.*

ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ СТЕРОИД 7-ГИДРОКСИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА НАНОЧАСТИЦАМИ TiO_2

Я.В. Диченко[1], Н.Е. Боборико[2]
[1]Институт биоорганической химии НАН Беларуси; [2]Белорусский государственный университет, Химический факультет, Минск, Беларусь

Изучение взаимодействия наночастиц полупроводников с ферментами является перспективным с точки зрения создания управляемых каталитических систем. Часто в качестве такого полупроводникового материала выступает диоксид титана, при облучении наночастиц которого светом ультрафиолетового диапазона происходит фотогенерация зарядов, которые могут вступать в окислительно-восстановительные реакции с веществами, содержащимися в системе. Наиболее широко исследованы процессы окисления органических молекул фотогенерированными в диоксиде титана фотодырками или продуктами их взаимодействия с водой. Восстановление белка в системе, содержащей наночастицы диоксида титана, возможно за счет фотогенерированных электронов. В данной работе представлены результаты использования наночастиц TiO_2 для фотохимического восстановления стероид 7-гидроксилазы человека (CYP7B1). Рекомбинантный фермент стероид 7-гидроксилазу человека экспрессировали в клетках *E. coli* и очищали до гомогенного состояния методом аффинной хроматографии. Наночастицы диоксида титана были получены золь-гель методом с использованием тетрахлорида титана и водного раствора аммиака в качестве

прекурсора и осадителя, соответственно, с последующим ультразвуковым диспергированием и стабилизацией концентрированной азотной кислотой. Размер частиц в золе по результатам исследования методом динамического рассеяния света составляет 10-12 нм. Согласно полученным результатам, при облучении системы, содержащей наночастицы диоксида титана (100 мкМ), CYP7B1 (1 мкМ) и редокс-партнер CYP7B1 (НАДФН-зависимая цитохром P450 редуктаза, 2 мкМ) в 50 мМ трис-буфере (pH 7,4), ультрафиолетом с длиной волны 315 нм происходит восстановление стероид-гидроксилазы человека, что фиксируется методом УФ-спектроскопии - наблюдается постепенный рост интенсивности пика поглощения на длине волны 420 нм. При добавлении субстрата в систему зафиксировано образование гидроксилированного продукта. Таким образом, показана возможность восстановления CYP7B1 человека без использования коферментов или химических восстановителей, а за счет фотогенерированных в диоксиде титана зарядов, что открывает широкие перспективы для разработки сенсоров и каталитических систем нового типа, способных селективно вести многоэлектронные каталитические реакции.

ФЛУОРОГЕННЫЙ СУБСТРАТ С ВНУТРЕННИМ ТУШЕНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОТЕАЛИЗИНА

М.А. Карасева[1], К.Н. Чухонцева[1], М.Л. Придатченко[2], И.В. Демидюк[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва, Россия

Протеализин (ПЛН) - металлопротеаза Serratia proteamaculans, которая является прототипом группы ферментов, относящихся к семейству пептидаз M4. Протеализин-подобные протеазы (ППП) широко распространены у бактерий, встречаются у грибов и некоторых архей. Интерес к ППП вызван, прежде всего, их вероятным участием в бактериальном патогенезе животных и растений. Исследования ППП требуют эффективного количественного метода тестирования их активности, однако такой метод до настоящего времени описан не был. В рамках данной работы на основе последовательности сайта автопроцессинга предшественника ПЛН сконструирован флуорогенный субстрат с внутренним тушением флуоресценции - 2-аминобензоил-Arg-Ser-Val-Ile-Lys(2,4-динитрофенил) (2-Abz-RSVIK(Dnp)). С помощью метода масс-спектрометрии установлено, что ПЛН и термолизин (ТЛН), относящийся к тому же семейству, гидролизуют субстрат по единственной связи Ser-Val. При этом эффективность гидролиза ПЛН примерно в 3 раза выше. Кинетические константы гидролиза субстрата в случае ПЛН – KM = 35 ± 4 мкМ и kcat = 21 ± 1 с 1, в случае ТЛН – KM = 33 ± 8 мкМ и kcat = 7 ± 1 с-1. Исследование действия на 2-Abz-RSVIK(Dnp) различных протеаз (ПЛН, ТЛН, трипсин, химотрипсин, савиназа и проназа E) показало, что ПЛН демонстрирует наибольшую эффективность гидролиза Abz-RSVIK(Dnp), однако субстрат не является строго специфичным для этого фермента. Таким образом, предложенный субстрат может быть эффективно использован в количественных исследованиях каталитических свойств ПЛН. Кроме того, субстрат пригоден для определения активности других пептидаз семейства M4 и может стать платформой для разработки панелей при исследованиях субстратной специфичности ферментов семейства. *Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00756.*

КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА РЕДОКС-ПАРТНЕРОВ ТЕРМИНАЛЬНЫХ ОКСИГЕНАЗ ГРУППЫ ACTINOBACTERIA

А.А. Ковалевский[1], Н.В. Струшкевич[1], А.А. Гилеп[1]
[1]Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

В геноме Actinobacteria представлен ряд электрон-транспортных белков, функции которых не установлены. Среди данных редокс-активных белков ферредоксины Fdx, FdxE, FdxA, FdxC; ферредоксин-редуктазы FprA и Fdr; гибридная ферредоксин/ферредоксин-редуктаза FprB. Предполагается что данные белки могут выступать в роли редокс-партнеров терминальных оксигеназ. С целью установления функций вышеперечисленных электрон-транспортных белков нами было осуществлено молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия в клетках *E. coli*, очистка белков Fdx, FdxE, Fdr, FprA, FdxA, FdxC и FprB.

Ферредоксины Fdx и FdxE обладают спектральными характеристиками [3Fe4S] ферредоксинов. Ферредоксин-редуктазы Fdr и FprA содержат FAD в качестве кофактора и имеют UV-Vis спектры, характерные для флавопротеинов. FdxA, FdxC и FprB теряют Fe-S кластеры в процессе очистки в аэробных условиях из-за нестабильности [4Fe4S] кластеров. Проведена сравнительная оценка электрон-транспортных свойств полученных FeS-белков и флавопротеинов.

МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ ХОЛОФЕРМЕНТА ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ. АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

А.В. Кривошей, В.И. Бархатов, П.В. Вржещ
Международный учебно-научный биотехнологический центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Гемопротеин простагландин-Н-синтаза (PGHS) является центральным звеном синтеза простагландинов (регуляторов важных физиологических процессов, медиаторов боли и воспаления) из арахидоновой кислоты. Фермент катализирует две последовательные реакции – циклооксигеназную (ингибируется нестероидными противовоспалительными препаратами) и пероксидазную. Кофактор гем (Fe-протопорфирин IX) связан с пероксидазным сайтом. Удаление гема приводит к полной потере каталитической активности белка, уменьшает его устойчивость к внешним воздействиям, а также понижает сродство фермента к аспирину. Механизм образования холофермента PGHS исследован недостаточно. В литературе установлен обратимый характер образования комплекса апофермента с гемом и приводятся оценки равновесной константы диссоциации (от 5 до 1600 нМ). Исследование кинетики ассоциации и диссоциации холофермента показало, что взаимодействие апофермента PGHS с гемом описывается одностадийной моделью: кинетические константы скорости присоединения гемовой группы к апоферменту и её диссоциации – $2{,}8\times10^{5}$ $М^{-1}\times сек^{-1}$ и $3{,}9\times10^{-3}$ $сек^{-1}$ соответственно, равновесная константа диссоциации – $1{,}4\times10^{-8}$ М, характерное время диссоциации холофермента – 4 мин (25°C, pH 8.0, твин-20 – 0,1% (v/v)), специфическая активность PGHS-

1 – 60 сек$^{-1}$, коэффициент экстинкции холофермента (в максимуме поглощения при 410 нм) – 320 мМ-1×см$^{-1}$. Продемонстрировано, что апофермент, в отличие от холофермента, не инактивируется в присутствии арахидоновой кислоты, а также практически не взаимодействует с обратимыми ингибиторами (напроксен, индометацин, диклофенак), что позволяет сделать вывод о наличии аллостерических взаимодействий между циклооксигеназным и пероксидазным сайтами. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-01150а с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета, и оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.*

ВЛИЯНИЕ PARИЛИРОВАНИЯ PARP1 И PARP2 НА СИСТЕМУ BER В КОНТЕКСТЕ НУКЛЕОСОМЫ

М.М. Кутузов[1,2], Е.А. Белоусова[1,2], Н.В. Малюченко[3], О.И. Лаврик[1,2], С.Н. Ходырева[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск; [3]МГУ им. М.В, Ломоносовва, Москва, Россия

Геном живых организмов постоянно подвергается воздействию различных ДНК-повреждающих агентов. Целостность генома в клетках обеспечивается системами репарации ДНК. Повреждения, которые не вызывают значительных искажений структуры двойной спирали ДНК, обычно исправляются системой эксцизионной репарации оснований (BER). На данный момент эта система хорошо охарактеризована, но детали регулирования все еще не до конца установлены. Компактизация ДНК дополнительно усложняет функционирование систем репарации. Для успешной репарации ДНК как отдельные стадии BER, так и степень компактизации ДНК должны четко регулироваться. Поли(ADP-рибоза)полимераза1 (PARP1) и поли(ADP-рибоза)полимераза2 (PARP2) являются одними из ключевых регуляторов BER, которые также, как известно, участвуют в регуляции ремоделирования хроматина. Мы изучили влияние PARP1 и PARP2 на активность основных ферментов системы BER, таких как APE1 и ДНК-полимераза β, с использованием реконструированных модельных нуклеосом, а так же свободных ДНК. Мы обнаружили, что как PARP1, так и PARP2 оказывают ингибиторный эффект на активность APE1 и ДНК-полимеразы β. Этот эффект ослабляется в условиях поли(ADP-рибозил)ирования. Наши результаты дополнительно подтверждают актуальную в настоящее время модель регуляции взаимодействия PARP1 и PARP2 с ДНК. В частности, при (ADP-рибозил)ировании происходит автополи(ADP-рибозил)ирование PARP1 и PARP2, которая способствует диссоциации белковых комплексов с ДНК или нуклеосомой из-за электростатического отталкивания между ДНК и отрицательно заряженным полимером ADP-рибозы, ковалентно присоединенным к PARP. *Работа поддержана РФФИ 17-00-00097.*

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ FOF1-АТФ-СИНТАЗЫ *BACILLUS SUBTILIS*

Д.О. Третьяков[1], А.С. Лапашина[1,2]
[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Протонная АТФ-синтаза (АТФ-синтаза F-типа, FOF1-комплекс) — ключевой фермент биоэнергетики, сопрягающий трансмембранный перенос протонов с синтезом/гидролизом АТФ. Для синтеза АТФ фермент использует энергию трансмембранной разности электрохимического протонного потенциала, генерируемого цепями переноса электронов. В случае, когда протонный потенциал на мембране низок или отсутствует вовсе, фермент работает как АТФ-зависимая протонная помпа. Несмотря на значение и распространенность FOF1-АТФ-синтаз, среди бактерий достаточно полно охарактеризованы только ферменты *Escherichia coli* и *Bacillus* sp. PS3. В то же время, АТФ-синтаза *Bacillus subtilis* — важного объекта как биотехнологии, так и фундаментальных исследований — до сих пор была изучена весьма слабо. Стоит отметить, что в отличие от *E. coli* и *Bacillus* sp. PS3, адаптированных к специфическим условиям существования, *B. subtilis* — свободноживущий и вынужденный приспосабливаться к постоянно меняющимся условиям (температура, уровень кислорода и пр.) микроорганизм. Изучение фермента B. subtilis поможет понять регуляцию и принципы работы FOF1 АТФ-синтазы свободноживущих мезофильных прокариот и даст материал для сравнения с организмами из других экологических ниш. В ходе настоящей работы была проведена гетерологическая экспрессия FOF1-АТФ-синтазы *B. subtilis* в клетках E. coli, получены очищенные препараты ферментов дикого типа и двух мутантных вариантов и проведена биохимическая характеристика активностей выделенных ферментов. Описано влияние ряда факторов (температура, pH, неорганический фосфат и другие) на активность ферментов, а также исследованы их регуляторные характеристики (ингибирование АТФазной активности магниевым комплексом АДФ и С-концевым доменом субъединицы ε). Полученные данные указывают на отличия в регуляции и работе АТФ-синтаз разных видов бактерий.

НОВЫЙ БЕЛКОВЫЙ ИНГИБИТОР ПРОТЕАЗ – ГОМОЛОГ ПРОПЕПТИДА ПРОТЕАЛИЗИНА

Г.А. Манукян, К.Н. Чухонцева, М.А. Карасева, И.В. Демидюк
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Протеализинподобные протеазы (ППП) – группа пептидаз, относящихся к семейству термолизина. Многие синтезирующие ППП бактерии являются патогенами растений и животных, некоторые – оппортунистическими патогенами человека. Имеются данные, указывающие на участие ППП во взаимодействии бактерий с высшими организмами. Однако биологические функции этих ферментов практически не изучены. Недавно было показано, что в бактериальных геномах гены ППП ассоциированы с генами ингибиторов термолизинподобных протеаз. Обычно гены ингибиторов следуют за генами ППП. Как правило, ингибиторы гомологичны ингибитору протеализина из *Serratia proteamaculans*. Однако проведённый нами биоинформатический анализ показал, что у ряда бактерий, относящихся к роду Xenorhabdus, такие гены отсутствуют, а на их месте обнаружены гены небольших (8^{-10} кДа) гипотетических белков, гомологичных пропептиду протеализина. Наличие гена ингибитора является обязательным для всех других бактерий. Ранее было установлено, что пропептид блокирует активный центр протеализина

и является ингибитором этого фермента. Следовательно, можно предположить, что обнаруженные гипотетические белки также выполняют функцию ингибитора. Для проверки этой гипотезы ген гомологичного пропептиду протеализина гипотетического белка из *Xenorhabdus nematophila* был синтезирован химико-ферментативным методом. На С-конец белка была введена шестигистидиновая последовательность. Синтезированный ген был клонирован в состав вектора pET-23c и экспрессирован в клетках *E. coli* BL21 (DE3). Рекомбинантный белок был очищен методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Было продемонстрировано, что полученный белок эффективно ингибирует протеализин, но практически не оказывает влияния на активность термолизина. Таким образом, нами обнаружена новая группа гомологичных пропептиду протеализина белковых ингибиторов протеаз. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-04-00756.*

МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ ГЛУТАТИНРЕДУКТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ НОВЫМИ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИМИ КОМПЛЕКСАМИ НА ОСНОВЕ ИОНОВ МЕДИ

М.В. Родионова, С.К. Жармухамедов, Л.Ф. Халилова, Я.М. Фейзиев, И.М. Гусейнова, С.И. Аллахвердиев
[1]Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва; [2]Институт фундаментальных проблем биологии, РАН, Пущино, Россия; [3]Институт молекулярной биологии и биотехнологии, НАНА, Баку, Азербайджан; [4]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [5]Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

В настоящее время проблема необходимости поиска новых путей интенсификации производства растительной биомассы особенно актуальна по ряду причин, среди которых можно выделить экспоненциальный рост численности населения; бурное развитие промышленности, использующей в качестве источников сырья продукты промышленного растениеводства; сокращение и вывод из оборота сельскохозяйственных площадей, в том числе вследствие загрязнения агрессивными видами сорных растений. На данный момент особенно актуальна разработка химических агентов, позволяющих эффективно влиять на протекание ключевых реакций растительной клетки (ингибировать или стимулировать), особенно если это осуществляется по новому механизму действия. Многие известные химические соединения (гербициды, поллютанты) ингибируют жизненные процессы клетки, в том числе и за счет развития окислительного стресса (ОС). Глутатион инактивирует свободные радикалы, образующиеся в условиях ОС, разрушает перекисные соединения, реагирует с активными формами кислорода, стабилизирует мембранные структуры, а также удаляет ацильные перекиси, образующиеся в ходе перекисного окисления липидов. Один из основных ферментов антиоксидантной системы клетки – глутатионредуктаза (ГР) – катализирует восстановление окисленного глутатиона. Донором электронов служит НАДФН, образующийся в световых реакциях фотосинтеза. Известно незначительное количество соединений, подавляющих активность ГР. Мы подробно исследовали тип ингибирующего действия синтезированных ранее металлоорганических комплексов меди (II) на активность ГР дрожжей, являющейся удобной и экспериментально обоснованной моделью растительных ГР. Активность ГР оценивали спектрофотометрически, измеряя кинетику изменений поглощения при 340 нм, связанному с окислением НАДФН. Кроме того, были исследованы спектры поглощения окисленной и восстановленной форм ГР, а также влияние на эти формы указанных агентов. Установлено, что новые металлорганические комплексы на основе ионов меди (II) способны окислять ГР, восставленную электронами от НАДФН, конкурируя с глутатионом за редокс эквиваленты от ГР.

Работа поддержана грантом РНФ №19-14-00118 и частично грантом РФФИ №18-54-06017-Аз а.

АКТИВНОСТЬ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ СОИ РАЗЛИЧНОГО ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СУЛЬФАТА МЕДИ(II)

Д.К. Чернышук, Л.Е. Иваченко
Благовещенский государственный педагогический университет, Благовещенск, Россия

Влияние различных факторов среды на растения увеличивает синтез активных форм кислорода, вызывая окислительный стресс. Антиоксидантная система защиты организма участвует в подавлении свободно-радикального окисления. Антиоксидантный комплекс хорошо изучен для растений, но значительный интерес представляют ферменты класса гидролаз, к которым относится кислая фосфатаза. Цель работы – изучить активность кислой фосфатазы сои в условиях окислительного стресса, вызванного действием сульфата меди(II). Материалом для исследования служили семена сои сорта Лидия и дикорастущей сои формы КА-1344. Семена проращивали при температуре +27ºС в чашках Петри в течение 24, 72, 120 и 168 часов при влиянии сульфата меди (0,04 мМ). Контролем являлись образцы пророщенной культурной и дикорастущей сои на дистиллированной воде без добавления соли. Белок в экстрактах определяли по методу Лоури, удельную активность кислой фосфатазы – спектрофотометрическим методом с п-нитрофенилфосфатом в качестве субстрата, пероксидазы – по методу Бояркина. Множественные формы кислой фосфатазы выявляли методом электрофореза в 7,5% ПААГ. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли реакцией между МДА и тиобарбитуровой кислотой. В ходе исследований установлено, что интоксикация сульфатом меди вызывает окислительный стресс в сое, что подтверждается увеличением содержания МДА и изменчивостью удельной активности пероксидазы. При интоксикации культурной сои сульфатом меди(II) в течение семи суток зафиксирован пик активности фермента. Для дикорастущей сои отмечена стабильная удельная активность и множественность фермента, наибольшее падение активности относительно контроля зафиксировано на седьмые сутки воздействия сульфата меди. В проростках культурной сои установлена стабильность множественных форм на пятые сутки воздействия, на третьи и седьмые сутки выявлены новые формы фермента относительно контроля. Увеличение или стабильность числа множественных форм кислых фосфатаз культурной и дикорастущей сои в условиях окислительного стресса, вызванного действием сульфата меди(II), свидетельствует о высоком адаптивном потенциале культурной и дикорастущей сои к воздействию данного металла.

БЕЛКИ ПРОТЕАЛИЗИНОВОГО ОПЕРОНА НЕ СЕКРЕТИРУЮТСЯ КОНСТИТУТИВНО

К.Н. Чухонцева[1], В.В. Сальников[2], И.В. Демидюк[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН, Москва; [2]Казанский (Приволжский) федеральный университет и Казанский институт биохимиии и биофизики ФИЦ «Казанский научный центр РАН» Казань, Россия

Протеализин (ПЛН) – цинксодержащая металлопротеаза Serratia proteamaculans – прототип новой группы пептидаз, выделенной внутри семейства M4. Протеализинподобные протеазы (ППП) широко распространены в бактериях, а также встречаются в грибах и археях. Биологическая функция ППП не изучена, однако, имеющиеся данные указывают на вовлеченность ферментов этой группы во взаимодействие бактерий с высшими организмами. Нами было обнаружено, что в геномах бактерий гены ППП всегда ассоциированны с генами гипотетических консервативных белков. На модели ПЛН и гипотетического белка из *S. proteamaculans* было показано, что гены организованы в оперон, а гипотетический белок является эффективным ингибитором ПЛН. Ассоциация протеазы с ингибитором предполагает наличие механизма регуляции активности фермента, для выяснения которого необходимы данные о клеточной локализации обоих белков. Распределение белков протеализинового оперона между клетками и культуральной жидкостью в периодической культуре *S. proteamaculans* было оценено методом иммуноблоттинга, и установлено, что более 95% обоих белков ассоциировано с клеткой. При этом ПЛН накапливается в клетке в виде неактивного предшественника, который активируется после лизиса клетки. Анализ методом иммуноэлектронной микроскопии показал, что белки равномерно распределены в цитоплазме. Таким образом, белки протеализинового оперона не секретируются конститутивно. Активация ПЛН вне клетки позволяет предположить, что его функции также реализуются вне клетки-продуцента, а секреция является индуцибельной. Цитоплазматическая локализация ингибитора предполагает наличие внутри клетки зрелого ПЛН, активность которого должна быть подавлена. Основываясь на этом, можно предположить, что существует механизм доставки активного ПЛН в клетку извне, а ингибитор является защитой клетки-продуцента от нежелательного действия фермента. Эта ситуация напоминает известные пары токсин-антитоксин, являющиеся элементами систем межбактериальной конкуренции. Таким образом, нами впервые получены данные о локализации ПЛН и его ингибитора в клетках *S. proteamaculans*. Эти данные позволяют предположить, что ППП не только вовлечены во взаимодействие бактерий с высшими организмами, но и участвуют в межбактериальной конкуренции.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00756.

ДНК-ПОЛИМЕРАЗНАЯ И 3'-5'-ЭКЗОНУКЛЕЗНАЯ АКТИВНОСТИ POLX *DEINOCOCCUS RADIODURANS*

Е.С. Шилкин, М.А. Простова, М.В. Никитин, Д.М. Есюнина, А.В. Макарова, А.В. Кульбачинский
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Отличительной чертой бактерии *Deinococcus radiodurans* является очень высокая устойчивость к действию ионизирующего излучения, индуцирующего двунитевые разрывы ДНК. Потенциальную роль в репарации может играть ДНК-полимераза X-семейства PolX. В рамках данной работы была выделена рекомбинантная PolX D. radiodurans из *E. coli*. Показано, что PolX обладает 3'-5'-экзонуклеазной активностью, которая стимулируется ионами Mn^{2+}. В то же время, добавление ионов Mg^{2+} стимулирует ДНК-полимеразную активность PolX. Показано, что PolX преимущественно включает комплементарные dNTPs напротив неповрежденных оснований, но с достаточно высокой эффективностью включает dATP напротив матричных пуринов. Были протестированы ДНК-матрицы, содержащие различные повреждения ДНК: O6-ме-Г, 8-оксо-Г, N6-этеноаденин (εA), тимин-тиминовые димеры и апуриновые/апиримидиновые сайты. Показано, что тимин-тиминовые димеры и εA полностью блокируют PolX. В то же время белок способен проходить O6-ме-Г, 8-оксо-Г и АП-сайты. PolX преимущественно включает dTTP напротив O6-ме-Г, dATP напротив АП-сайта и dATP и dCTP напротив 8-оксо-Г. Таким образом, PolX демонстрирует свойства транслезионной ДНК-полимеразы с низкой точностью напротив пуринов и экзонуклеазной активностью.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-14-01393.

ПОРОФОРМИРУЮЩИЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ И МИТОХОНДРИИ: ТЕСТ НА ТОКСИЧНОСТЬ

М.Х. Дуржинская[1], Д.А. Аливердиева[2], Д.В. Мамаев[3]
[1]НИИ глазных болезней, Москва; [2]Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, Махачкала; [3]Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия,

Пороформеры – это группа липофильных соединений различной природы (пептиды, липопептиды, гликолипопептиды и полиеновые соединения), формирующие поры в биологических и искусственных мембранах. В настоящее время в клинической практике используются 10 антибиотиков из этой группы для лечения инфекционных болезней, вызванных устойчивыми к другим антибиотикам микроорганизмами. Известно, что потенциальными лекарствами являются пороформеры полипептиды – аламетицин, мелиттин и мастопаран. В присутствии аламетицина имеет место синергическое повышение эффективности эндофлоксацина при лечении респираторных болезней, вызываемых *Mycoplasma pulmonis*. Мастопаран предотвращает метастазообразование в модельных экспериментах и является потенциальным агентом против септического шока. Мелиттин рассматривается как перспективное средство при лечении карциномы печени и как малотоксичный противоопухолевый препарат. Несмотря на многочисленные публикации и большой интерес исследователей, механизмы антимикробного действия антибиотиков-пороформеров требуют дальнейшего изучения. Нами показано, что калиевый трансмембранный ток, индуцированный в митохондриях печени крыс этими пептидами, линейно зависит от степени активации ими дыхания. Это позволило использовать препарат органелл как сенсор этого тока. Определено соотношение степеней активации дыхания аламетицином, тетраацетилмелиттином, мелиттином или мастопараном в монокалиевой и монолитиевой средах при одинаковом значении $\Delta\Psi$ (соответственно, 1.59±0,04, 1.39±0.01, 1.12±0,03 и 1.18±0.02). С учетом того, что соотношение чисел переноса (соотношение подвижностей) для K^+ и Li^+ в растворе с ионной силой, такой же, как в средах инкубации – 1.53, сделано предположение,

что в присутствии аламетицина и тетраацетилмелиттина проводимость лимитируются реакцией образования поры, а в присутствии мелиттина или мастопарана – стадией, предшествующей порообразованию. Существенно, что первые два полипептида радикально подавляют трансмембранный потенциал митохондрий в ходе активации дыхания митохондрий, а остальные два умеренно, до некоторого стабильного состояния. Причем последнее сопоставимо по величине с эффектом физиологических активаторов дыхания (АДФ). Это означает, что такие соединения потенциально менее гепатотоксичны.

СРАВНЕНИЕ И ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА СИНТЕЗА ЭНТЕРОЦИНА В

И.А. Перемолотова, Е.А. Кампе-Немм, В.М. Шпень, Алексей А. Колобов
ГНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Энтероцин B (ENDHRMPNELNRPNNLSKGGAKCGAAIAGGLFGIPKGPLAWAAGLANVYSKCN, дисульфидная связь C23-C52) [1] получен методом нативной химической лигации фрагментов (1-21) и (22-53) с использованием Boc-технологии и путём последовательного наращивания полипептидной цепи с использованием Fmoc-технологии с микроволновым нагревом на синтезаторе «CEM Lyberty». После деблокирования и отщепления от полимерной матрицы грубые продукты со свободными сульфгидрильными группами были очищены с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ и окислены перекисью водорода для образования S-S связей с последующей финальной ВЭЖХ-очисткой дисульфидов. Выход целевого полипептида, полученного при использовании микроволнового нагрева, был ~ в три раза выше, чем в варианте сшивки двух незащищенных фрагментов. Установлено, что энтероцин B подавляет рост грамположительных бактерий *Listeria monocytogenes, L. innocua, Lactobacillus sake, L. fermentum, Enterococcus faecalis, Leuconostoc* sp., *Lactococcus* sp., *Clostridium sporogenes, C. tyrobutyricum, Staphylococcus aureus, S. carnosus, Carnobacterium* sp. и не проявляет биоцидной активности в отношении грамотрицательных бактерий [2], за исключением *Helictobacter pilori* [3].

1. Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, Nes IF, Hernández PE, Holo H. Enterocin B, a new bacteriocin from Enterococcus faecium T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiol Read Engl. июль 1997 г.;143 (Pt 7):2287–94.
2. Ермоленко ЕИ. Бактериоцины энтерококков: проблемы и перспективы использования (обзор литературы). Вестник Санкт-Петербургского Университета Серия 11 Медицина. 2009 г.
3. Baryshnikova et al. Int J Clin Med Microbiol 2017; 2: 123.

ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИЗАРГАМА

Александр А. Колобов[1], М.П. Смирнова[1], С.Ю. Штрыголь[2], Р.Д. Дейко[2]
[1]ГНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия [2]Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, Украина

Цель исследования – выяснение спектра и механизмов церебропротекторного действия нового пептидного препарата Лизаргам. Установлено, что Лизаргам проявляет защитные свойства при церебральной ишемии и болезни Альцгеймера (БА). Препарат повышает выживаемость крыс, снижает уровень нейрон-специфической энолазы, белка S100 и фрагментацию ДНК в головном мозге (ГМ) при остром нарушении мозгового кровообращения (ОНМК), что свидетельствует об уменьшении нейродеструкции и нейроапоптоза. При ишемии ГМ с последующей реперфузией препарат полностью восстанавливает показатели церебральной и системной гемодинамики, препятствуя развитию синдрома невосстановления кровотока. Интегральному защитному эффекту при ОНМК способствуют нейротрофические (снижение оверэкспрессии фактора роста нервов), а также цитокин-опосредованные противовоспалительные свойства. При систематическом применении Лизаргам эффективно редуцирует когнитивный и неврологический дефициты. На модели БА Лизаргам устраняет когнитивные нарушения и восстанавливает функциональную активность ГМ. Фармакологическая активность препарата в этих условиях опосредована как улучшением нейромедиаторного профиля (восстановление уровня ацетилхолина в синаптосомах), так и нейропротекторными свойствами (уменьшение накопления β-амилоидного белка, повышение количества функционально полноценных нейронов в гиппокампе и коре ГМ). Выраженный нейропротекторный эффект Лизаргама дополняется благоприятным спектром психотропных свойств. Он проявляет ноотропные свойства (стимулирует все фазы памяти и рассудочную деятельность животных), ослабляет симптомы кофеин-индуцированной тревоги, значительно облегчает течение резерпин-индуцированной депрессии у крыс. Антиапоптотическая активность Лизаргама опосредована активацией киназы Akt1, способствующей выживанию клеток через ингибирование ключевых элементов активации апоптоза – фосфорилированных форм каспазы 8 и белков Bad и p53. Вероятно, пептид является позитивным регулятором внутриклеточного сигнального пути PI3K/Akt/mTOR. По результатам проведенных доклинических испытаний, Лизаргам имеет индекс безопасности >5 и относится к III классу малоопасных лекарственных препаратов. Таким образом, Лизаргам представляет собой перспективный для клинического изучения нейропротекторный препарат.

ПОИСК НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

К.В. Шевченко, Л.А. Андреева, И.Ю. Нагаев, В.П. Шевченко, Н.Ф. Мясоедов
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Проведен синтез более десятка производных дофамина и серотонина. Из них выбраны 5 претендентов для использования в биологических исследованиях, для чего, в частности, применялись компьютерные программы.

На первом этапе пептидные производные дофамина и серотонина (Boc-Gly-Pro-DOPA, Z-Gly-Pro-DOPA, LA-Gly-Pro-DOPA, Boc-Gly-Pro-Srt, Z-Gly-Pro-Srt) тестировали на устойчивость в присутствии лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз B и Y. В результате установлено, что все синтезированные соединения обладают высокой устойчивостью к действию как амино-, так и карбоксипептидаз. Исходные соединения сохраняются в инкубационной смеси, в отличие, например, от семакса

в течение многих часов, что, по-видимому, объясняется и наличием пролинового остатка, и наличием защитных групп на N-концевой аминокислоте.

На втором этапе исследовали устойчивость пептидных производных дофамина и серотонина в присутствии пролиновой эндопептидазы (PEP). Показано, что форма кинетических кривых при протеолизе для всех соединений идентична. Устойчивость к протеолизу этих пептидных производных значительно увеличивается в ряду соединений с Z-защитой, с Boc-защитой и с защитой лауриновой кислотой. Исследование продуктов реакции под действием PEP показало, что протеолиз происходит по связи между DOPA (Srt) и пролином.

На третьем этапе исследовали устойчивость пептидных производных дофамина и серотонина в присутствии плазмы крови крыс. Показано, что основные закономерности, установленные для фирменных ферментов, сохраняются. Наиболее устойчивым среди производных дофамина оказалось соединение с лауриновой кислотой, затем следуют соединения с Boc-защитой и, наконец, с Z-защитой. Таким образом, в присутствии ферментов крови крыс производные дофамина и серотонина вполне устойчивы. Следовательно, синтезированные производные DOPA и Srt могут быть в течение долгого времени источниками дофамина и серотонина. Они могут оказаться препаратами, которые можно будет использовать для продолжительного воздействия на патологические процессы с целью их локализации и лечения.

Работу проводили при частичной поддержке программ Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» и «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии».

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ СТРУКТУРА – БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В РЯДУ АНАЛОГОВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ИНДОЛИЦИДИНА

М.П. Смирнова[1,2], И.В. Афонина[1], Н.И. Колодкин[1], О.В. Шамова[3], Л.И. Стефаненко[1], Алексей А. Колобов[1,2]
[1]ГНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России; [2]ООО «Научно-производственная фирма Верта»; [3]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Эндогенные антимикробные пептиды и их химически модифицированные синтетические аналоги являются перспективными молекулами, на основе которых возможно создание инновационных лекарственных средств, не формирующих развитие резистентности у патогенных микроорганизмов. Одним из представителей таких пептидов является индолицидин, который обладает широким спектром биоцидной активности. Однако высокая цитотоксичность пептида в отношении эукариотических клеток существенно снижает возможности его применения. Были синтезированы аналоги индолицидина, в которых остаток триптофана заменен на неприродные ароматические аминокислоты – производные фенилаланина, в том числе, с различными электронно-донорными и электронно-акцепторными заместителями: D-фенилаланин-аналог VI(A-VI), 4-нитрофенилаланин – (A-III), 4-хлорфенилаланин – (A-IV), 4-метоксифенилаланин – (A-V), 4-аминофенилаланин – (A-VII), 4-аминобензоилфенилаланин – (A-VIII), 4-третбутилфенилаланин – (A-X), 2-метилфенилаланин – (A-XI), 4-фторфенилаланин – (A-XII), гомофенилаланин – (A-IX), пентафторфенилаланин – (A-XIII), 2-трифторметилфенилаланин – (A-XIV), аналог VI, ацилированный по α-аминогруппе пальмитоильным – (A-XV) или аминоундеканоильным – (A-II) остатком. Показано, что все синтезированные пептиды имели высокую биоцидную активность, как в отношении грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, включая антибиотикоустойчивые штаммы. Наибольшую активность проявили аналоги A-II, A-VI и A-XI (МИК – 1-5 мкг/мл). Аналоги A-II, A-IV, A-VI, A-VIII, A-XI и A-XIII проявляли биоцидную активность в отношении плесневых грибов и дрожжей (МИК – 3-10 мкг/мл). Аналоги A-II, A-VI, A-XI в дозах, превышающих 200 мкг/мл, не вызывали гемолиз эритроцитов. В дозах 2-20 мкг/мл аналоги A-II, A-VI и A-XI вызывали снижение инфекционной активности вируса гриппа H3N2, аденовируса 3-го серотипа и вируса парагриппа 3 типа более, чем на 3 порядка. В дозах 0,4-10 мкг/мл аналоги A-II, A-VI и A-XI усиливали спонтанную пролиферацию спленоцитов, а также ингибировали действие ЛПС на их пролиферацию. Наиболее перспективным оказался аналог A-II, молекула которого имеет структуру – HN2-(CH2)10-CO- Ile-Leu-Pro-dPhe-Lys-dPhe-Pro-dPhe-dPhe-Pro-dPhe-Arg-Arg-NH2.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫХ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ БЕЛКОВОГО ТРАНСПОРТА МЕЖДУ КЛЕТКАМИ НА ПРИМЕРЕ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА

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

На протяжении последних 30 лет во всем мире безостановочно ведутся исследования по изучению механизмов доставки различного рода препаратов в определенные клетки и ткани человека, с целью расширения терапевтического окна, минимизации побочных эффектов, а также для решения проблем с растворимостью и стабильностью действующих веществ. В качестве носителей предложено множество различных субстанций разнообразной природы и их модификаций. Совсем недавно группе профессора Нейла Кинга путем моделирования белок-белковых взаимодействий удалось создать генетически кодируемые внеклеточные везикулы (ГКВВ), представляющие собой полые самособирающиеся трехмерные белковые каркасы, загруженные рекомбинантным белком, покрытые липидной мембраной, и способные к самостоятельному выходу из клетки-продуцента. К сожалению, технология продукции описанных наноконтейнеров являлась довольно дорогостоящим и трудоемким процессом, требующим одновременной ко-трансфекции тремя генетическими конструкциями, что значимо затрудняло возможность терапевтического применения данных агентов. В представленной работе мы решили данную проблему путем создания единой лентивирусной конструкции, сочетающей в себе все необходимые элементы для доставки белка в составе ГКВВ. Вторым недостатком исходной системы являлась высокая цитотоксичность компонента Vpr, обеспечивающего преимущественную загрузку наноконтейнеров таргетируемым рекомбинантным белком. Для решения проблемы токсичности мы заменили фрагмент Vpr на комплекс Jun-Fox и подтвердили функциональность новых конструкций. В данной работе нам уда-

лось показать не только правильную сборку модифицированных наноконтейнеров, продуцируемых в системе E.coli, но и продемонстрировать возможность доставки терапевтических фрагментов основного белка миелина в составе ГКВВ в клетки млекопитающих, что в дальнейшем может быть использовано для лечения рассеянного склероза.

Исследования были проведены в рамках проекта РНФ №18-74-10079 – «Самособирающиеся генетически кодируемые наноконтейнеры как инструмент лечения рассеянного склероза».

ПОЛУЧЕНИЕ Fab-scFv НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К ИНТЕРФЕРОНУ БЕТА-1А ЧЕЛОВЕКА И АНТИТЕЛА ТРАСТУЗУМАБ

В.А. Топорова[1], А.А. Панина[1], В.С.Рыбченко[2], Д.С. Балабашин[1], В.В. Аргентова[2], О.Н.Солопова[3], Т.К. Алиев[2], Д.А. Долгих[1], П.Г. Свешников[3], М.П. Кирпичников[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]МГУ им. М.В.Ломоносова; [3]Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва, Россия

Одной из стратегий получения биспецифических антител являются так называемые Fab-scFv. Они представляют собой объединение Fab-фрагмента одного антитела и одноцепочечного варианта другого антитела. На основании кодирующих последовательностей двух антител к интерферону бета-1а человека и антитела Трастузумаб нами получены два типа Fab-scFv: 1) одноцепочечные варианты антител к интерферону бета-1а человека присоединены к С-концу Fab-варианта тяжелой цепи антитела Трастузумаб, 2) одноцепочечные варианты антитела Трастузумаб присоединены к С-концу Fab-варианта тяжелой цепи антител к интерферону бета-1а человека. Для упрощения выделения целевых белков с помощью аффинной хроматографии на С-конец scFv помещена гексагистидиновая последовательность. В качестве линкера между Fab и scFv использована последовательность EPSGP и последовательность (GGGGS)3. В качестве линкера между вариабельными доменами в scFv использованы последовательности (GGGGS)4 и (GGGGS)6. Эти линкеры были выбраны на основании литературных данных. Разработаны векторы для биосинтеза Fab-scFv в клетках эукариот и система очистки целевых белков. Fab-scFv на основе антител к интерферону бета-1а человека и антитела Трастузумаб были выделены и охарактеризованы. Показано, что целевые белки функционально активны. *Работа выполнялась при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Согл. № 14.604.21.0189, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0189).*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА С С ПРИРОДНЫМИ И ИСКУССТВЕННЫМИ ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ

И.Д.Гусев[1,2], А.М.Фирсов[3], Р.В.Черткова[1], Е.А.Котова[3], Ю.Н.Антоненко[3], Д.А.Долгих[1,4], М.П. Кирпичников[1,4]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Российский университет дружбы народов; [3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; [4]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Гемсодержащий белок цитохром с, один из ключевых компонентов митохондриальной дыхательной цепи, переносит электроны от убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы (комплекс III) к цитохром с-оксидазе (комплекс IV) за счет редокс-потенциала Fe^{3+}/Fe^{2+} пары. Наряду с участием в электронном транспорте его важнейшей функцией является инициация клеточного апоптоза путем участия в формировании апоптосомы. Известно, что взаимодействие цитохрома с с кардиолипином значительно усиливает его пероксидазную активность. Предполагается, что посредством запуска перекисного окисления мембранных липидов пероксидазная активность способствует выходу цитохрома с из митохондрий в цитозоль. Известно также, что кардиолипин формирует мембранный сайт для связывания цитохрома с в митохондриях также и в условиях гомеостаза. Механизмы взаимодействия цитохрома с с кардиолипином в мембранах остаются не до конца изученными. Целью работы является изучение взаимодействия флуоресцентно-меченого цитохрома с с мембранами митохондрий и митопластов, а также с кардиолипин-содержащими моноламеллярными липосомами различного состава. В качестве флуоресцентного красителя был выбран водорастворимый сульфо-цианин в виде малеимида - активированной формы флуорофора, используемой для мечения тиольных групп белков и пептидов. С помощью сайт-направленного мутагенеза были получены мутантные варианты цитохрома с с заменой на остаток Cys. Соответствующие рекомбинантные белки выделены по ранее разработанной схеме. Введение флуоресцентной метки в молекулу цитохрома с осуществляли в ходе реакции между остатком Cys и малеимидом сульфоцианина, продукт реакции очищали методом гель-фильтрации. При помощи метода флуоресцентой корреляционной спектроскопии было показано, что эффективность связывания цитохрома с во всех трех случаях существенно снижается при увеличении ионной силы в среде измерения и зависит от редокс-состояния белка, а также линейно возрастает с повышением процентного содержания кардиолипина в составе липосом. Показано, что для вытеснения флуоресцентно-меченого белка с поверхности мембран митопластов требуется в несколько раз более высокая концентрация немеченого цитохрома с, чем в случае мембран митохондрий или липосом. *Работа выполнена при финансовой поддержке Программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

СОЗДАНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОЙ БИБЛИОТЕКИ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АФФИННЫХ РЕАГЕНТОВ

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

Малый размер, высокая химическая и термическая стабильность, а также возможности распознавания «скрытых» эпитопов делают однодоменные антитела (sdAb) семейства Camelidae привлекательными кандидатами на роль таргетирующих доменов иммунотоксинов, биспецифических антител и химерных антигенных рецепторов, а также реагентов для иммуноферментного анализа (ИФА). Создание комбинаторной библиотеки однодоменных гуманизированных антител позволит получить инстру-

ментарий для высокопроизводительного получения низкоиммуногенных антител практически к любым мишеням без использования лабораторных животных. Для введения направленного разнообразия в CDR выбранного каркасного антитела проанализировано разнообразие VH регионов более, чем 1000 sdAb, а также их зародышевых («germline») последовательностей. В CDR1-2 введено направленное разнообразие, ограниченное природными вариантами антител, прошедшими аффинное созревание, CDR3 рандомизировался полностью. Единое каркасное антитело позволят рассчитывать на подобие физико-химических и иммунобиологических свойств всех изолируемых кандидатов. С использованием мутагенеза Кюнкеля сконструирована комбинаторная библиотека гуманизированных sdAb для фагового дисплея с разнообразием не менее 1¬0 млрд. независимых клонов. Использования sdAb антител в твердофазном ИФА требует их модификации методами генетической инженерии. sdAb практически полностью теряют антиген-связывающие свойства после иммобилизации на поверхности лунок полистирольного планшета. Кроме этого, традиционные методы химической конъюгации с биотином ведут к падению аффинности sdAb. Нами предложен метод получения химерного белка sdAb с пентамеризующимся α-спиральным доменом и полистирол-связывающим пептидом, идентифицированным нами ранее в ходе пептидного фагового дисплея. Показано сохранение антиген-связывающих свойств данного химерного белка при иммобилизации пассивной адсорбцией. Кроме этого, пентамеризация sdAb способна повысить чувствительность ИФА системы благодаря эффекту авидности. Для детекции аналита в ИФА «сэндвич» получена система коэкспрессионного биотинилирования по С-концевому пептиду avi-tag. В данной работе создан универсальный инструментарий для получения однодоменных антител к любым мишеням и их использования в ИФА и потенциально терапевтических применений.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОЙ СЕКРЕТОРНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ А2 ПРИ ЭКСПРЕССИИ В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *PICHIA PASTORIS*

С.Ю. Филькин, Н.В. Чертова, А.А. Зенин, А.В. Липкин, Э.Г. Садыхов, А.Н. Федоров
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Получен эффективный рекомбинантный штамм метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*, продуцирующий с высоким выходом функционально-активную секреторную фосфолипазу А2 из *Streptomyces violaceoruber*. Отработан метод выделения и очистки рекомбинантной функционально-активной фосфолипазы А2 до концентрации в 4 мг/мл. Очищенная фосфолипаза А2 охарактеризована методами кругового дихроизма. Получены данные по влиянию различных двухвалентных катионов на температурную стабильность ФЛА2. Полученные данные позволяют масштабировать процесс выделения и очистки для получения высокоочищенной ФЛА2 для использования в агропромышленном и пищевом производстве. *Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по соглашению от 31.05.2018 г. № 14.607.21.0207 (УИН RFMEFI60718X0207)"*

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ НА ВЗАИМОСВЯЗЬ РИАНОДИНОВОГО РЕЦЕПТОРА И SERCA2

О.М. Алексеева[1], А.В. Кременцова[1], А.Н. Голощапов[1], Ю.А. Ким[2]
Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эммануэля, Москва; [2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Основные белковые компоненты мембран депо ионов Ca^{2+}- саркоплазматического ретикулума (СР), - это рианодиновый рецептор (РиР) и Ca^{2+}-АТФаза SERCA2. При активации мышечного сокращения РиР формирует канал освобождения ионов Ca^{2+}из люмена терминальных цистерн ретикулума, приближенных к внешней мембране мышечного волокна. При релаксации Ca^{2+}-АТФаза в продолговатых трубочках, окружающих акто-миозиновый сократительный аппарат, закачивает ионы Ca^{2+} в люмен СР. Ионы Ca^{2+}затем переходят по градиенту концентрации в люмене из продолговатых трубочек в терминальные цистерны и связываются с люменальными белками. Для осуществления быстрого взаимодействия РиР и SERCA 2 необходимо существование определенного уровня наполнения СР ионами Ca^{2+}- градиент концентрации ионов Ca^{2+} через мембрану СР 5Мм. Для экспериментальной имитации этого процесса на фрагментах СР (ФСР) была проведена нагрузка ионами Ca^{2+} в присутствии в среде инкубации оксалата Na^{+}, который связывает ионы Ca^{2+}. Затем проводили измерения эффективности работы РиР и Ca^{2+}-АТФазы. В качестве модуляторов использовали варьирование концентраций следующих веществ: хаотропного мембранотропного агента - свободной жирной кислоты (СЖК), стимуляторов РиР – кофеина и его аналогов, ионов Mg^{2+}. Известно, что изменение концентрации ионов Mg^{2+} влияет на активность, как Ca^{2+}-АТФазы, так и РиР [1,2].

Показано, что присутствие СЖК, ионов Mg^{2+} и кофеина изменяет параметры работы ФСР, как депо ионов Ca^{2+}. Кофеин снижает эффективность транспорта Ca^{2+} Ca^{2+}-АТФазой, усиливая выход Ca^{2+} через РиР-Ca^{2+}канал с увеличением чувствительности РиР к Ca^{2+}. Эффект кофеина на снижение эффективности транспорта Ca^{2+} усиливается в присутствии СЖК в ФСР, и снижается при экстракции СЖК из ФСР. Увеличение концентрации Mg^{2+} усиливает эффект кофеина. Это указывает на сочетанное воздействие на Ca^{2+}-связывающие центры Ca^{2+}-АТР-азы и РиР кофеина и Mg^{2+} в механизме функционирования Ca^{2+}-депо СР и его нарушениях.

1. Zafar S., Hussain A., Liu Y., Lewis D., Inesi G. (2008). Specificity of ligand binding to transport sites: Ca^{2+} binding to the Ca^{2+} transport ATPase and its dependence on H^{+} and Mg^{2+} // Arch Biochem Biophys. V. 476. N 1. P. 87–94.
2. Laver D.R. (2018) Regulation of the RyR channel gating by Ca^{2+} and Mg^{2}. // Biophys. Rev. N. 4. P. 1087-1095.

ГЕНОМ. ПРОТЕОМ. МЕТАБОЛОМ

Устные доклады

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СОСТАВА МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН ЧЕЛОВЕКА

Э.В. Генерозов[1], О.В. Борисов[1], Н.А. Кулемин[1], Р.И. Султанов[1], К.А. Бабалян[1], Е.А. Семенова[1], Д.В. Попов[2], А.К. Ларин[1], Е.С. Кострюкова[1] И.И. Ахметов[1]

[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Индивидуальная вариабельность состава мышечных волокон в крупных скелетных мышцах человека достаточно высока. Так, соотношение быстрых (IIX, IIA) и медленных (I) типов мышечных волокон в латеральной широкой мышце бедра в целом придерживается 50%, хотя границы вариабельности могут различаться от 5 до 90%. Потенциальная роль генетических факторов в такой вариабельности по близнецовым исследованиям составляет около 40–50%. В меньшей степени исследована в этом аспекте роль эпигенетических изменений, таких как метилирование ДНК. В ходе настоящей работы выполнены ассоциативные генетические и эпигенетические исследования гистоморфометрических показателей образцов мышечных волокон в пределах групп профессиональных спортсменов различной специализации и группы контроля.

Соотношение мышечных волокон по данным иммуногистохимического анализа биопсии четырехглавой мышцы бедра было определено для группы в 171 человек. Генотипирование ДНК лейкоцитарной фракции крови (>960 000 маркеров) проводили с использованием ДНК-чипа Illumina Omni Express Exome 8. Анализ метилирования ДНК в мышечной ткани для подгруппы из 48 участников – с использованием ДНК чипа Infinium MethylationEPIC BeadChip (>850000 CpG сайтов). Для метаанализа использовали ранее полученные данные по генотипам профессиональных спортсменов (>1200 человек), (HumanOmni1-Quad BeadChips (более 1 млн маркеров)).

Анализ полученных данных показал, что в целом, индивидуальные особенности композиции мышечных волокон в большей степени ассоциированы со структурными вариациями в генах, нежели эпигенетическими изменениями. Так, достоверная ассоциация с типом волокон была показана для 2169 дифференциально метилированных CpG-сайтов, что составляет 0,3% от всех проанализированных. Эти сайты преимущественно локализованы в суперэнхансерных регионах, специфичных для мышечной ткани, а также находятся в близости с сайтами связывания транскрипционных факторов, взаимодействующих с рецепторами стероидных гормонов. В свою очередь, генетическая модель, построенная с использованием метода полигенных баллов и кросс-валидации, включила 49105 генетических вариантов и была статистически-значимо ассоциирована с фенотипом мышечных волокон (R^2=0.087, p=0.00012).

Суммарно, по результатам ассоциативных генетических исследований выявлено 9 новых, генетических вариантов, ассоциированных с преобладанием волокон I или II типа; 10 новых маркеров, ассоциированных с показателями гипертрофии мышечных волокон и силовыми/скоростными характеристиками; впервые выявлена ассоциация аллеля риска ожирения полиморфизма rs9939609 гена FTO со сниженным количеством мышечных волокон I типа; установлена зависимость полиморфизма rs4409473 NACC2 с выносливостью, аэробной работоспособностью и капиллярной плотностью мышечных волокон.

ГЕТЕРОХРОМАТИЗАЦИЯ УЧАСТКА ТРЕТЬЕЙ ХРОМОСОМЫ, ВКЛЮЧАЮЩЕГО МЕГАБАЗНУЮ ДУПЛИКАЦИЮ, В КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТА С НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ

М.М. Гридина[1], С.В. Ульянов[2], П.М. Белокопытова[1], В.С. Фишман[1], О.Л. Серов[1]

[1]ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; [2]Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Хромосомные перестройки в дистальном участке короткого плеча третьей хромосомы (3p26.3) напрямую связаны с нарушениями умственного развития. В этом районе расположены три гена: CHL1, CNTN6 и CNTN4, кодирующие молекулы клеточной адгезии, чьи функции важны для правильного развития нервной системы. Ранее были описаны два пациента с недифференцированной умственной отсталостью, у которых методом array-CGH были выявлены микроделеция или микродупликация в районе 3p26.3, обе перестройки затрагивали единственный ген – CNTN6, кодирующий белок контактин-6 (Kashevarova et al., 2014). Полногеномное секвенирование ДНК этих пациентов позволило определить точные границы обеих хромосомных перестроек, и не выявило каких-либо дополнительных структурных нарушений ни в самом гене, ни во фланкирующих последовательностях. Мы получили линии пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и дифференцировали *ux in vitro* в кортикальные нейроны. Нами обнаружено существенное снижение экспрессии CNTN6 в нейронах как с одной, так и с тремя полноценными копиями этого гена, что может объяснять сходство симптомов, наблюдаемых у пациентов с делециями и дупликациями гена CNTN6. Более детальный анализ экспрессии гена CNTN6 показал, что на фоне общего снижения уровня экспрессии, именно аллель, содержащий дупликацию, функционирует существенно хуже, чем нормальный. В результате анализа данных о трехмерной организации участка генома, включающего эту хромосомную перестройку, нами было замечены признаки гетерохроматизаци данного региона. Анализ меток активного и неактивного хроматина подтвердил нашу гипотезу. Более того репрессивные метки распространялись существенно за пределы хромосомной перестройки. Таким образом в клетках пациента с дупликацией размером 0,94 Mb, затрагивающей единственный белок-кодирующий ген CNTN6, произошла гетерохроматизация участка хромосомы, размером около 7 Mb. Данное событие в свою очередь объясняет причину существенного снижения уровня экспрессии CNTN6, на фоне наличия в геноме трех его полноценных копий.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА

С.Ж. Шарапов[1,2], Я.А. Цепилов[1,2], Г. Лауц[3,4], Ю.С. Аульченко[1,2]
[1]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск Россия; [3]Исследовательская лаборатория Genos Glycoscience, Загреб, Хорватия; [4]Факультет фармацевтики и биохимии, Университет Загреба, Хорватия

Гликозилирование – присоединение углеводного остатка (гликана) – является одним из самых распространенных и важных пост- и ко-трансляционных изменений белков. Известно, что более половины белков человека гликозилированы. Гликозилирование белков влияет как на их физико-химические свойства (растворимость, конформацию, фолдинг и т.п.), так и на их биологическую функцию, включая белок-белковые взаимодействий, взаимодействие белков с рецепторами, клеточные взаимодействия, взаимодействия хозяин-паразит и т.п.. Известно, что изменения в композиции гликома человека ассоциированы с многочисленными заболеваниями, в особенности аутоиммунными. Ферментативная сеть биосинтеза гликанов изучена хорошо, в то время как регуляция данного процесса (в том числе и тканеспецифичная) менее изучена. Нами был проведен цикл работ по исследованию генетического контроля уровней гликозилирования белков плазмы крови человека, а также индивидуальных гликопроетинов. В результате проведения полногеномного анализа ассоциаций уровней N-гликанов на материале нескольких выборок нам удалось показать и подтвердить ассоциацию более чем 20 геномных локусов с представленностью тех или иных гликанов. Путем проведения функционального исследования *in silico* с использованием открытых баз данных и использованием самых современных методов их совместного анализа, в найденных локусах нами были приоритезированы функциональные гены и возможные молекулярно-генетические механизмы найденных ассоциаций. Помимо генов, кодирующих ферменты с известной ролью в процессах биосинтеза гликанов, в ряде локусов нами были приоритезированы гены (такие как *HNF1a, SMARCB1, IGH, IKZF1*), осуществляющие регуляцию данного процесса. Сравнение генных сетей регуляции гликозилирования белков плазмы крови и отдельных белков позволило выявить ряд закономерностей. С одной стороны, мы наблюдаем ожидаемое сходство данных сетей. С другой стороны, ряд генов, таких как *HFN1a (*транскрипционный фактор гепатоцитов*)* осуществляют тканеспецифичную регуляцию процессов гликозилирования белков. Полученные нами результаты являются основой как для дальнейших функциональных исследований *in vitro*, так и для генетико-эпидемиологических исследований роли гликанов в патогенезе заболеваний человека.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АЛГОРИТМОВ ПОИСКА CNV ПО ДАННЫМ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

В.Д. Гордеева[1,2], К.А. Бабалян[1,2], Г.П. Арапиди[1,2,3], Э.В. Генерозов[1,2], В.М. Говорун[1,2]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]Московский физико-технический институт (Государственный университет); [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Вариации по числу копий (CNV) наряду с однонуклеотидными заменами (SNP) являются источником геномной изменчивости и представляют большой интерес с точки зрения изучения их влияния на фенотип. Развитие NGS-технологий способствовало разработке новых аналитических методов детекции структурных вариаций. В частности для анализа CNV на основе данных полноэкзомного секвенирования оценивают изменение покрытия определенных участков относительно среднего покрытия или контрольных образцов. Одной из актуальных проблем является отсутствие единого стандарта для валидации существующих алгоритмов. Для формирования собственного валидационного набора CNV мы охарактеризовали около 110 тысяч экзонов образца “Геном в бутылке” (NA12878) на основе интеграции результатов 17 общедоступных исследований.

В рамках этой работы мы оценивали 5 наиболее популярных алгоритмов поиска CNV по экзомным данным: EXCAVATOR2, ExomeDepth, XHMM, CONIFER, cn.MOPS. Предсказания алгоритмов были выполнены на полноэкзомных данных 3 фазы проекта 1000 Геномов, в качестве референса были использованы 10 образцов, с высокой корреляцией (>0.88) по покрытию целевых регионов. Большинство алгоритмов детектируют CNV более 1kb, и только ExomeDepth идентифицирует вариации размером 2-3 экзона. На уровне экзонов результаты алгоритмов плохо соотносятся с друг другом: больше половины CNV предсказано только одним из алгоритмов, а общих для всех пяти алгоритмов только 2. Наиболее согласованные результаты показывают алгоритмы EXCAVATOR2, ExomeDepth и XHMM (4650 общих CNV-экзонов). При этом XHMM, CoNIFER, cn.MOPs сфокусированы на поиске редких вариаций с высокой точностью (средние показатели: полнота 3.8% и точность 79.8%), а EXCAVATOR2 и ExomeDepth, в свою очередь, имеют самые высокие показатели чувствительности , но предсказывают много ложно-положительных событий (средние показатели: полнота 26.0% и точность 40.8%).

То, что алгоритмы поиска CNV имеют низкие показатели чувствительности и согласованности, позволяет рассчитывать на успешное построение ансамблей алгоритмов с прогнозируемыми значениями чувствительности и точности.

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

Е.В. Филатова[1], М.И. Шадрина[1], И.Н. Власов[1], Н.С. Крылова[2], М.Ю. Маслова[2], П.А. Сломинский[1]
[1]Институт молекулярной генетики; [2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – самая распространённая форма наследственных заболеваний сердца, которая характеризуется гипертрофией стенки левого и/или изредка правого желудочка, и встречается в общей популяции с частотой 1:500. По современным представлениям в большинстве случаев ГКМП – аутосомно-доминантное заболевание, хотя и не исключается аутосомно-рецессивный тип наследования. В настоящее время идентифицировано около 50 генов и 1500 мутации в них, которые связаны с развитием ГКМП. Однако до сих пор не выявлены все гены, которые могут быть связаны с патогенезом ГКМП, и как минимум в четверти случаев генетическая основа ГКМП остаётся не выявленной. При этом патогенетическая значимость большинства выявленных при ГКМП мутаций остаётся до конца не выясненной, поскольку из-за низкой

встречаемости большинства мутаций в популяции и небольшого размера семей провести косегрегационный анализ в достаточном объёме не представляется возможным. Более того, у российских больных до сих пор не описан спектр генов и мутаций, которые вносят вклад в развитие ГКМП в нашей популяции. В связи с этим крайне актуальной является изучение генетических факторов, связанных развитием ГКМП в российской популяции. Нами проведено секвенирование около 4800 генов и областей генома, для которых показана связь с развитием различных заболеваний. Такое целевое секвенирование ДНК пациентов с ГКМП позволило выявить как спектр патогенетически значимых мутаций в основных генах ГКМП (MYBPC3, MYH7, TNNT2, MYL2, MYL3, TPM1, ACTC2, TNNI3), так и ряд новых вариантов с предполагаемой патогенетической значимостью, характерных для пациентов с ГКМП из России. Нами были выявлены мутации с доказанной патогенетической значимостью Q1233* и Y847* в гене MYBPC3 и G741R в гене MYH7, а также ряд потенциально патогенетически значимых мутаций V698M, R1045L, R143W включая новую мутацию H1778L, в гене MYH7, Q247* в гене TRIM63, R796C в гене ACTN2 и некоторые другие. Общая частота выявленных патогенетически значимых мутаций российской популяции составила 20%, что в два раза ниже, чем в среднем в мире. Кроме того, проведённый клинико-генетический анализ позволил оценить вклад отдельных мутаций и генов в формирование клинических признаков при ГКМП. *Работа поддержана грантами РФФИ № 19-015-00343, 18-015-00322.*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ГЕНОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК У ПРОКАРИОТ

А.И. Манолов, Д.Н. Конанов, Д.Е. Федоров, И.С. Осмоловский, Е.Н. Ильина
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Геномы любых организмов, включая прокариот и вирусов, не являются просто набором генов. Они обладают рядом ограничений и закономерностей, диктующих оптимальное расположение генов на хромосоме. События горизонтального переноса генов и иные геномные перестройки, нарушающие геномную архитектуру, могут снизить жизнеспособность организма. Это позволяет предположить, что места, в которых будут фиксироваться подобного рода события, не случайны. И действительно, для ряда организмов были описаны горячие точки горизонтального переноса генов [Oliveira, 2017] – места в хромосоме, в которых такие события происходят значимо чаще. Наша работа была направлена: во-первых, на создание общедоступного метода, который сможет выявлять горячие точки и, во-вторых, провести сравнительный анализ их расположения. Нами был разработан инструмент Genome Complexity Browser (GCB), доступный по адресу gcb.rcpcm.org, позволяющий анализировать частоту геномных перестроек (событий вставки, потери, перемещения генов). Также данный инструмент позволяет просматривать изменение в расположениях генов в ряде геномов в графовом представлении. Такой вид визуализации зачастую намного компактнее традиционно применяемых, основанных на блоках синтении или множественном выравнивании, методах. Сравнение профилей изменчивости показало значительную консервативность в расположении горячих точек перестроек. Этот эффект наблюдался при сравнении как внутривидовых структур так и близкородственных видов. Нами выдвинута гипотеза, что расположение некоторых генов (например, оперона, отвечающего за синтез и транспорт бактериальной капсулы) в горячих точках генома может иметь адаптивный характер, за счет увеличения частоты изменений.

1. Oliveira, P. H., Touchon, M., Cury, J., & Rocha, E. P. (2017). The chromosomal organization of horizontal gene transfer in bacteria. Nature communications, 8(1), 841.

ДЕТЕКЦИЯ микроРНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАКОМ ПРОСТАТЫ, С ПОМОЩЬЮ КНИ-НАНОПРОВОЛОЧНОГО БИОСЕНСОРА

Ю.Д. Иванов[1], Т.О. Плешакова[1], К.А. Мальсагова[1], А.Ф. Козлов[1], А.Л. Кайшева[1], Л.К. Курбатов[1], В.П. Попов[2], Б.И. Фомин[2], Д.А. Насимо[2], Н.В. Потолдыкова[3], Д.В. Еникеев[3]. Д.А. Галицкая[3], А.И. Арчаков[1]
[1]Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; [2]Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск;[3]Институт урологии и репродуктивного здоровья человека Сеченовского университета, Москва, Россия

Показана возможность детекции выделенной из плазмы крови микроРНК, ассоциированных с онкозаболеванием рак простаты, с помощью нанопроводного биосенсора на основе структур «кремний-на-изоляторе» (КНИ-НП). Для биоспецифической детекции поверхность нанопроводов была модифицирована олигонуклеотидными зондами (оДНК-зондами), комплементарными известным последовательностям миРНК, ассоциированным с раком простаты Показано, что такой биосенсор позволил зарегистрировать повышенный уровень микроРНК у больных раком простаты по сравнению со здоровыми донорами. Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ НАЗЕМНЫХ ГРЯЗЕВЫХ ВУЛКАНОВ ТАМАНСКОГО ПОЛУОСТРОВА

А.Ю. Меркель, Н.А. Черных, Е.А. Бонч-Осмоловская, Н.В. Пименов, А.И. Слободкин
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Грязевой вулканизм – геологическое явление, оказывающее существенное влияние на баланс атмосферного метана, который является основным газообразным компонентом грязевулканических флюидов. Выносимые грязевыми вулканами подземные породы содержат большое количество различных органических и неорганических соединений, которые могут использоваться микроорганизмами в качестве доноров и акцепторов электронов. Микробиологические исследования грязевых вулканов были сосредоточены на морских экосистемах, в то время как наземные грязевые вулканы остаются слабо изученными. В данной работе методами молекулярной экологии мы провели исследование микробных сообществ трех наземных грязевых

вулканов Таманского полуострова. Результаты высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК показали, что все микробные сообщества содержали значительное количество микроорганизмов, таксономическая принадлежность которых позволяет связать их с биогеохимическими циклами метана и серы. В одном из сообществ обнаружено исключительно высокое содержание архей группы ANME-3, осуществляющих анаэробное окисление метана (39% от общего числа прокариот). Этот результат был подтвержден методом количественной ПЦР и радиоизотопными экспериментами. Это первое сообщение об обнаружении микроорганизмов группы ANME-3 в наземной экосистеме и первый пример микробного сообщества с их количественным доминированием. Мы провели метагеномное секвенирование тотальной ДНК, выделенной из данного природного образца. В результате удалось собрать 33 частичных генома прокариот (полнота сборки более 60%, контаминация менее 5%), в том числе и два генома анаэробных метанотрофных архей группы ANME-2a (полнота сборки 96.62%) и группы ANME-3 (92.95%). Нами был биоинформатически реконструирован метанотрофный метаболизм этих микроорганизмов, который осуществляется ими по механизму «обратного метаногенеза»: в обоих геномах были найдены все ключевые гены гидрогенотрофного метаногенеза (mcr, mtr, mer, mtd, mch, ftr, fmd, hdr). В качестве возможных синтрофных партнеров метанотрофных архей нами были идентифицированы три микроорганизма, относящихся к семействам Desulfuromonadaceae и Desulfobulbaceae. Их геномы удалось собрать более чем на 98%. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-74-30025.*

СИСТЕМЫ ТОКСИН-АНТИТОКСИН II ТИПА КАК МАРКЕР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ В МИКРОБИОТЕ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЧЕЛОВЕКА

К.М. Климина[1,2], А.С. Касьянов[1], Е.У. Полуэктова[1], М.В. Одорская[1], В.Н. Даниленко[1]
[1]Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; [2]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Изучение разнообразия микроорганизмов микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека является актуальной задачей в связи с той ролью, которая микробиота играет в становлении и функционировании иммунной, нервной и других систем организма человека. На сегодняшний день анализ микробиоты осуществляется на уровне крупных таксонов, реже – видов. Характеристика штаммового разнообразия микробиоты разработана крайне недостаточно. Существует потребность в поиске функциональных маркеров штаммового разнообразия, присутствующих у большинства бактерий микробиоты ЖКТ. В качестве таких маркеров мы предлагаем использовать для видовой и штаммовой идентификации бактерий новый генетический маркер – гены систем токсин-антитоксин (ТАС) II типа, которые являются хорошо изученными. Ранее нами было показано наличие ТАС II типа суперсемейств MazEF и RelBE в пробиотических бактериях рода Bifidobacterium и рода Lactobacillus, а также возможность использовать комбинацию генов ТАС для видовой и штаммовой идентификации этих бактерий. Была разработана программа ТАГМА (Токсин Антитоксин Гены для Метагеномного Анализа) [https://github.com/LabGenMO/TAGMA] для анализа метагеномов, в основу которой лег каталог по основным ТАС лактобацилл и бифидобактерий. Для увеличения базы данных нами был проведен расширенный поиск ТАС II типа на основе литературных данных и составлен общий каталог, который включает 4239 нуклеотидных последовательностей, относящихся к 50 родам и 489 различным видами бактерий микробиоты ЖКТ. На основе полученной базы данных по ТАС II типа нами была проведена валидация ТАГМА. Для этого было выполнено полногеномное и таргетное секвенирование по участку гена 16S рРНК 20-ти образцов фекалий человека. Каждый метагеном анализировался до уровня рода, вида и штаммов бактерий различными программами (MetaPhlan, RDP, TAGMA). Показано, что ТАГМА обнаруживает в метагеномах различные штаммы бактерий. Анализ с помощью MetaPhlan, RDP подтвердил присутствие в образцах тех видов бактерий, чьи штаммы или группы штаммов были обнаружены ТАГМА. Полученные данные позволяют считать, что программа ТАГМА может быть использована для видовой и штаммовой характеристики как отдельных геномов, так и метагеномов. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-0001.*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ СТАФИЛОКОККОВ

М.А. Корниенко[1], Н.С. Купцов[1], А.С. Гуляев[1], М.В. Малахова[1], М.А. Летарова[2], Е.А. Шитиков[1], А.В. Летаров[2], Е.Н. Ильина[1]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]Институт микробиологии им. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

В связи с распространением устойчивых к антимикробным препаратам бактерий-патогенов актуальны альтернативные подходы терапии инфекций, например, бактериофагами. Сегодня, фаговые препараты – это набор плохо охарактеризованных вирулентных фагов «дикого» типа широкого спектра действия. Целью данной работы является характеристика вирулентных фагов стафилококков, используемых в качестве терапевтических агентов, а также оценка разнообразия их рецептор -связывающих белков. Методы. Из терапевтического препарата компании «Микроген» («Бактериофаг стафилококковый» серия М/5439019) были выделены фаги phSa515A1 и phSa436. Спектр их хозяев определяли на коллекции из 49 штаммов *Staphylococcus aureus* (SA), 35 *Staphylococcus epidermidis* (SE) и 35 *Staphylococcus haemolyticus* (SH). Геномы phSa515A1 и phSa436 получены на платформе Illumina. Результаты. Так чувствительными к phSa515A1 были 97% SA, 14% SE и 0% SH, тогда как phSa436 вызывал лизис 68% SA и не лизировал штаммы SE и SH. Размер генома phSa515A1 составил 140 т.п.о, а геном phSa436 – 18 т.п.о. Геномный анализ показал, что phSa515A1 и phSa436 относятся к семействам Myoviridae и Podoviridae, соответственно. Бактериофаги имеют модульное строение, характерное для представителей данных семейств. Генов лизогении и факторов патогенности выявлено не было, что свидетельствует о возможности их применения в терапии. Ключевым моментом взаимодействия фаг – бактерия является распознавание рецептор-связывающими белками фага рецепторов бактерий. С помощью сравнительного анализа геномов исследуемых фагов и фагов из базы данных NCBI были выявлены открытые рамки считывания (ORF), ответственные за адсорбцию фагов (для Myoviridae: ORF 96, ORF 103, ORF105 референсного генома phiSA039; для Podoviridae: ORF14 и ORF15 референсного генома SCH1). Установлена вариабельность этих

генов для каждого семейства фагов, показано их высокое разнообразие относительно остальных генов генома. Полученные результаты о разнообразии генов РСБ могут быть применены для создания фагов-платформ, безопасность и эффективность которых подтверждены, а широкий спектр активности обеспечивается с помощью генно-инженерных систем управления специфичностью спектра хозяев фагов.

PHIGARO: ИНСТРУМЕНТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАГОВ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ

П.О. Тихонова[1], Е.В. Старикова[1], Н.А. Пряничников[1], К.М. Рандс[2], Е.М. Здобнов[2], В.М. Говорун[1]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия; [2]Факультет генетической медицины и развития, Университет "Женевская медицинская школа" и Швейцарский институт биоинформатики, Женева, Швейцария

Фаги – это бактериальные вирусы, которые можно обнаружить повсюду, начиная с кишечника животных и заканчивая почвой и океанами. Являясь одними из самых распространенных организмов на планете, фаги играют важную роль в поддержании баланса всех известных экосистем. Однако, на сегодняшний день наши знания о фаговом сообществе весьма ограничены (Yutin et al. 2018). Таким образом, эксперименты, направленные на изучение фагов и, в частности, профагов (фаговых последовательностей, уже встроенных в бактериальные геномы) не теряют своей актуальности. Качество работы Phigaro сравнимо с Phaster (Arndt, D. et al., 2016) - инструментом, который на данный момент является лидером в сегменте поиска профагов. Однако, ввиду работы в режиме одной очереди, ожидание обработки последовательности зачастую затягивается на неопределенный срок, в то время как Phigaro запускается локально на любом компьютере с Linux или MacOS системой. Работа Phigaro основана на определении областей, насыщенных фагоспецифичными генами, то есть таких генов, которые принадлежат одной из вирусных ортологичных групп. Для определения непосредственно профаговых областей с помощью функции скользящего окна вычисляются профили фаговой плотности генов и взвешенное среднее GC-состава. Области, в которых произведение этих величин больше некоторого порога, установленного в ходе тестирования алгоритма, Phigaro назначает профаговыми. Результат работы Phigaro с указанными координатами профаговых областей доступен пользователю как в простом текстовом формате, так и в виде интерактивного html-файла с картами генов, нарисованных для каждой области, и возможностью скачивания этих последовательностей в формате fasta или автоматической загрузкой этих областей в BLAST.

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ШТАММА *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* GT15 В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ IL-6 И TNFA

М.С. Чекалина, К.М. Климина, В.Н. Даниленко
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Бифидобактерии как компонент комменсальной микробиоты оказывают положительный эффект на здоровье человека и поддерживают нормальное функционирование организма хозяина. Одним из ключевых факторов в данном процессе, по-видимому, является способность представителей рода Bifidobacterium осуществлять коммуникацию с иммунной системой организма хозяина, стимулируя выработку как противовоспалительных, так и провоспалительных цитокинов и других факторов иммунного ответа. Однако механизмы, обеспечивающие выживание комменсалов в условиях воспалительного процесса и постоянство репертуара нормальной микробиоты кишечника, остаются малоизученными. Нами была отработана методика RNA-Seq для бифидобактерий, характеризующихся высоким GC-составом геномных последовательностей. Проведенный транскриптомный анализ позволил оценить экспрессию генов в условиях культивирования в среде с добавлением провоспалительных цитокинов IL-6 и TNFα по сравнению с культивированием в нормальных условиях и охарактеризовать обнаруженные дифференциально экспрессирующиеся гены. Функциональная характеристика дифференциально экспрессирующихся генов показала, что добавление в среду IL-6 приводит к увеличению уровня экспрессии генов, участвующих в реализации механизмов стрессового ответа. Увеличение уровня экспрессии белка RaiA, участвующего в аресте трансляции в условиях стрессового ответа, сопровождается уменьшением уровня экспрессии 50S рибосомального белка L3, что приводит к снижению уровня трансляции и, следовательно, базового метаболизма клеток. Также происходит увеличение уровня экспрессии группы генов, ответственных за утилизацию и потребление гликопротеинов и других субстратов, что может быть связано с необходимостью накопления веществ для увеличения жизнеспособности в стрессовых условиях под воздействием факторов иммунного ответа. Добавление в среду TNFα также приводит к снижению уровня экспрессии генов, участвующих в процессах транскрипции и трансляции, что приводит к снижению базового метаболизма клеток. Таким образом, проведенный транскриптомный анализ выявил изменения в уровне экспрессии ряда генов, предположительного участвующих в реализации механизмов устойчивости к факторам иммунного ответа бифидобактерий как комменсальных представителей микробиоты. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00146).*

СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

В.Н. Лазарев
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Использование медицинских пиявок с лечебной целью впервые было описано Галеном и Никандром Колофонским более двух тысяч лет назад. С тех пор пиявки активно применялись для лечения различных заболеваний. В 18 веке настал «золотой век гирудотерапии», в течение которого чуть не исчезла Европейская популяция *Hirudo medicinalis*. К концу XIX века, с зарождением новых медицинских стандартов, гирудотерапия стала менее популярна. Однако в последние десятилетия мы наблюдаем вновь рост интереса к гирудотерапии. Это объясняется обнаружением в слюне пиявок огромного количества биологически активных соединений. В этом смысле медицинскую пиявку можно назвать природной фармакопеей, написанной в ходе эволюции. Несмотря на огромный интерес к исследованию компонентного состава слюны медицинской пиявки, данные по геномике, транскриптомике слюнных желез, протеомике слюны и метагеномике медицинской пиявки в настоящее время

малочисленны и фрагментарны. Мы определили полную нуклеотидную последовательность генома *Hirudo medicinalis*, провели полное транскриптомное профилирование слюнных желез, глубокий протеомный и пептидомный анализ слюны трех видов медицинских пиявок (*H. medicinalis, H. verbana, H. orientalis*). Мы идентифицировали секрет-специфичные белки и пептиды медицинской пиявки, а также обнаружили ранее не описанные белки и пептиды, потенциально обладающие антимикробным, тромболитическим, антикоагуляционным, обезболивающим действиями. Некоторые пептиды были химически синтезированы, белки были получены при гетерологичной экспрессии в E.coli и клетках человека. Кроме того, мы провели метагеномный анализ микробиоты разных отделов пищеварительного тракта медицинских пиявок трех видов с целью определения его метаболического потенциала. Наши данные не только уточняют механизмы взаимодействия белков и пептидов секрета медицинской пиявки с некоторыми звеньями гомеостаза человека, но являются основой для создания новых лекарственных препаратов: антимикробных соединений, тромболитиков и антикоагулянтов нового поколения. *Исследование было поддержано грантами РНФ № 14-14-00696, № 17-75-20099.*

1. Babenko V. et. al., Far beyond common leeching: insights into an ancient medical device through integrated omics data // 2018, bioRxiv, doi: https://doi.org/10.1101/357681

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ СТАФИЛОКОККОВ

М.А. Корниенко[1], Н.С. Купцов[1], А.С. Гуляев[1], М.В. Малахова[1], М.А. Летарова[2], Е.А. Шитиков[1], А.В. Летаров[2], Е.Н. Ильина[1]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]Институт микробиологии им.Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

В связи с распространением устойчивых к антимикробным препаратам бактерий-патогенов актуальны альтернативные подходы терапии инфекций, например, бактериофагами. Сегодня, фаговые препараты – это набор плохо охарактеризованных вирулентных фагов «дикого» типа широкого спектра действия. Целью данной работы является характеристика вирулентных фагов стафилококков, используемых в качестве терапевтических агентов, а также оценка разнообразия их рецептор -связывающих белков. Методы. Из терапевтического препарата компании «Микроген» («Бактериофаг стафилококковый» серия М/5439019) были выделены фаги phSa515A1 и phSa436. Спектр их хозяев определяли на коллекции из 49 штаммов *Staphylococcus aureus* (SA), 35 *Staphylococcus epidermidis* (SE) и 35 *Staphylococcus haemolyticus* (SH). Геномы phSa515A1 и phSa436 получены на платформе Illumina. Результаты. Так чувствительными к phSa515A1 были 97% SA, 14% SE и 0% SH, тогда как phSa436 вызывал лизис 68% SA и не лизировал штаммы SE и SH. Размер генома phSa515A1 составил 140 т.п.о, а геном phSa436 – 18 т.п.о. Геномный анализ показал, что phSa515A1 и phSa436 относятся к семействам Myoviridae и Podoviridae, соответственно. Бактериофаги имеют модульное строение, характерное для представителей данных семейств. Генов лизогении и факторов патогенности выявлено не было, что свидетельствует о возможности их применения в терапии. Ключевым моментом взаимодействия фаг – бактерия является распознавание рецептор-связывающими белками фага рецепторов бактерий. С помощью сравнительного анализа геномов исследуемых фагов и фагов из базы данных NCBI были выявлены открытые рамки считывания (ORF), ответственные за адсорбцию фагов (для Myoviridae: ORF 96, ORF 103, ORF105 референсного генома phiSA039; для Podoviridae: ORF14 и ORF15 референсного генома SCH1). Установлена вариабельность этих генов для каждого семейства фагов, показано их высокое разнообразие относительно остальных генов генома. Полученные результаты о разнообразии генов РСБ могут быть применены для создания фагов-платформ, безопасность и эффективность которых подтверждены, а широкий спектр активности обеспечивается с помощью генно-инженерных систем управления специфичностью спектра хозяев фагов.

МЕТА-АНАЛИЗ ПРОТЕОМНЫХ ДАННЫХ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЧЕЛОВЕКА

Е.В. Поверенная, О.И. Киселева
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Белок-белковые взаимодействия (ББВ) лежат в основе биологических процессов живых систем. Интерактомные исследования позволяют не только обогатить данные о функциях белков, но и имеют большое практическое значение - определение механизмов биологических процессов, поиск биомаркеров заболеваний, выявление потенциальных мишеней для действия лекарств и др.

Метод аффинной очистки, сопряженной с масс-спектрометрией (affinity purification mass spectrometry, AP-MS), является одним из основных подходов для выявления белок-белковых взаимодействий (ББВ). Суть метода заключается в «вытаскивании» за выбранный белок-мишень белкового комплекса, идентификацию которого осуществляют с помощью методов масс-спектрометрии. В соответствии с международной практикой результаты масс-спектрометрических экспериментов депонируются в базы данных открытого типа (к примеру, GPMdb).

Настоящая работа направлена на получение знаний о функционировании белков в составе интерактома человека путем анализа результатов постгеномных экспериментов. Физические взаимодействия между белками обеспечивают их совместное определение во многих экспериментах, выполненных методом AP-MS, что позволяет отличить их от функциональных взаимосвязей и ложноположительных взаимодействий. Мы использовали метод виртуальной копреципитации (ВКП) для корректного совмещения множества противоречивых AP-MS данных. Принцип ВКП заключается в определении частоты совстречаемости белков в масс-спектрометрических экспериментах, депонированных в глобальный протеомный репозиторий GPMdb.

Особенностью GPMdb является слабая аннотация загруженных экспериментов, поэтому нами была создана локальная база данных для ре-анализа результатов протеомных экспериментов согласно стандартам международного проекта «Протеом человека». Была создана локальная база данных в SQL формате, хранящая свыше 400 тыс. загруженных и обработанных записей

об экспериментах (> 970 Гб информации), среди которых только 5,5% были определены как AP-MS выполненные для человека.

По результатам мета-анализа был создан базис для построения интерактомной карты человека на основании 192 476 ББВ для 10 431 белок-кодирующих генов, включая сведения о 36 772 ББВ для 1103 сплайс-форм.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00879.

ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ ИНСТРУМЕНТАЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ АНАЛИЗА, ИНТЕРПРЕТАЦИИ И МОДЕЛИРОВАНИЯ ОМИКСНЫХ ДАННЫХ

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

Задачи анализа, интерпретации, моделирования больших данных генома, протеома, метаболома требуют создания эффективных информационных систем. Целью создаваемой интеллектуальной информационной системы является преобразование больших количественных омиксных данных различных файловых форматов к качественным форматам малых данных на основе технологии баз данных и знаний, с семантикой понятной исследователю. Современные системы искусственного интеллекта могут получать новую качественную информацию из большого количества данных, представляя ее на языке близком к естественному, но не имеют достаточно мощных средств анализа этой обобщенной качественной информации. Полученные обобщенные качественные данные на языке близком к естественному далее удобно анализировать человеку. В основе преобразования данных лежит процесс реструктуризации данных файловых систем в формат баз данных и знаний. Концептуальные модели баз данных и знаний строятся на основе сущностей, семантически понятых исследователю. Основными сущностями являются: хромосомы, гены, транскрипты, экзоны, интроны, протеины, нуклеотиды, аминокислоты, метаболиты, реакции, мотивы, мутации и т.д. Все эти сущности в инструментальной системе связаны между собой многочисленными семантическими отношениями (сетями) на основе моделей данных, что позволяет осуществлять переход от больших количественных данных к малым качественным данным и наоборот. Разработаны соответствующие удобные диалоговые интерфейсы, позволяющие взаимодействовать с полученными базами данных и знаний. Таким образом, эти многочисленные омиксные данные становятся доступными на качественном и количественном уровне исследователям, от которых уже не требуются глубокие знания информационных технологий и программирования. Отличием разработанной системы от традиционных браузеров порталов (NCBI, Ensembl, KEGG и др., в которых информация представлена в форматах xml, fasta, txt, т.е. в слабоструктурированном виде) является возможность интегрированного синхронного анализа и интерпретации данных генома, протеома, метаболома, вплоть до координат нуклеотидов и аминокислот. Данную цепочку анализа можно продолжить на метаболиты, ферменты, реакции, метаболические пути, и еще далее на мутации и заболевания.

ИНТЕГРАЦИЯ ОМИКСНЫХ ДАННЫХ ДЛЯ РАСШИФРОВКИ УСПЕШНОСТИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BEIJING B0/W148 КЛАСТЕРА

Е.А. Шитиков[1], Ю.А. Беспятых[1], А.С. Гуляев[1], А.В. Смоляков[1], К.М. Климина[1], М.З. Догонадзе[2], Е.Н. Ильина[1]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва; [2]Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

Среди микобактерий туберкулеза (МБТ) генетическое семейство Beijing является наиболее распространенным и характеризуется повышенной трансмиссивностью и лекарственной устойчивостью. Четверть всех штаммов семейства, циркулирующих на территории России, относится к кластеру Beijing B0/W148. Целью настоящего исследования было описать особенности эндемичных штаммов данного кластера на геномном, транскриптомном и протеомном уровнях.

В исследование включено 20 штаммов МБТ кластера Beijing B0/W148 и референсный штамм H37Rv. Полногеномное секвенирование (N=21) и транскриптомный анализ (N=2) проводили с использованием секвенатора Illumina HiSeq 2500. Также в работе использованы результаты полногеномного секвенирования 1500 штаммов Beijing. Безметочное протеомное профилирование (N=20) проводили с использованием ABSciex TripleTOF 5600.

В ходе филогенетического анализа установлена ограниченная генетическая вариабельность представителей кластера (среднее попарное расстояние 47±13 SNPs). Дополнительно описано 59 кластер-специфических SNPs, которые, предположительно, ассоциированы с “успешностью”. Полногеномное выравнивание RUS_B0 (CP030093.1, получено в рамках исследования) и H37Rv показало наличие двух крупных хромосомных перестроек в Beijing B0/W148. Инвертированные участки затрагивали 559 т.п.о. и 339 т.п.о.

Согласно данным протеомного анализа идентифицировано 2155 белков Beijing B0/W148 и 1560 для H37Rv. Сравнительный количественный анализ показал статистически значимое различие между штаммами кластера и H37Rv в представленности 192 белков. Функциональный анализ выявил различия в представленности белков липидного обмена и белках, участвующих в ответе на гипоксию, что подтвердилось результатами транскриптомного анализа. Найденные особенности позволяют сделать предложение о лучшей адаптации штаммов кластера к выживанию в макрофагах.

Проведенный протеогеномный анализ позволил уточнить структурную организацию генома представителей кластера Beijing B0/W148: подтвердить наличие RvD1 и RvD5 и отсутствие RD105, RD149, RD152, RD181 и RD207. Также в ходе анализа идентифицированы пептиды для 10 псевдогенов, скорректированы аннотированные старты для 27 генов. Идентифицированы 2 новые открытые рамки считывания.

Исследование выполнено при поддержке РНФ в рамках проекта № 17-15-01412.

СТЕХИОМЕТРИЯ ПРОТЕОМА *HELICOBACTER PYLORI* КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ОТПЕЧАТОК ВИДА

О.Е. Глущенко, А.И. Манолов, Е.Н. Ильина, В.М. Говорун
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Helicobacter pylori – грамотрицательная бактерия спиралевидной формы способная персистировать в желудке без вреда для человека или вызывать такие заболевания как гастрит, язвы желудка и двенадцатиперстной кишки. В современном научном мире данный факт представляет особый интерес. Научный интерес представляют все еще открытые вопросы о детерминантах перехода из коменсального состояния в патогенный. Целью текущей работы было изучить композиционные состояния бактерии на уровне протеома и транскриптома, их межштаммовую вариабельность и взаимосвязь. Для анализа были взяты штаммы Helicobacter pylori 26695 и J99 и штамм A45, выделенный из биопсии антрального отдела желудка пациента с язвенной болезнью и хроническим гастритом. Чтобы изучить влияние метилирования на белковый профиль, в анализ были взяты производные штамма A45, дефектные по активным генам метилтрансфераз. Мутанты были ранее получены при помощи направленной инактивации методом генного нокаута с использованием встройки в геном последовательности гена aphA-3, обусловливающего устойчивость к канамицину. Для перечисленных выше изолятов были получены белковые масс-спектры, а также секвенирование полных транскриптомов. Был произведен биоинформатический анализ транскриптомных и протеомных данных. Были выявлены дифференциально экспрессирующиеся транскрипты и белки. Пользуясь информацией о белок-белковых взаимодействиях (Rain et al, 2001) мы определили белковые комплексы с варьирующейся и устойчивой стехиометрией. Среди них наблюдались как сонаправленные, так и разнонаправленные по отшению к транскриптомной экспрессии комплексы. Мы предполагаем, что белковые комплексы и их стехиометрия являются основными детерминантами протеома микроорганизма и служит молекулярным отпечатком широкого спектра факторов.

ПЯТИМИНУТНЫЙ ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ПОИСКА БИОМАРКЕРОВ

М.В. Иванов[1], Ю.А. Бубис[1], В.А. Горшков[2], А.А. Лобас[1], Л.И. Левицкий[1], И.А. Тарасова[1], Е.М. Соловьева[1], М.Л. Придатченко[1], Ф. Кджелдсен[2], М.В. Горшков[1]
[1]Институт энергетических проблем химической физики РАН им. В.Л. Тальрозе, Москва, Россия; [2]Университет Южной Дании, Оденсе, Дания

Полнопротеомный анализ основан на разделении протеолитической смеси с последующей фрагментацией ионов пептидов методами тандемной масс-спектрометрии (МС/МС). Спектры МС/МС специфичны к последовательности и используются для идентификации пептидов. Однако, необходимость фрагментации существенно сказывается на длительности протеомного анализа, усложняет. Типичной является идентификация белков по одному-двум пептидам, что сказывается на точности количественных измерений. Нами был разработан метод анализа протеомов DirectMS1, не требующий использования фрагментации, который позволяет существенно уменьшить экспериментальное время, обладая при этом высокой эффективностью. В его основе лежит реализация работы масс-спектрометра в режиме измерения только масс-спектров ионов пептидов первого уровня и использование комплементарной информации о пептидах, такой как времена удерживания. Комбинация точных масс и времен удерживания позволяют выявить в масс-спектрах изотопные кластеры, являющиеся основным отличительным признаком пептидов, и позволяющие идентифицировать белки анализируемого протеома. Отсутствие фрагментации дает существенное сокращение времени анализа и возможность использования ультракоротких градиентов разделения. Полученные результаты показали, что при использовании коротких градиентов разделения, DirectMS1 превосходит эффективность стандартного протеомного анализа на основе МС/МС по всем параметрам, включая количество идентифицированных белков, чувствительность и точность количественных измерений. Так, при работе масс-анализатора Орбитрэп в режиме измерения только масс-спектров первого уровня и 5-ти минутных градиентов ВЭЖХ, методом DirectMS1 было идентифицировано 600 белковых групп клеточной линии HeLa. Количество загружаемой для анализа смеси варьировалось от 1 до 200 нг, при этом, предложенный метод показал чувствительность, на порядок превосходящую таковую для стандартного МС/МС анализа. Сравнение точности количественных измерений относительных концентраций белков также показало существенное превосходство метода DirectMS1 благодаря более высокому покрытию последовательностей идентифицируемых белков протеома. В докладе будут обсуждаться особенности разработанной технологии и возможности ее использования в биомедицинских исследованиях.

РАЗЛИЧИЯ В ПРОТЕОМНОМ СОСТАВЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ПСИХОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ

Л.П. Смирнова[1], Л.В., Логинова[1], Е.М. Дмитриева[1,2], А.А. Серегин[1], А.А. Летова [2], Н.А. Бохан[1], А.В. Семке[1], В.Г. Згода[3]
[1]НИИпсихического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск; [2]Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Томск; [3]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Психические расстройства (ПР) относят к социально значимым заболеваниям и характеризуются распространенностью, частыми рецидивами, в случае эндогенных психических расстройств, короткими периодами ремиссий или их полным отсутствием. Существует этиологическое деление всех ПР на эндогенные и психогенные (Тиганов А.С., 1999). Патогенез ПР остаётся не до конца изученным. В настоящее время не существует параклинических методов дифференциальной диагностики ПР. Для постановки диагноза того или иного ПР используют только анамнестические и клинико-психопатологические данные. По протеомному анализу при ПР имеются немногочисленные исследования, в основном представленные работами по шизофрении, выполненными на постмортальном материале. По исследованию белкового состава сыворотки крови встречаются единичные работы, данные которых противоречивы и не подтверждены другими методами. В ходе сравнительного протеомного

анализа сыворотки крови больных эндогенными и психогенными ПР выявлены достоверные отличия в электрофоретических картинах распределении сывороточных белков для каждого заболевания и белковые области, специфично характеризующие каждое расстройство. Белки, выделенные из этих областей, были идентифицированы с помощью масс-спектрометра LTQ Velos (Thermo Scientific) на базе ЦПК «Протеом человека» ИБМХ г. Москва. Анализ результатов показал, что больные эндогенными ПР и расстройствами психогенного происхождения имеют специфичные наборы белков совершенно разной функциональной направленности. При ПР эндогенного происхождения выявлены белки, явившиеся следствием хронического процесса: Эти белки свидетельствуют о нарушении глутаматергической нейротрансмиссии и эндотелиальной дисфункции у этих больных. Подтверждение выявления специфических белков глутаматных рецепторов в сыворотке крови больных количественными методами позволяет рассматривать в качестве потенциальных биомаркёров эндогенных ПР. Напротив, функции белков, выявленных у больных психогенными расстройствами, направлены на адаптивный ответ организма и свидетельствуют о развившейся острой воспалительной реакции. Белок специфического фактора удлинения глюкокортикоидных рецепторов в сочетании с увеличением количества кортизола констатирует вклад глюкокортикоидов в патогенез этого заболевания. *Работа поддержана грантом РНФ № 18-15-00053.*

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПЕПТИДНЫХ АГЕНТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ОРГАНИЗМОМ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО МИКРОБИОТОЙ

Г.П. Арапиди[1,2,3], А.С. Урбан[1,2,3], И.О. Бутенко[1,3], В.О. Шендер[1,2], М.С. Осетрова[3], Г.А. Нос[2], О.М.Иванова[2], Т.М. Савельева[3], А.Н. Митин[4], Н.И. Шарова[4], М.Ф. Никонова[4], А.И. Мартынов[4], Е.Н. Ильина[1], В.Т. Иванов[2], В.М. Говорун[1,2,3]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [3]Московский физико-технический институт (Государственный университет); [4]ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Симбиотическое взаимодействие между организмом человека и его микробиотой является важной вопросом современной биомедицины и персонализированной медицины. Кровь, как соединительная ткань, потенциально может содержать пептидные фрагменты любого белка организма. Принимая во внимание повсеместное участие пептидов в биомолекулярных взаимодействиях и регуляторных процессах, мы предприняли попытку прямого поиска пептидов крови, полученных из белков микробиоты человека. Анализ образцов сыворотки и плазмы крови, взятых у 20 здоровых доноров, проводили на масс-спектрометре ABSciex TripleTOF 5600. Образцы подготавливали на основе ранее разработанного нами метода десорбции пептидов с поверхности основных белков плазмы крови с последующими стандартными хроматографическими этапами. Поисковые системы Mascot и X!Tandem использовали для идентификации пептидов. Последовательности белков человека брали из базы знаний UniProt Knowledgebase, а последовательности белков микробиоты человека - из проекта NIH Human Microbiome Project. В результате из 3300 идентифицированных пептидов более 300 были уникальными фрагментами микробных предшественников. В более чем 50 случаях идентификация пептидов была подтверждена масс-спектрами фрагментации синтетических пептидов. Анализ полученных in silico гидролизатов микробиотических белков показал, что значительное количество идентифицированных пептидов происходит из белков-предшественников в результате гидролиза трипсином, химотрипсином и пепсином, основными протеазами желудочно-кишечного тракта. 60% идентифицированных «микробиотических» пептидов происходят из кишечной флоры, около 20% - из микробиоты полости рта и 20% - из оставшихся микробиотических сообществ. Большинство белков-предшественников относятся к внутриклеточным, цитоплазматическим белкам. Выделенная фракция мононуклеарных клеток периферической крови показала увеличение секреции провоспалительных цитокинов, колониестимулирующих факторов и хемоаттрактантов в ответ на добавление некоторых микробиотических пептидов. Полученные данные служат основой для продолжающегося изучения функциональных свойств пептидов, полученных из микробиома. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (17-00-00461) и гранта Президента Российской Федерации МК-6894.2018.4.*

ВЛИЯНИЕ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ГИПОКИНЕЗИИ НА БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ ПРОТЕОМИКИ

Д.Н. Каширина[1], А.Г. Бржозовский[1], Л.Х. Пастушкова[1], А.С. Кононихин[1,2], Е.Н. Николаев[2,3], И.М. Ларина[1]
[1]ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН; [2]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; [3]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Антиортостатическая гипокинезия, моделирующая физиологические эффекты космического полета на организм человека, используется также для исследования неблагоприятных последствий гиподинамии, в последнее время приобретающей все большую распространенность. Выявление белков и, на их основе, ключевых биологических процессов, участвующих в изменениях в организме человека при гиподинамии, имеет большую социальную значимость. С целью изучения влияния комплекса факторов антиортостатической гипокинезии (АНОГ) на белковый состав плазмы крови проведено хромато-масс-спектрометрическое исследование здоровых добровольцев в возрасте от 20 до 40 лет в модельном эксперименте с 21-суточной АНОГ с углом наклона продольной оси тела относительно горизонтали - 6°. Исследования проводились в контролируемых условиях жизнедеятельности в исследовательском центре MEDES в Тулузе, Франция. Исследуемая группа не подвергалась никаким дополнительным воздействиям для предотвращения развития адаптационных изменений в физиологических системах. Для проведения протеомного анализа образцы готовили по протоколу FASP. Полученные после трипсинолиза пептидные смеси разделяли с помощью нано-ВЭЖХ системы Dionex Ultimate 3000 (Thermo) и анализировали с помощью масс-спектрометра MaXis 4G. Спектры анализировали с использованием программы MaxQuant по базе данных SwissProt. С помощью программы Perseus проведен полуколичественный протеомный анализ образцов крови, собранных до проведения эксперимента, а также

на 21 сутки АНОГ. Всего было выявлено и квантифицировано 316 различных белков. Исследование динамики изменяющихся белков с использованием Т-критерия Стьюдента (с поправкой на множественные сравнения) позволило определить 47 белков, статистически значимо изменяющихся в ходе эксперимента. Анализ генных онтологий белков с повышенной концентрацией показал, что ряд биологических процессов, а именно регуляция протеолиза, иммунного ответа, активация комплемента, а также коагуляция крови и образование сгустков фибрина, значимо изменяются в ходе АНОГ. Данные процессы могут негативно сказываться на функционировании, в частности, сердечно-сосудистой системы. *Благодарности Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00524.*

АННОТИРОВАНИЕ БЕЛКОВ С НЕИЗВЕСТНОЙ ФУНКЦИЕЙ ХРОМОСОМЫ 18 ЧЕЛОВЕКА

Е.В. Ильгисонис, П.В. Погодин, Е.А. Пономаренко
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Белки выполняют различные функции в клетках. Некоторые участвуют в создании структур, другие осуществляют регуляторную функцию, а третьи обеспечивают взаимодействие с внешним миром.

Разрыв между количеством известных белков и аннотацией их биологической функции постоянно увеличивается. Функция белка является многогранным и сложным явлением, и в настоящее время не существует единого алгоритма для его определения. Сегодня существует множество алгоритмов функционального прогнозирования, основанных на гомологии последовательностей, объединении данных из разных источников и реализующих передовые методы машинного обучения. Но как можно подтвердить предсказанную функцию белка?

На первом этапе мы провели ретроспективный анализ базы данных Nextprot (Gaudet et al., 2017), чтобы выявить наиболее популярный экспериментальный способ для проверки функции белка (для разных функций - разные экспериментальные подходы). После этого мы решили сосредоточить свои усилия на функциональной аннотации белков upe1 хромосомы 18 (белок upe1 - белки без известной функции). Мы решили провести анализ текста и мета-анализ. Поисковые запросы - названия белков в PubMed не дают результатов. PRIDE содержал 23 набора данных с этим белком. Для дальнейшего анализа мы выбрали 16 наборов данных, созданных после 2016 года. Эти наборы данных были описаны в 12 статьях соответственно. Анализ их MeSH-терминов позволил нам сформировать основную гипотезу о функциональной роли белка Q68DL7.

На следующем этапе мы проанализировали совместную встречаемость этого белка с другими белками в тех же статьях и экспериментальных наборах данных. Мы использовали алгоритмы COFACTOR (Zhang et al., 2017) и I-TASSER (Yang et al., 2015) для прогнозирования функции белка на основе структуры белка. На основе принципа «виновен по ассоциации» была сформулирована гипотеза о роли этого белка в различных метаболических путях.

ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОТЕОМНОМ ПРОФИЛЕ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ТРАВМАТИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ СПИННОГО МОЗГА

Ю.Д. Романова[1], А.В. Лайков[1], Р.К. Исмагилова[1], Л.Ш. Нигматуллина[1], И.И. Салафутдинов[1], Я.О. Мухамедшина[1,2]
[1]Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет; [2]Кафедра цитологии, гистологии и эмбриологии, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

На сегодняшний день лечение пациентов с травмой спинного мозга недостаточно эффективно, большая часть пациентов не восстанавливают чувствительную и двигательную функции. Травма запускает множество патологических процессов, включающих дегенерацию нервной ткани и гибель нейронов. Пока не установлено, какие молекулярные каскады лежат в основе патологических изменений в поврежденной ЦНС, а также в механизмах нейрорегенерации. В данной работе мы применили омиксные технологии для оценки изменений в протеоме цереброспинальной жидкости пациентов с травматическим поражением спинного мозга на 1 и 3 сутки после травмы. В исследовании участвовало 2 пациента, цереброспинальная жидкость была отобрана для анализа на 1 и 3 сутки после травмы. После чего белки ликвора были разделены в 10% полиакриламидном геле и трипсинизированы. Полученные пептиды были идентифицированы с помощью масс-спектрометра Q-TOF Maxis Impact (Bruker), совмещенного с хроматографом Ultimate 3000 (Thermo). В образцах было идентифицировано от 62 до 109 белков. Концентрация общего белка на 1 и на 3 сутки превышала норму до 10 раз. При этом на третьи сутки у обоих пациентов наблюдалась тенденция к снижению разнообразия белков. Во всех образцах ликвора присутствовали белки, характерные для плазмы крови – субъединицы гемоглобина, альбумин, аполипопротеины, иммуноглобулины и т.д. Общими для белков ликвора на 1 сутки были два белка – J цепь иммуноглобулинов и легкая цепь иммуноглобулинов каппа. В ликворе на третьи сутки было выявлено 8 уникальных белков - относящиеся к системе комплемента CO3, CO4A, CO4B, альфа-2-макроглобулин, тяжелая цепь иммуноглобулинов мю IGHM, белок цитоскелета виментин, белок внеклеточного матрикса фибронектин и нейротрофический белок SERPINF1. Нам представляется необходимым исследовать белковый профиль ликвора пациентов на следующих временных этапах, чтобы оценить изменения в протеоме, происходящие как при патологических процессах, так и при регенерации нервной ткани.

МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ С КОНТЕКСТНОЙ ИНТЕРПРЕТАЦИЕЙ ДАННЫХ

П.Г. Лохов, А.В. Лисица, А.И. Арчаков
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Врачи в настоящее время используют только небольшую часть информации, содержащейся в крови. Так, расширенный биохимический анализ крови можно рассматривать как частный случай метаболомного анализа – единовременного измерения всей совокупности низкомолекулярных веществ пробы. При этом, единовременное измерение многих веществ, например, маркеров заболеваний, существенно превосходит возможности доминирующих сейчас в медицине мономаркерных подходов.

Подобные измерения позволяют одновременно проводить диагностику многих заболеваний, причем с повышенной точностью, за счет потенциирования сигналов от многих молекулярных маркеров. Это привело к тому, что Метаболомное сообщество (Metabolomics Society) декларировало, что узкий диапазон биохимических анализов, используемых в настоящее время в медицине, в ближайшем будущем будет заменен анализами, которые выявляют полный набор веществ в анализируемом биоматериале. Однако на пути к этому необходимо преодолеть одно из основных ограничений. Проводя измерение множества веществ, путем получения от каждого из них измерительного сигнала, возникает проблема – понять, какое вещество соответствует какому сигналу. В данной ситуации, как правило, относительно легко могут быть идентифицированы только очень немногие вещества, которые представлены в крови в высокой концентрации и предварительно хорошо разделены. Выявление других веществ делает метаболомный анализ дорогим, трудоемким и, соответственно, проблематичным для применения в медицине. В докладе показано, как быстро и экономически эффективно провести анализ метаболомных данных, используя биологическую контекстную информацию, в том числе данные о биотрансформации веществ в организме. При использовании контекстной информации отсутствует необходимость в идентификации веществ с использованием существующих трудоемких методов. При этом происходит существенное расширение перечня измеряемых веществ, при одновременном кардинальном снижении стоимости и времени анализа.

PROBING AGE-RELATED CHANGES IN LEGUME NODULE PROTEOME BY PROTEOMICS AND METABOLOMICS APPROACHES

Andrej Frolov[1,2], Tatiana Bilova[2,3], Christian Ihling[4], Ahyoung Kim[2], Alexander Tsarev[1,2], Veronika Chantseva[1,3], Tatiana Mamontova[1,2], Elena Lukasheva[1], Julia Shumilina[1,2], Anna Checkina[1], Ekaterina Romanovskaya[1], Tatiana Grishina[1], Kirill Demchenko[5], Viktor Tsyganov[6], Andrea Sinz[4], Vladimir A. Zhukov[6], Manuel Becana[7], Manuel Matamoros[7], Igor A. Tikhonovich[6,8], Ludger A. Wessjohann[2]

[1]St. Petersburg State University, Department of Biochemistry, St. Petersburg, Russia; [2]Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Department of Bioorganic Chemistry, Halle/Saale, Germany; [3]St. Petersburg State University, Department of Plant Physiology and Biochemistry, Russia; [4]Department of Pharmaceutical Chemistry and Bioanalytics, Institute of Pharmacy, Charles Tanford Protein Center, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany; [5]Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia; [6]The All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Department of Biotechnology, St. Petersburg, Russia; [7]Departamento de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Zaragoza, Spain; [8]St. Petersburg State University, Department of Genetics and Biotechnology, Russia

Proteomics and metabolomics represent powerful tools of functional genomics, giving direct access to the molecular mechanisms underlying plant response on developmental signals, metabolic pathways, and regulatory networks. The combination of these approaches might give deeper insights into the molecular mechanisms contributing on mutualistic plant-microbial interactions, in particular, legume-rhizobial symbiosis. Here we address age-related changes in determinate and indeterminate root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and pea (*Pisum sativum*). Juvenile, flowering, and senescent plants were harvested, the proteins were isolated by phenol extraction and digested with trypsin, isolating metabolites by a multi-step extraction with solvents of different polarity. Protein hydrolyzates were analyzed by nanoLC-ESI-Q- and LIT-Orbitrap-MS in data-dependent acquisition (DDA) mode. Database search and annotation of PTMs were based on the SEQUEST algorithm; quantification was performed using a label-free strategy. Functions and localization of the proteins were annotated by an in-house developed workflow, combined with MapMan, Mercator, LocTree3 and String tools. Analysis of primary metabolome relied on the combination of GC-MS and IP-RP-UHPLC-MS, with a secondary metabolite profiling by RP-UHPLC-MS. The analysis revealed 656 and 92 differentially regulated proteins in common bean and pea nodules, respectively. Plant proteins were mostly down-regulated and represented by the molecules involved in signaling and protein metabolism, while most of the bacterial polypeptides were up-regulated and found to be involved in energy metabolism and nitrogen fixation. Age-dependent changes in metabolite profiles were characterized based on the accumulation of carbohydrates and amino acids. Interestingly, mutation in the gene sym27 resulted in the suppression of signaling and protein biosynthesis in both symbiosis partners. Remarkably, nodule ageing was accompanied with enhanced glycation and carbonylation. In total, 36 age-related glycation hotspots were identified in the *P. vulgaris* nodule proteome. *This project was supported by the Russian Science Foundation (project 17-16-01042).*

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ МИКРОСОМАЛЬНЫХ ЦИТОХРОМ P450-ЗАВИСИМЫХ МОНООКСИГЕНАЗ

М. Травкина, Я.В. Диченко, А.В. Янцевич

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Введение. Цитохром P450-зависимые монооксигеназы – семейство ферментов, вовлеченных в метаболизм биологически активных стероидов и биотрансформацию ксенобиотиков. Ферменты данного класса являются терапевтическими мишенями для целого ряда заболеваний, поэтому понимание способов регуляция их активности крайне важно. В настоящее время достоверно изученным механизмом регуляции активности данного класса ферментов является регуляция посредством активации транскрипции, где индуктором выступает сам субстрат монооксигеназы; быстрые механизмы регуляции посредством посттрансляционных модификаций (ПТМ) изучены в меньшей степени. Целью данной работы является поиск возможных сайтов ПТМ микросомальных цитохром P450-зависимых монооксигеназ с использованием протеомных методов и оценка влияния ПТМ на структуру и активный центр фермента с помощью методов *in silico*. Суммарный белок микросом печени крыс выделен хлороформ-метанольным методом, подвергнут специфическому протеолизу с использованием трипсина, химотрипсина, GluC, пепсина. Полученные смеси пептидов проанализированы методом ВЭЖХ-МС/МС, обработка данных осуществлена в программном пакете PEAKS Studio. Молекулярная динамика проведена в программном пакете Amber16, трехмерная структура

рассчитана на сервере I-TASSER. Результаты и выводы. В результате протеомного анализа в микросомах удалось идентифицировать 15 представителей семейства CYP450 (2D26, 2C12, 2D3, 2A1, 2D1, 2E1, 2C23, 2C7, 2D10, 2C6, 2C13, 1A2, 4A14, 4F1, 2B3). Обнаружено фосфорилирование CYP2A1 по остатку тирозина-154. Метод молекулярной динамики показал, что наиболее существенные структурные изменения имеют место в удаленных от модификации участках молекулы CYP2A1, в то время как расстояние от Y154 до ближайших 150, 151, 157, 158 аминокислотных остатков изменилось несущественно. Установлено увеличение радиуса гирации фосфорилированной молекулы белка в сравнении с немодифицированным белком. Влияние введения модификации на активный центр фермента требует дальнейшего изучения.

ОБЪЕДИНЯЯ НАРАБОТКИ РОССИЙСКОГО ПРОТЕОМНОГО КОНСОРЦИУМА ДЛЯ ПОИСКА MISSING-БЕЛКОВ

О.И. Киселева, Е.В. Поверенная, Е.В. Ильгисонис, С.Е. Новикова, А.Т. Копылов, А.И. Арчаков, Е.А. Пономаренко
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Несмотря на все усилия протеомного сообщества, «белых пятен» на карте протеома все еще много. Существование примерно 15% всех мастерных белков человека до сих пор не нашло экспериментального подтверждения. Вероятно, протеомика достигла того этапа, когда все легкие цели уже достигнуты, и каждая следующая идентификация белка требует все больше упорства при исследовании необычных типов биоматериала в различных состояниях.

Мы объединили разнородные масс-спектрометрические данные, которые были получены членами Российского протеомного сообщества на более чем 25 типах нетривиальных биологических образов и клеточных линий. Результаты свыше 1000 экспериментов были единообразно проанализированы с использованием трех поисковых алгоритмов (X!Tandem, MS-GF+, OMSSA), инкрустированных в платформу SearchGUI. Мы дополнили масс-спектрометрические данные результатами RNASeq, сведениями из репозитория GPMdb и библиотекой аминокислотных сиквенсов neXtProt, чтобы оценить вероятность детекции уникальных – протеотипических – пептидов и, соответственно, шансы на идентификацию соответствующих белков.

Мы идентифицировали 7 missing-белков (т.е. белковых продуктов генов, экспрессия которых подтверждена на транскриптомном уровне, однако соответствующие белки детектировать не удалось) по двум протеотипическим пептидам. Более того, 149 missing-белков были детектированы по одному уникальному пептиду. Также мы проанализировали уровни экспрессии целевых транскриптов, чтобы выявить перспективные цели для дальнейшей валидации missing-белков.

Все белки априори находятся в неравных условиях: некоторые из них имеют конкурентное преимущество быть обнаруженными перед другими белками. Каждый случай идентификации белка (и missing-белка в особенности!) уникален и требует кастомизированных критериев и подходов для обеспечения его надежной идентификации. Нестандартные методологические и биоинформатические решения, примененные к необычным типам биоматериала, могут предоставить недостающие фрагменты протеомного паззла.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ МЕТАБОЛОМИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ И ЕЁ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В.В. Яньшоле[1,2], Л.В. Яньшоле[1,2], Е.А. Зеленцова[1,2], А.Д. Мельников[1,2], О.А. Снытникова[1,2], Ю.П. Центалович[1,2]
[1]МТЦ СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Метаболомика является одной из самых быстроразвивающихся наук «пост-геномной» эры. Метаболом – весь набор низкомолекулярных соединений в ткани – подвержен влиянию большого количества факторов, одним из которых является развитие заболеваний. Патологии приводят к заметным изменениям в метаболоме: нарушаются биохимические циклы, происходят изменения в транспорте молекул. Это, в свою очередь, приводит к изменению состава метаболитов или к изменению их концентраций в исследуемых тканях. Количественная метаболомика, в отличие от качественной или полуколичественной направлена на установление абсолютных значений концентраций метаболитов в ткани (обычно в молях на грамм ткани). В нашей лаборатории был разработан подход метаболомного профилирования – количественного метаболомного анализа исследуемой ткани, основанный на совместном использовании различных инструментальных техник: 1H ЯМР спектроскопии и ВЭЖХ с оптическим и масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения. В результате использования такого подхода получаются данные по десяткам метаболитов, имеющим наиболее высокую концентрацию в ткани. Данный подход позволил применить метаболомику для исследования ряда медицинских и биологических задач, включая установление метаболомных изменений в тканях глаза при развитии офтальмологических заболеваний, определение биомаркеров диабетической язвы и метаболомное профилирование тканей рыб в зависимости от вида рыб и сезона. Одним из наиболее успешных применений метаболомики для медицинских исследований можно назвать работы по изучению возрастной ядерной катаракты (помутнение в центре хрусталика). В результате установлены концентрации более 80 наиболее распространённых метаболитов в хрусталике глаза и в окружающей его водянистой влаге у пациентов с катарактой и без катаракты. Установлено, что основные метаболиты, необходимые для поддержания и защиты хрусталика – антиоксиданты, УФ-фильтры и осмолиты – синтезируются в эпителиальных клетках хрусталика. При развитии катаракты наблюдается уменьшение концентраций данных соединений; это указывает на то, что начальной причиной возрастной ядерной катаракты может являться нарушение функционирования клеток внешнего эпителиального монослоя хрусталика. *Благодарности: Выполнено при поддержке РФФИ (№ 18-33-20097, 17-03-00656, 18-29-09012).*

БЕЛКОВОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА ПРИ ПОМОЩИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

А.М. Рябоконь[1,5], Н.В. Захарова[1], А.Э. Юсупов[1,4], К.Ю. Федорченко[1,5], М.И. Индейкина[1], А.Е. Бугрова[1], А.И. Спасский[2], А.С. Кононихин[1,2,3], С.Д. Варфоломеев[1,5], Е.Н. Николаев[1]

[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; [2]Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН; [3]Сколковский институт науки и технологий; [4]Московский физико-технический институт; [5]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ) сравнительно недавно стал рассматриваться в качестве источника потенциальных биомаркеров различных заболеваний респираторной системы человека. Этот неинвазивный метод диагностики применяется независимо от тяжести заболевания, у пожилых пациентов и новорожденных детей. Анализ КВВ можно выполнять так часто, как это необходимо для контроля за проводимым лечением и тяжестью заболевания. Конденсат выдыхаемого воздуха содержит большое число компонентов - от простых газов до сложных белковых молекул. Применение современных методов, таких как масс-спектрометрия высокого разрешения, обладает огромным потенциалом в области белкового профилирования КВВ. В то же время, низкая концентрация белка и вариабельность состава протеома в КВВ являются серьезными ограничениями для идентификации возможных биомаркеров. Поэтому важной задачей является модернизация методики пробоподготовки образцов КВВ дальнейшего масс-спектрометрического анализа Для анализа белково-пептидного состава КВВ пробы собирали при 3-х разных температурных режимах охлаждении трубки R–tube (Respiratory research, США) (-80°C, -20°C и -10°C). Также был проведен дополнительный метанольный смыв биологического материала со стенок собирающего устройства. Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-МС/МС) проводили на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., США) и масс-спектрометра LTQ FT Ultra (Thermo, Германия). Показано, что оптимальной температурой сбора была -20оС и дополнительная обработка органическим растворителем позволяет существенно увеличить количество детектируемых белков. *Работа выполнения при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-29-09158 МК.*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРИРОДНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ

А.А. Замятнин

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

В живых организмах идентифицируются как эндогенные, так и экзогенные антимикробные олигопептиды [1]. Они могут быть активными по отношению к бактериям, грибам, вирусам, различным нормальным и раковым клеткам, а также к одноклеточным паразитам. Особое внимание сегодня привлечено также к олигопептидам, воздействующим на биопленочные сообщества микроорганизмов. В соответствии с данными базы EROP-Moscow (http://erop.inbi.ras.ru/, [2]) к настоящему времени выявлено и описано около 5000 эндогенных антимикробных олигопептидных структур животных, растений, грибов, бактерий, архей и вирусов. У большинства из них функциональные свойства определены. Значительно меньше известно о функциях фрагментов белков, поступающих в живой организм извне. Подобные исследования, как правило, проводятся на довольно ограниченном круге белков. В то же время число уже выявленных антимикробных фрагментов лишь одного гемоглобина составляет многие десятки и продолжает увеличиваться [3]. Поскольку функции определяются свойствами структуры, нами исследован ряд физико-химических особенностей небольших фрагментов антимикробных олигопептидов. В частности, показано, что характерной особенностью совокупности всех известных молекул этого типа является многократное превышение содержания в них положительно заряженных аминокислотных остатков (K и R) по сравнению с отрицательно заряженными (D и E). Действие многочисленных ферментов в живом организме приводит к расщеплению большинства из 400 возможных пептидных связей и к образованию огромного количества разнообразных фрагментов белков [4-5]. Многие их первичные структуры (особенно ди- и трипептидов) полностью совпадают с аминокислотными последовательностями уже известных антимикробных олигопептидов, что обеспечивает пополнение наших знаний об их функциях без проведения дополнительных экспериментов. Использование этой информации позволяет провести сравнительный анализ роли всей совокупности антимикробных олигопептидов и во многих других регуляторных процессах.

1. Zamyatnin A.A. Progr. Biophys. Mol. Biol., 133, 1-8, 2018.
2. Zamyatnin A.A. et al. Nucleic Acids Res., 34, D261-D266, 2006.
3. Zamyatnin A.A. Biochemistry (Moscow), 74, 201-208, 2009.
4. Zamyatnin A.A. Biophysics, 53, 329-335.
5. Zamyatnin A.A., Voronina O.L. Biochemistry (Moscow), 77, 502-510.

МЕТАБОЛОМНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ И ЦИФРОВОЙ ОБРАЗ ЧЕЛОВЕКА

О.П. Трифонова, П.Г. Лохов, А.В. Лисица, А.И. Арчаков

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

Лабораторная диагностика является неотъемлемой частью современной медицины, позволяющая диагностировать различные заболевания, оценивать риск их возникновения и осуществлять контроль проводимого лечения. Однако существующая клиническая лабораторная практика имеет объективные ограничения по специфичности и чувствительности диагностики заболеваний, что делает актуальным разработку и внедрение в медицину новых методов. Применение "омиксных" технологий, в особенности метаболомики, позволяет преодолеть ряд существующих ограничений. Состав метаболитов крови отражает на молекулярном уровне состояние организма, что делает анализ метаболома крови эффективным средством диагностики заболеваний (метаболомная диагностика), внедрение которой в здравоохранение своевременно и актуально. В работе предложен стандартный протокол измерения метаболома крови человека и способ его оцифровки для получения цифрового образа конкретного пациента. Масс-спектрометрический анализ низкомолекуляной фракции крови на квадруполь-времяпролетном масс-

спектрометре с электроспрейным источником ионизации позволяет детектировать в режиме регистрации положительно заряженных ионов более тысячи ионов метаболитов, которые соответствуют нескольким сотням эндогенных и экзогенных метаболитов, а персонализированный подход, при котором диагностические параметры сравнивают не с данными по популяции, а с собственными данными пациента, позволяет не учитывать "популяционную" составляющую вариативности метаболитов. Для символьного представления цифрового образа человека был выбран двумерный QR-код с очень высокой плотностью данных, для которого был сформирован компактный формат записи в нем метаболомных данных, пригодный как для цельной крови, так и плазмы (или сыворотки). Полученный таким образом цифровой образ содержит информацию достаточную для прецизионной диагностики любого заболевания, компактен, переносим на любом цифровом и бумажном носителе, считывается распространенными портативными устройствами (смартфонами), удобен для каталогизации и архивирования, телемедицины, удобен для мониторинга состояния человека, ведения лонгитудинальных и популяционных медицинских исследований.

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРЕКРЁСТНЫХ РЕАКЦИЙ ИДИОТИПИЧЕСКИХ И АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ И ЭСТРАДИОЛУ МЕЖДУ СОБОЙ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

М.С. Некраш[1], А.Е. Студенников[1], И.С. Гребенщиков[1], А.Н. Глушков[1], Л.С. Дышлюк[2], В.А. Устинов[1]
[1]ФИЦ угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия; [2]Научно-образовательный центр, кафедра бионанотехнологии, КемГУ, Кемерово, Россия

В организме присутствуют идиотипические и антиидиотипические к ним антитела, осуществляющие комплексную регуляцию иммунного ответа, развивающегося на попадание в организм антигена. Цель данной работы состояла в определении наличия взаимодействия между идиотипическими (АТ1) и антиидиотипическими (АТ2) антителами к бензо[а]пирену (BP), а также их кросс реактивность с АТ1 к эстрадиолу (ES). В нашей работе мы использовали следующие одноцепочечные человеческие антитела против BP: T72 – AT1, A4 и B5 – AT2 и AT1 к ES – 119, а также мышиное AT1 против BP – pSh. Антитела были экспрессированы в бактериальных клетках E.coli и затем выделены аффинной хроматографией, для облегчения которой в антителах присутствовал либо CBD (целлюлоза связывающий домен, Cellulose-Binding Domain), либо 6-His хвост. Наличие связывания между антителами определялось методом прямого неконкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). После чего проводился конкурентный ИФА, определяющий специфичность связывания. При прямом ИФА иммунологические планшеты сенсибилизировали анализируемым антителом, имеющим 6-His хвост, после чего подавался BSA для предотвращения неспецифического связывания. Затем, в уменьшающейся концентрации, подавалось антитело, содержащее CBD. Затем наносились растворы, позволяющих провести детекцию комплекса. При конкурентном ИФА иммунологические планшеты сенсибилизировали AT2, имеющие 6-His хвост, затем забивали планшет BSA, после чего подавали раствор: AT1 к BP в постоянной концентрации, содержащих CBD, и AT1 к ES с 6-His хвостами, в уменьшающейся концентрации с шагом разведения 2. Затем наносился детектирующий по CBD комплекс из анти-CBD и антикроличьих антител, меченых пероксидазой хрена. Результаты конкурентного ИФА демонстрируют наличие конкуренции при взаимодействии AT1 к BP и ES с B5 и отсутствии конкуренции при их же взаимодействии с A4. Таким образом, AT1 к BP связываются с AT2 к BP, AT2 к BP способны проявлять кросс-реактивность и взаимодействовать с AT1 к ES. Человеческие антитела к BP способны связываться с мышиными AT1 к BP. *Работа поддержана программой Госзадание №0352-2016-0001.*

ПРОТЕОМ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА: МЕЖИНДИВИДУАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ БЕЛКОВ, ВЕРИФИЦИРОВАННЫХ FDA

С.Е. Новикова, Т.Е. Фарафонова, Н.А. Шушкова, В.Г. Згода, А.И. Арчаков
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Протеомный состав биологического образца служит важнейшей характеристикой биологического объекта, и позволяет сделать вывод о его нормальном или патологическом состоянии. Определение белковых маркеров лежит в основе диагностики многих заболеваний, в том числе инфаркта миокарда, нарушения функций печени и почек, диабета, гормональных нарушений, воспаления и онкологических заболеваний. Направленный масс-спектрометрический анализ, а именно мониторинг выбранных реакций (selected reaction monitoring, SRM) с использованием синтетических изотопно-меченых внутренних пептидных стандартов (Isotopically labeled internal standard, SIS) является основной альтернативой методу ИФА для анализа диагностически значимых белков. С помощью данного метода в цельной плазме крови, полученной от 31 здорового добровольца, были проанализированы белки, рекомендованные для диагностики агентством по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA, Food and Drug Administration). В режиме динамического SRM мониторировались 852 транзиций для 296 прекурсоров, соответствующих 148 уникальным протеотипическим пептидам и их синтетическим аналогам, картируемым на 111 белков. В результате 59 пептидов, соответствующих 44 белкам были обнаружены во всех пробах. Минимальная и максимальная концентрации были определены для пептидов, соответствующих фактору свёртывания крови IX (фактор Кристмаса) (12 M^{-9} или 0,6 мкг/мл) и для константному участку легких цепей иммуноглобулинов каппа (0,1 M^{-3} или 1 мг/мл), соответственно. Для 23 пептидов, соответствующих 20 белкам, межиндивидуальная вариабельность оказалась менее 30 %. Наибольшие изменения (межиндивидуальная вариабельность более 50%) наблюдались для константного участка тяжелой цепи иммуноглобулина класса D, гаптоглобина, связывающего половые стероиды глобулина SHBG и липопротеин-(а). Полученные результаты представляют собой фундаментальный научный задел для разработки диагностической тест-системы для количественного измерения с использованием направленной масс-спектрометрии белков, ассоциированных с развитием заболеваний. *Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы. Эксперименты выполнены с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» (ИБМХ).*

ГЕНОМ. ПРОТЕОМ. МЕТАБОЛОМ

Стендовые доклады и конкурс молодых ученых

ВЛИЯНИЕ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ СПЛАЙСИНГА И ПРЕПАРАТОВ, ПОВРЕЖДАЮЩИХ ДНК, НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК

К.С. Ануфриева[1,2,3], В.О. Шендер[1,2], Г.П. Арапиди[1,2,3], П.В. Шнайдер[1], М.А. Лагарькова[1], В.М. Говорун[1,3]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [3]Московский физико-технический институт (Государственный университет), Москва, Россия

Противоопухолевые препараты, основанные на ингибировании сплайсинга (Сплайсостатин А, Пладиенолид В), зарекомендовали себя как перспективные химиопрепараты для лечения онкологических заболеваний. Однако клинические испытания I фазы выявили высокую токсичность данных соединений. Проведённые нами ранее мета-анализы опубликованных транскриптомных, протеомных, фосфопротеомных и секретомных наборов данных продемонстрировали, что препараты, повреждающие ДНК, приводят к понижению количества сплайсосомных белков в клетке. Согласно нашим результатам, снижение представленности сплайсосомных белков может способствовать выживанию раковых клеток после терапии, запуская арест клеточного цикла и сигнализируя клетке о необходимости репарации ДНК. Мы показали, что подобный ответ раковый клетки на химиотерапию, вызывающую повреждение ДНК, может быть подавлен ингибиторами сплайсинга (Пладиенолид В). На основании данных по выживаемости клеточных линии и оценки уровня апоптоза мы выявили, что Пладиенолид В значительно повысили чувствительность раковых клеток к воздействию агентов платинового ряда. Проточная цитофлуориметрия и иммунофлуоресцентный анализ на маркеры ДНК репарации (фосфо-ATM) выявили, что эффективность химиотерапии, основанной на последовательном применении Пладиенолида В и агентов платинового ряда, связана со снижением эффективности репарации ДНК. Такой синергичный эффект мог бы позволить снизить терапевтические дозы данных препаратов и избежать побочные эффекты, обнаруженные у пациентов при терапии препаратами ингибиторов сплайсинга. *Работа поддержана Грантом РНФ 17-75-20205, РФФИ 18-34-00622.*

ГРАНИЦЫ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ПРОТЕОМА *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*

И.О. Бутенко, Д.С. Матюшкина, О.М. Алехина, В.М. Говорун
ФНКЦ физико-химической медицины, Москва, Россия

Одними из наиболее удобных модельных организмов для системных биологических исследований являются бактерии класса молликут. Их отличительными чертами являются отсутствие клеточной стенки, 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 молликут, ведущих исключительно паразитический образ жизни, вид *Acholeplasma laidlawii*, также принадлежащий к классу молликут, относят в основном к сапрофитам и комменсалам, их удавалось обнаружить в тканях растений и сточных водах, что позволяет предположить у них сравнительно большие адаптивные способности. В данной работе на модели *Acholeplasma laidlawii* был разработан метод протеомного профилирования отдельных колоний и моноклональных культур. С помощью данного подхода был изучен ответ *A. laidlawii* на обработку ингибитором матричного синтеза - рифампицина. С помощью метода мониторинга множественных реакций (MRM) были получены протеомные профили отдельных колоний и полученных из них моноклональных культур *A. laidlawii* после обработки бактериальной культуры рифампицином. Была установлена степень вариабельности ключевых белков *A. laidlawii* между различными клонами, а также определена группа белков, чья представленность не варьировала. Таким образом были получены качественные и количественные характеристики протеома *A. laidlawii*, и получена оценка пределов вариабельности состава протеома *A. laidlawii*. *Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-08041 «Создание стабильных метаболических контейнеров для воспроизводства искусственного генома».*

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ СПЛАЙС-ОПОСРЕДОВАННЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА

О.И. Киселева, Е.В. Поверенная
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Для человека известно порядка 20 тыс. белок-кодирующих генов, при этом количество уникальных белковых молекул (протеоформ) может достигать 2 млрд. Для ряда протеоформ, кодируемых одним и тем же геном, показаны их различные функции, в частности, связанные с развитием патологических процессов.

Одним из источников такого множества белковых продуктов является альтернативный сплайсинг. Аминокислотные последовательности сплайс-опосредованных белковых продуктов одного гена могут значительно различаться между собой, что, в частности, может обуславливать отличия в профиле белков-партнеров и, как следствие, их разные функции. Существенные отличия в белковых сиквенсах в ряде случаев позволяют надежно дифференцировать между собой протеоформы одного гена с помощью масс-спектрометрии.

В данной работе мы использовали метод виртуальной копреципитации, принцип которого заключается в определении частоты совстречаемости белков в масс-спектрометрических экспериментах, депонированных в глобальные масс-спектрометрические репозитории. В результате интерактомного анализа, выполненного методом виртуальной копреципитации на более чем 400 тыс. протеомных экспериментов из тематической базы GPMdb, для 1103 сплайс-опосредованных протеоформ человека были выявлены белок-белковые взаимодействия. Для 10% из них выявленное количество белковых партнеров оказалось достаточным для аннотации в терминах Gene Ontology, а также для сопоставления интерактомных профилей нескольких протеоформ одного гена. Различия в функциональной аннотации были выявлены для сплайс-форм, кодируемых 115 генами.

Более того, сопоставление полученных результатов с анализом экспрессии сплайс-форм в различных типах биоматериала по данным репозитория The Cancer Genome Atlas показало, что для четверти генов превалирующим белковым продуктом является не каноническая, а сплайс-опосредованная протеоформа, что подчеркивает необходимость исследования функциональных свойств аберрантных протеоформ через анализ их интерактомных профилей в контексте глобальной белковой сети. *Данная работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00879.*

ПРОТЕОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ БЕЛКОВОГО СОСТАВА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ САРКОМ ЧЕЛОВЕКА

М.А. Ковалева, Л.И. Ковалев, Т.Ю. Исайкина, Н.В. Пашинцева, К.В. Лисицкая, Л.С. Еремина, С.С. Шишкин
Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

В работе использовались клеточные линии RD (рабдомиосаркома), SK-UT-1B (лейомиосаркома) и U2-OS (остеосаркома). Фракционирование белков проводилось двумерным электрофорезом (ДЭ) в ПААГ. Цифровые изображения анализировались с помощью пакета программ ImageMaster 2D Platinum версия 7. Идентификация белковых фракций из ДЭ после трипсинолиза проводилась методами MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии. На ДЭ белков исследованных линий детектировалось до 500 фракций в диапазоне мол. масс от 10 до 500 кДа, и pI от 4,5 до 10,0. Помимо общих для сарком изменений как пример резкого увеличения количества ряда изоформ гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов по сравнению с нормальными клетками (мезенхимные стволовые клетки, миобласты и др.) [1] были выявлены и белки, демонстрирующие выраженную специфичность для каждого типа сарком человека. Были идентифицированы 63 фракции в остеосаркоме, 61 в рабдомиосаркоме и 34 в лейомиосаркоме. Специфичность показали фракции ингибитора сериновых протеаз серпина H1 в рабдо- и лейомиосаркоме, которые многократно снижаются в количестве в клеточных линиях аденокарцином [2]. Такой эффект был выявлен только у линии остеосаркомы, где также обнаружена мажорная фракция изоформы 2 филамина, впервые экспериментально выявленная на белковом уровне в тканях человека. Кроме того, у этой линии активно увеличивается экспрессия белка S100A10. В остео- и рабдомиосаркоме отмечена экспрессия нетипичных изоформ α-тропомиозина, а в рабдомиосаркоме обнаружена в большом количестве изоформа 1 холод-индуцируемого РНК-связывающего белка. Для лейомиосаркомы также было выявлено многократное увеличение экспрессии фракций фосфоглицераткиназы 1, триозофосфатизомеразы 1, глицераль-3-фосфатдегидрогеназы, α-енолазы и фосфопротеина, стимулированного вазодилататором, что отражает нарушения в соответствующих биохимических циклах, а также было идентифицировано увеличение экспрессии полиаденилат-связывающего белка и белка слияния злокачественной липосаркомы, что показывает существование разных механизмом малигнизации сарком.

1. Шишкин С.С. и соавт.// Прикладные информационные аспекты медицины. 2018, 21, 4, 149-156.
2. Ковалева М.А. и соавт.// Acta naturae. 2016, 2, 74.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ БЕРЕМЕННОСТИ ПО ПЕПТИДОМНОМУ ПРОФИЛЮ МОЧИ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

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

Учитывая высокую материнскую и перинатальную заболеваемость и смертность, а также ближайшие и отдаленные последствия преэклампсии, наиболее актуальной проблемой является прогнозирование и ранняя (доклиническая диагностика) данной патологии. В связи с этим особое значение приобретает дифференциальная диагностика гипертензивных расстройств во время беременности, характер которых определяет не только исходы беременности для матери и плода, но и качество последующей жизни женщины. Целью исследования являлось создание подхода для дифференциальной диагностики гипертензивных осложнений беременности по пептидомному профилю мочи методом масс-спектрометрии высокого разрешения. В исследование было включено 109 женщин, разделенных на группы: преэклампсия (ПЭ), ПЭ на фоне ХАГ (хроническая артериальная гипертензия), ХАГ, ГАГ и группа контроля. Образцы мочи, полученные от каждой женщины, были проанализированы при помощи нано-ВЭЖХ-МС/МС, а также проведен качественный анализ MALDI-MS. Идентификация и анализ полуколичественных данных проводился с использованием комплементарных биоинформационных платформ (MaxQuant, PEAKS). В результате исследования был разработан подход для всестороннего анализа пептидома мочи, который включает в себя пробоподготовку с помощью эксклюзионной хроматографии, идентификацию выделенных пептидов с помощью нано-ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения, а также полуколичественный и статистический анализ данных [1]. Для всех групп были выявлены характерны общие пептиды, которые являются в основном фрагментами коллагена (COL1A1;COL3A1 и др.). Для группы пациенток с преэклампсией (ПЭ, ПЭ на фоне ХАГ) была выявлена характерная панель пептидов, которые являются фрагментами белка альфа-1-антитрипсина (SERPINA1). В результате сравнительного анализа была сформирована панель пептидов, позволяющих достоверно дифференцировать гипертензивные расстройства у беременных. Фрагменты альфа-1-антитрипсина подтвердили свою значимость как маркеры преэклампсии. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (16-54-21011 ШНФ, 17-08-01537 А, 18-315-00435 мол_а).*

[1] Kononikhin AS, et. al. Peptidomics. Methods in Molecular Biology 2018. Vol. 1719. P.311-318.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕКТРА БЕЛКОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЛЕРОЦЕРКОИДОВ ЛЕНТЕЦА ЧАЕЧНОГО *DIPHYLLOBOTHRIUM DENDRITICUM* (CESTODA) МЕТОДОМ 2D-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

И.А. Кутырев[1], О.Б. Горева[2], О.Е. Мазур[1]
[1]Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ; [2]НИИ молекулярной биологии и биофизики ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

Паразитизм является одним из наиболее успешных образов жизни, демонстрируемых живыми организмами, если учитывать частоту его встречаемости и огромную численность паразитических видов. Многочисленные способы защиты от иммунного ответа хозяина позволяют паразитам расти, выживать и длительное время сохраняться в организме хозяина. В последние годы усилился интерес к идентификации белковых иммунорегуляторных молекул, вырабатываемых паразитическими червями. Нами начаты исследования по идентификации белков лентеца чаечного *D. dendriticum*, имеющего важную эпидемиологическую и эпизоотическую значимость. На первом этапе мы определили спектр белков плероцеркоидов лентеца методом 2D-электрофореза.

Протеомный профиль лентеца *D. dendriticum* состоит из 723 белковых пятен с pI от 3 до 10. Проведенный анализ показал, что белки имеют интенсивность пятен в диапазоне от 1255 до 19914. Большая часть белков располагаются в районе pI от 4,7 до 7,0 и имеет молекулярную массу от 20 до 260 кДа. Среди пятен с высокой интенсивностью обращает на себя внимание фракция как минимум из шести мажорных белков (интенсивность от 8764 до 19914) с молекулярной массой около 67 кДа и pI 5,6-6,1, вероятно являющихся изомерами. Относительный объем пятен данных белков составляет 4,8%. Похожая группа белков с приблизительной молекулярной массой 54 кДа и pI 5,2-5,4 также включает пятна с высокой интенсивностью от 10441 до 14014 и общим относительным объемом 0,9%. Аналогичные фракции белков наблюдаются в области pI 5.0-5,7 как среди высокомолекулярных белков с массами 100, 259, 372, 396 кДа, так и среди низкомолекулярных белков с массами 24, 26, 30 кДа. Однако интенсивность пятен данных групп не столь высока, как в описанных первых двух группах. Также стоит отметить отдельно расположенные пятна с высокой интенсивностью 16022 (MW 42 кДа, pI 4,8, 0,62% Vol), 14935 (MW 18 кДа, pI 5.0, 0,57% Vol), 11294 (MW 18 кДа, pI 4,9, 0,65% Vol), 11183 (MW 16 кДа, pI 4,3, 0,31% Vol) 13396 (MW 13 кДа, pI 4,9, 0,41% Vol), и 10751 (MW 96 кДа, pI 8,3, 0,36% Vol). Все эти белки обладают высоким относительным объемом пятен. Семьсот белковых пятен имеют интенсивность не более 10000, а 520 из них менее 5000. Эти пятна равномерно распределены по всей протеомной карте, исключая особенно кислую область. *По проекту РФФИ № 18-34-20015.*

ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКОВ, КОДИРУЕМЫХ 18-ой ХРОМОСОМОЙ ЧЕЛОВЕКА, У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ С ПОМОЩЬЮ АСМ

Т.О. Плешакова[1], А.Л. Кайшева[1], В.С. Зиборов[2], И.Д. Шумов[1], Н.Е. Кушлинский[3], Ю.Д. Иванов[1], А.И. Арчаков[1]
[1]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; [2]Объединенный институт высоких температур РАН; [3]НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия

Опухоли яичников эпителиального происхождения составляют до 90% в структуре злокачественных новообразований яичников. В связи с высокой летальностью и отсутствием эффективных методов ранней диагностики, заболевание является одной из основных проблем в онкогинекологии. Актуальным является развитие серологических методов ранней диагностики для выявления новых кандидатных маркеров онкопатологии. Перспективным является развитием методов детекции единичных молекул в биообразцах с использованием комбинации атомно-силовой микроскопии (АСМ) и масс-спектрометрии (МС). АСМ является молекулярным детектором, позволяющим регистрировать отдельные белки и белковые комплексы на поверхности атомарно-ровной подложки – АСМ-чипа. Регистрация целевых белков проводится после процедуры фишинга – вылавливания белков из объема анализируемого раствора на участок поверхности небольшой площади (сенсорную зону), модифицированный аффинными реагентами против целевого белка. Использование процедуры биоспецифического обогащения позволяет эффективно сконцентрировать молекулы целевых белков в количестве достаточном для последующего масс-спектрометрического анализа. Доклад посвящен результатам работы, в которой для анализа образцов крови пациентов (n=15) были использованы АСМ-чипы с массивом сенсорных зон. Массив содержал 16 типов молекулярных зондов (антител или аптамеров) против 11 белков, кодируемых 18-ой хромосомой человека, и две контрольные зоны. Результаты АСМ-сканирования поверхности рабочих зон после анализа образцов показали, что на поверхности сенсорных зон регистрируются комплексы аптамер/белок или антитело/белок во всех случаях анализа, кроме контрольных сенсорных зон. Масс-спектрометрический анализ методом направленного мониторинга выбранных реакций (СРМ-МС) гидролитических смывов с поверхности АСМ-чипов позволил выявить в образцах биологического происхождения целевые белки, кодируемые 18-ой хромосомой. Выявленные белки являются продуктами трансляции онкогенов – белок Serpin b3, тимидилат-синтаза (TYMS), белок Bcl2, ядерный фактор активации Т-клеток (NFATc1) и транскрипционный фактор GATA6. Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА: ВЫДЕЛЕНИЕ, МОРФОЛОГИЯ, СОСТАВ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

С.Е. Седых[1,2], Л.В. Пурвиньш[1,2], Е.И. Рябчикова[1,2], Г. А. Невинский[1,2]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Экзосомы – везикулы диаметром от 40 до 100 нм. Экзосомы выделены из различных биологических жидкостей: плазмы крови, мочи, слез, молока, а также культуральной жидкости. Известно, что экзосомы содержат белки, липиды, различные формы нуклеиновых кислот. В настоящее время биохимические компоненты экзосом молока изучены значительно менее подробно, чем, например, экзосом плазмы крови или культуральной жидкости. Показано, что состав экзосом значительно зависит от способа их выделения, причем использование только ультрацентрифугирования приводит к совыделению с экзосомами

большого количества белков и мРНК, которые не могут быть собственными компонентами экзосом. Ранее мы модифицировали стандартный протокол выделения экзосом, добавив в него стадию гель-фильтрации. Полученные препараты экзосом молока человека, коровы и лошади были проанализированы электронной микроскопией и проточной цитофлуориметрией. Данные методы подтвердили, что использование нескольких методов выделения и очистки экзосом позволяет получать препараты, практически не содержащие совыделяющихся примесей и содержащие специфические маркеры экзосом: CD9, CD63 и CD81. Методом электрофореза в полиакриламидном геле и MALDI-TOF-MS и MS/MS определены мажорные белки экзосом молока. Методом ПЦР в реальном времени с использованием stem-loop праймеров определены микроРНК, а также мРНК экзосом молока. Данные о составе белков и нуклеиновых кислот экзосом указывают на возможность их использования в качестве агентов для доставки лекарственных препаратов и терапевтически значимых нуклеиновых кислот в клетки.

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВОГО МИКРОЧИПА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ

А.С. Тараскин[1,2], А.А. Ложков[1,2], К.И. Лебедев[1], М.А. Плотникова[1], С.А. Клотченко[1]
[1]НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ; [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Одной из важнейших проблем здравоохранения остаются инфекционные заболевания респираторного тракта, на долю которых ежегодно приходится 3–5 млн тяжёлых случаев, из которых более 250 000 заканчиваются летальным исходом. Однако современные методы их молекулярной диагностики по-прежнему ограничены. Проект направлен на разработку макета многопараметрического диагностического комплекса (ТОРИ-ТЕСТ), включающего набор реагентов и аппаратно-программный комплекс (анализатор флуоресценции), обеспечивающего высокопроизводительный и высокочувствительный мультиплексный анализ гриппоподобных заболеваний (ГПЗ) и тяжёлых острых респираторных инфекций (ТОРИ), представляющих серьёзную угрозу здоровью населения. Макет набора реагентов предназначен для выявления как самих вирусов, так и для анализа прогностических маркеров системной воспалительной реакции организма. Таким образом, диагностический комплекс позволит не только выявлять этиологические агенты, но и предоставлять информацию для оценки тяжести течения заболевания. На данный момент создан прототип универсального белкового микрочипа, способный одновременно детектировать вирусы гриппа типа А и В, вирусы парагриппа II и III типа, аденовирус и респираторно-синцитиальный вирус, поскольку они имеют наибольшее эпидемиологическое значение среди респираторных вирусов, вызывающих острые, тяжёлые и/или хронические заболевания. В качестве основных маркеров воспаления были выбраны: С-реактивный белок (СРБ), MxA, липополисахарид-связывающий белок (LBP), интерлейкины IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-18. Повышение уровня данных маркеров в клинических образцах может быть следствием сложного течения вирусной и/или бактериальной инфекции. В ходе работы сформирована коллекция клинических образцов (назофарингеальные мазки и образцы сыворотки крови) от более чем 400 пациентов. В настоящее время проводится апробация биочипа на клинических образцах пациентов с острыми респираторными инфекциями, наличие которых подтверждено сертифицированными ОТ-ПЦР наборами в мазках из носоглотки. *Проект поддержан Министерством науки и высшего образования России (Соглашение № 14.604.21.0180, идентификатор проекта RFMEFI60417X0180).*

ОТ ПРОТЕОМА К ГИПОТЕЗЕ: ПРИЧИНЫ ДЕФЕКТНОГО СИГНАЛА ИНТЕРФЕРОНОВ I ТИПА В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ

И.А. Тарасова[1], А.В. Соболева[2], Ю.В. Бубис[1], А.В. Липатова[2], Е.М. Соловьева[1], В.А. Горшков[3], И.Ю. Ильина[4], С.А. Мошковский[4], Ф. Кьелдсен[3], М.В. Горшков[1], П.М. Чумаков[2]
[1]Институт энергетических проблем химической физики РАН им. В.Л. Тальрозе, Москва, Россия; [2]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; [3]Университет Южной Дании, Оденсе, Дания; [4]Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Глиобластома мультиформная является на сегодняшний день неизлечимым заболеванием, что стимулирует исследования и разработку новых методов терапии. Экспериментальная терапия с использованием онколитических вирусов демонстрирует способность уничтожать клетки глиобластомы и вызывать устойчивую ремиссию. Среди прочих факторов, успех терапии зависит от состояния механизмов противовирусной защиты в злокачественных клетках, что определяет чувствительность к онколитическим вирусам. В работе представлены результаты масштабного исследования сигналинга интерферонов I типа на клеточных моделях мультиформной глиобластомы. Используя методы панорамной протеомики, определены белки, регуляция которых изменяется при обработке культур с сохранным и нарушенным противовирусным ответом. По результатам количественного анализа и анализа генных онтологий, а также кластеризации дифференциально-регулированных белков по функциональной активности, предложены гипотезы о различиях в сигнальных путях JAK/STAT каскада для интерферонов α и β (IFNα, IFNβ). Известно, что IFNα и IFNβ имеют разное сродство к рецептору IFNAR1/2. Этим фактом и принято объяснять различия в активности интерферонов I типа [10.1128/MCB.26.5.1888-1897.2006]. В то же время, отмечается, что молекулярные пути, отличающие сигналинг IFNα от IFNβ остаются неизвестными [10.1016/j.cell.2015.12.027]. В данной работе были получены данные, свидетельствующие о том, что отклик на обработку IFNα имеет ярко выраженные отличия в представленности белков генов HLA и других, также вовлеченных в процессинг и презентацию антигена. Соответственно, в откликах на IFNα также представлены белки протеасомы, вовлеченные в процессы деградации и посттрансляционных модификаций. При этом на уровне сигнальных трансдьюсеров и активаторов транскрипции, а также белков с противовирусными свойствами, молекулярные отклики на интерфероны не отличались. Такой результат предполагает активацию разных сигнальных путей JAK/STAT каскада на уровне комплексов STAT1, включая как канонические, так и неканонические. Кроме того, были проанализированы

«персонализированные» отклики культур глиобластомы и астроцитов на обработку IFNα, с целью выявления возможных компенсаторных механизмов, активирующихся в культурах с нарушениями интерферонового сигналинга. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (№18-29-01059).*

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ СКРИНИНГ ГЕНОВ, ПОВЫШАЮЩИХ ВЕРОЯТНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ДРОЖЖЕЙ

А.И. Александров[1,2], Э.В. Гросфельд[2,3], О.В. Митькевич[2], Е.С. Шилов[4], Е.М. Лупанов[2,5], С.Е. Дмитриев[1], В.Н. Гладышев[1,6]

[1]НИИ физико-химической биологии им. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН; [3]Кафедра молекулярной и клеточной биологии, Московский физико-технический институт (Государственный университет); [4]МГУ им. М.В. Ломоносова; [5]Институт химической технологии им. Менделеева, Москва, Россия; [6]Отдел генетики, департамент медицины, Госпиталь Бригхам и Вумен, Гарвардская медицинская школа, Бостон, Массачусетс, США

Гибель клеток – это одно из важных событий в ходе старения различных организмов. В то же время, отсутствуют систематические данные о том, нарушение работы каких клеточных систем увеличивает вероятность гибели клеток. В данной работе мы использовали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* для скрининга генов, нарушение экспрессии которых увеличивает вероятность гибели клеток. Мы применили флоксин, нетоксичную краску, которая не проникает в живые клетки и окрашивает мертвые клетки, для анализа систематических коллекций дрожжевых мутантов с делециями нежизненно важных генов и сниженной продукцией жизненно важных генов. Мы обнаружили ~200 генов увеличивающих гибель клеток, и примерно 2/3 из них были жизненно-важными. Гибель клеток была подтверждена с помощью проточной цитометрии клеток, окрашенных йодистым пропидием. Оказалось, что окраска колоний флоксином выявляет различные типы гибели – некоторые колонии окрашивались по внешнему краю, другие были окрашены равномерно, в то время как другие окрашивались только в центре колонии. Это указывает на то, что мутанты обладают различной чувствительностью к условиям культивирования в колонии, например к контакту со средой, ограниченному поступлению питательных веществ и высокой плотности культивирования. Для выявления репликативного возраста, в котором наиболее вероятна гибель клеток, мы разработали специальный тест DIVision Arrest assay (DIVA) и обнаружили, что для ~20% флоксин-положительных мутантов наблюдается увеличенная вероятность остановки деления клеток, которые до того не делились ни разу. Удивительным образом, мы обнаружили аналогичное явление для ~5% флоксин-отрицательных мутантов, которые были случайным образом взяты из коллекции штаммов со сниженной экспрессией жизненно важных генов. Наши данные впервые дают систематическое представление о генах, недостаток экспрессии которых увеличивает вероятность гибели клеток. Также они указывают на существование различных типов гибели в мутантах дрожжей и демонстрируют остановку деления клеток в раннем возраста в качестве характерной особенности штаммов с увеличенной гибелью. *Работа была поддержана грантом правительства Российской Федерации (РФ) 14.W03.31.0012, грантом Президента РФ для молодых ученых МК-3323.2019.4, а также Министерством науки и высшего образования РФ.*

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТЕОМА КЛЕТОК *YARROWIA LIPOLYTICA* В ПРОЦЕССЕ ХРОНОЛОГИЧЕСКОГО СТАРЕНИЯ В ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ И ПРИ АДАПТАЦИИ К СУБЛЕТАЛЬНОМУ СТРЕССУ

Н.О. Иванова, В.Ю. Секова, Л.И. Ковалев, Ю.И. Дерябина

[1]Московский политехнический университет; [2]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Одной из наиболее удачных моделей старения являются дрожжевые организмы, использование которых позволяет быстро и экономично исследовать изменения физиологии клеток с течением времени. Ранее на модели *Saccharomyces cerevisiae* было показано, что стрессовые воздействия могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на продление жизни микроорганизмов. В данной работе исследовали старение культуры полиэкстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica*, используя три модели, отличающиеся по pH среды культивирования и продолжительности роста: pH 5.5, 18 ч. – логарифмическая стадия роста (I): pH 9.0, 40 ч. – логарифмическая стадия роста (II); и pH 9.0, 70 ч. – переход в стационарную стадию роста (III). Клеточные экстракты были разделены методом двумерного электрофореза с последующей идентификацией белков методом MALDI-TOF. Идентифицированные белки были разделены на 4 группы: 1) белки, общие для всех трёх вариантов, включая гипотетические белки, предположительно, обладающие активностью формиатдегидрогеназы и оксидоредуктазы, а также два гипотетических белка с неустановленной функцией; 2) белки, характерные только для культур I и II - гипотетическая сериновая эндопептидаза и белок семейства 70 кДа белков теплового шока (БТШ); 3) белки, характерные для моделей II и III, включающие гипотетический 70 кДа БТШ, гипотетический мембранный рецептор, участвующий в «узнавании» и слиянии мембран, а также гипотетический белок с каталазной активностью, присутствующий у III культуры; 4) многочисленная группа белков, общих для I и III культур, среди которых ортолог гипотетического белка с оксидоредуктазной активностью, β-субъединица АТФ-азы F1, 70кДа БТШ и белок, являющийся компонентом котрансляционного свертывания белка *de novo*. Интересно отметить, что в культуре I этот компонент присутствовал как в виде 65 кДа белка, так и 35 кДа фрагмента. При этом у культуры III была наиболее выражена экспрессия двух белков: НАДФН-зависимой конъюгированной поликетонной редуктазы C1 и ортолога L-малатдегидрогеназы – одного из ферментов ЦТК различных грибов рода Candida. Таким образом, наибольшее сходство протеома обнаруживается между культурами I и III, что может свидетельствовать о принципиально разной физиологии логарифмической стадии роста в присутствии сублетального стресса и без него.

ОСЦИЛЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ КАК ОСНОВНОЙ МЕХАНИЗМ СТАБИЛЬНОГО СУЩЕСТВОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

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

Процессы, протекающие по механизму осцилляций, имеют очень широкое распространение в природе. В неорганических системах колебаниям подвержены как макропроцессы, так и молекулярные явления на уровне химических реакций, протекающих без термодинамического равновесия, как например, в случае реакции Белоусова–Жаботинского. Поскольку живые организмы являются открытыми неравновесными системами, способными к самоорганизации, то в них происходят осцилляции на всех уровнях биологической организации – от экосистем и многоклеточных организмов до отдельных клеток, биополимеров и метаболитов. Колебания играют ведущую роль в таких фундаментальных процессах, как циркадные ритмы, передача сигналов между клетками, подвижность, клеточный цикл, регуляция экспрессии генов и т.д. Первые биохимические осцилляторы живых клеток были открыты в таких метаболических путях, как гликолиз, пероксидазная реакция и производство цАМФ. Поскольку гликолиз является одним из центральных путей во всех клетках и самым древним способом катаболизма глюкозы и получения АТФ, то его колебательная динамика и синхронизация этого процесса должны иметь ведущее значение для стабильности биологических систем. Используя модельный организм *Mycoplasma gallisepticum*, имеющий один из самых маленьких геномов среди бактерий и сильно редуцированный метаболизм, мы получили убедительные данные о существовании осцилляций в гликолитических реакциях одной из самых простых живых систем. Было обнаружено, что в бесклеточных экстрактах, приготовленных путем осмотического лизиса клеток, происходят устойчивые колебания концентрации НАДН – одного из главных интермедиатов гликолиза – с периодом в 10 минут и продолжительностью около 3 часов. *In vivo* эксперименты по введению в живые клетки избытка метаболитов гликолиза позволили установить, что основным регулятором этого важнейшего процесса является фосфоенолпируват, поскольку резкое изменение его концентрации приводит к рассинхронизации гликолиза и гибели клеток. Далее предполагается выявить другие метаболические пути клетки, осуществляющиеся по механизму самоподдерживающихся осцилляций, и создать минимальную систему биохимических реакций, способную к автономному существованию и воспроизводству искусственного генома. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-08041.*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЛИН-СПЕЦИФИЧНЫХ ПЕПТИДАЗ У АЛКАЛОФИЛЬНЫХ И АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫХ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Н.А. Алкин[1], Я.Е. Дунаевский[2], М.А. Белозерский[2], Г.А. Белякова[1], В.Ф. Терещенкова[3], И.Ю. Филиппова[3], Е.Н. Элпидина[2]
[1]Кафедра микологии и альгологии, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Отдел белков растений, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Кафедра химии природных соединений, Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Анализ 42 секвенированных геномов грибов, относящихся к различным трофическим и экологическим группам, выявил присутствие в них широкого круга гомологов пролин-специфичных пептидаз (ПСП), для некоторых из найденных ПСП была показана таксоноспецифичность и приуроченность к определённым эколого-трофическим группам грибов. Поиск их активностей и их характеристика проводились на алкалофильных и алкалотолерантных грибах с целью выяснения влияния на их ферменты экстремальных условий местообитания хозяев. В секвенированном геноме алкалофила Sodiomyces alkalinus F11 обнаружено 9 гомологов ПСП, согласующихся с их систематическим положением. Наиболее представленными видами ПСП у исследованных 7 штаммов грибов были дипептидилпептидаза 4 (ДПП4) и пролиламинопептидаза (ПАП). ДПП4 относилась к классу сериновых пептидаз, ингибировалась специфичными ингибиторами ДПП4 (дипротинами А и Б и вилдаглиптином) и у алкалофилов, в отличие от алкалотолерантов, была представлена двумя формами – внутриклеточной и внеклеточной. Ингибиторный анализ позволил отнести ПАП к металлопептидазам, данный фермент локализован иключительно внутриклеточно. Оптимальный pH действия всех обнаруженных ферментов лежал в нейтральной и слабощелочной области (pH 7.0-7.7), однако их активность сохранялась на высоком уровне в широком диапазоне pH (5.0-12.0 для ДПП4 и 5.0-10.0 для ПАП). Все обнаруженные ферменты являлись галостабильными и сохраняли 40-60% активности в условиях экстремальной солёности (6M NaCl). *Работа поддержана грантом РФФИ №19-04-00852 А.*

ПРОТЕОМНЫЕ БИОМАРКЕРЫ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

Е.М. Дмитриева[1], А.А. Серегин[1], Л.П. Смирнова[1], А.А. Летова[2], Е.Г. Корнетова[1], В.Г. Згода[3]. А.В. Семке[1], С.А. Иванова[1]
[1]НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр, Томск; [2]Сибирский государственный медицинский университет, Томск; [3]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Шизофрения характеризуется отсутствием точной этиологии и патофизиологических механизмов, что является причиной трудностей в прогнозировании ответов на лечение и исходов для пациентов с этим заболеванием. В настоящее время очень важен поиск биомаркеров на основе крови, которые могут быть использованы для диагностики и прогноза эффективности терапии, поскольку диагностика шизофрении основана только на клинических симптомах. В исследование было включено 33 пациента с диагнозом параноидная шизофрения (F20.0) и 24 здоровых донора. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием Q-exactive HF масс-спектрометра (Thermo Fisher Scientific). Белки идентифицировали путем использования программного обеспечения Mascot Ver. 2.1 (www.matrixscience.com, «Matrix Science»). Количественную оценку белков проводили набором ELISA Kit from Homo sapiens (Cloud–Clone Corp., USA). С помощью целевого количественного масс-спектро-

метрического анализа с использованием синтетического меченого стандарта определено количество белка zNMDAR. Достоверность различий между группами определяли с помощью точного критерия Фишера с поправкой Йетса и непараметрического критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p<0,05$. Для количественной оценки экспрессии белка zNMDAR1 использовался метод количественной масс-спектрометрии. В частности, в группе больных шизофренией наблюдается трёхкратное увеличение концентрации белка в сыворотке крови (0, 0635 фмоль/мг) по сравнению с концентрацией данного белка у здоровых лиц (0,0175 фмоль/мг) ($p=0,005$). Увеличение в сыворотке крови больных шизофренией белков глутаматных рецепторов, говорит о серьёзных нарушениях в системе глутаматергической нейротрансмиссии у этой категории больных. Существует большое количество работ, свидетельствующих об уменьшении плотности глутаматергических рецепторов у больных шизофренией . Масс-спектрометрический анализ проводился на базе ЦКП «Протеом Человека» Института биомедицинской химии (ИБМХ) в Москве, который поддерживается Министерством образования и науки Российской Федерации (RFMEFI62117X0017). *Работа поддержана грантом РНФ № 18-15-00053 «Поиск периферических маркёров, ассоциированных с нарушением миелинизации головного мозга и патогенезом заболевания при шизофрении» 2018-2020 гг.*

ОСОБЕННОСТИ РАЗНООБРАЗИЯ ПЕРВИЧНЫХ СТРУКТУР БЕЛКА

А.А. Замятнин, Т.А. Белозерская, А.С. Борчиков, М.Г. Владимиров
Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Проведен анализ распределения частоты встречаемости белков на шкале числа аминокислотных остатков N. Объектом исследования служил массив информации, содержащий данные о 560118 аминокислотных последовательностях, экстрагированных из базы данных UniProt-SwissProt 11 мая 2019 г. [1]. С помощью стандартных и специально созданных компьютерных программ из этого массива были удалены неполные белковые структуры, а также дубликаты. Из оставшихся 463450 первичных структур для анализа выделены аминокислотные последовательности эвкариот, бактерий, архей, а также вирусов. Построенные на шкале N распределения белков характеризуются разной шириной: у эвкариот от 2 до 35213 аминокислотных остатков, бактерий – от 7 до 10746, архей – от 25 до 9159, вирусов – от 11 до 7182. Отдельные распределения получены и для белков конкретных биологических видов (*Homo sapiens, Mus musculus, Arabidopsis thaliana, Oryza sativa, Saccharomyces cerevisiae, Neurospora crassa, Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*). Формы профилей всех полученных кривых оказались близки к ассиметричным распределениям типа Menzerath–Altmann [2, 3], но не обладают ярко выраженным максимумом. В то же время у них наблюдаются острые высокие пики, свидетельствующие о наличии большого количества белков с одинаковым числом аминокислотных остатков. Примером такого рода является пик при N=379 в распределении белков эвкариот. Этот пик сохраняется и при анализе белков только животного происхождения. Он свидетельствует о том, что данное число аминокислотных остатков имеют 1156 белков с разной аминокислотной последовательностью, причем 1048 из них являются цитохромом b. В то же время близлежащие на графике белковые структуры (содержащие как меньше, так и больше 379 остатков) характеризуются всего примерно 300 представителями. Подобные пики были найдены в распределениях белков и других эволюционных доменов. Очевидно, что разнообразие функциональных свойств белков основано на разнообразии первичных структур их молекул. Нами же продемонстрировано, что существуют множества разных первичных структур белков одинаковой длины, обладающих одинаковыми функциями.

1. http://www.uniprot.org/.
2. Menzerath P. Architektonik des deutschen Wortschatzes, Bonn, 1954. 131pp.
3. Altmann G. Prolegomena to Menzerath's law. Glottometrika 1980, 2,

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ MYOC, WDR36, OPTN, LTBP2 И TEK У ПАЦИЕНТОВ С ВРОЖДЕННОЙ ГЛАУКОМОЙ

Д.Е. Иванощук[1,2,3], О.В. Фенькова[4], С.В. Михайлова[1], П.С. Белокопытова[1], В.С. Фишман[1], Е.В. Шахтшнейдер[1,2,3], Ф.Ж. Фурсова4, М.И. Воевода[1,2,3]
[1]ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН; [2]НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН; [3] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет; 4Государственная Новосибирская областная клиническая больница, Новосибирск, Россия

Первичная врожденная глаукома (ПВГ) является наиболее распространенной причиной слепоты среди детей. ПВГ встречается спорадически, но известны и семейные случаи. Заболевание чаще всего наследуется по аутосомно-рецессивному типу (Allingham, 2005; Sarfarazi, 2000). Возможны два варианта: одинаковые патологические аллели наследуются от обоих родителей - гомозиготная форма, либо возникает компаунд гетерозигота. Специфические мутации гена CYP1B1 ассоциированы с аутосомно-рецессивной формой ПВГ, помимо этого определен ряд генов - MYOC, WDR36, OPTN, LTBP2 и TEK, которые ассоциированы с развитием различных фенотипов глаукомы. Целью данного исследования является поиск функционально значимых замен в генах MYOC, WDR36, OPTN, LTBP2 и TEK у CYP1B1-негативных пациентов методом экзомного секвенирования. Методом экзомного секвенирования у 7 CYP1B1-негативных неродственных пациентов (без отягощенного семейного анамнеза) с прогрессирующей ПВГ были проанализированы кодирующие участки генома и прилегающие сайты сплайсинга. Полноэкзомный анализ был выполнен на платформе Illumina NextSeq550 (Illumina,USA) с последующим проведением биоинформационного анализа. Варианты с частотой более 1% были исключены из анализа, также учитывались данные тестирования in silico (PolyPhen-2 и SIFT). Поиск функционально-значимых замен проводился в выбранных для анализа генах. У одного из семи пациентов с ПВГ идентифицирована ранее описанная редкая замена c.1295C>T (Pro432Leu) в гене LTBP2 в гетерозиготном варианте. Подавляющее большинство замен в анализируемых генах являлись высокораспространенными и были ранее описаны. Новых замен обнаружено не было. Проведенный нами анализ не выявил новых патогенных вариантов в

исследованных генах у пациентов с ПВГ. Замена c.1295C>T (Pro432Leu) гена LTBP2 была обнаружена в гетерозиготном варианте у пациентки. Носительство обнаруженного варианта обуславливает фенотипическую вариабельность (первичная открытоугольная и псевдоэксфолиативная глаукомы) и наследуется с неполной пенетрантностью (Jelodari-Mamaghani, 2013). Целесообразен дальнейший анализ генов, участвующих в развитии внутриглазных структур. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-315-00297 и ГЗ №0259-2019-0009.*

РОЛЬ МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ В РАЗВИТИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

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

Новые концепции инфекционных заболеваний развиваются с осознанием того, что патогены являются ключевыми игроками в развитии прогрессирующих хронических заболеваний, которые изначально не считались контагиозными. На данный момент известно, что многочисленные неврологические заболевания ассоциированы с инфекцией, патологические эффекты которой уже давно были хорошо задокументированы. Основываясь на том, что микоплазменная инфекция является широко распространенной урогенитальной инфекцией человека, способной передаваться от матери к плоду, длительное время персистируя в организме не приводя к гибели хозяина, нами было выдвинуто предположение о возможности развития нейродегенеративных изменений в результате хронической внутриклеточной инфекции на примере бактерий рода Mycoplasma. В данном исследовании для анализа изменений, которые претерпевает клетка-хозяин при внутриклеточной инфекции, была отработана модель взаимодействия патогена птиц *Mycoplasma gallisepticum* с клетками куриных эритробластов HD3. Был проведен полномасштабный протеомный ВЭЖХ-МС анализ с помощью MRM (Multiple Reaction Monitoring) подхода эукариотических клеток на разных стадиях инфекции (0–24 часа совместной культивации) для выявления маркеров нейродегенеративных изменений. Кроме того, был проведен анализ изменений, которые претерпевает микоплазма при взаимодействии с клеткой-хозяином, для выявления основных звеньев патогенеза развития микоплазменной инфекции. Было обнаружено изменение в представленности двух глобальных бактериальных регуляторов (YebC/PmpR и SpxA), которые принимают участие во внутриклеточной инфекции. Для более детального понимания вклада каждого из этих белков были сконструированы штаммы *M. gallisepticum* с разным уровнем сверхэкспрессии данных регуляторов для оценки значимости данных белков в развитии изменений в клетке-хозяине, ассоциированных с нейродегенеративными изменениями. В будущем это исследование поможет пролить свет на роль внутриклеточной бактериальной инфекции в развитии нейродегенеративных заболеваний. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-15-00427.*

МИКРОВЕЗИКУЛЫ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ – ВОЗМОЖНЫЕ УЧАСТНИКИ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ

А.В. Кореневский[1], О.А. Балабас[2], Е.П. Александрова[1], М.Э. Березкина[1], Ю.П. Милютина[1], Д.И. Соколов[1], С.А. Сельков[1]
[1]НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Ресурсный центр «Методы анализа состава вещества», Санкт-Петербург, Россия

Микровезикулы (МВ) – экстракле точные везикулы, несущие в себе мембранные и цитоплазматические белки клетки-донора. МВ иммунокомпетентных клеток играют важную роль в межклеточной коммуникации и формировании иммунного ответа, которая может быть обусловлена наличием в МВ специфических белков. Цель исследования – сравнить белковые профили естественных киллеров линии NK-92 и их МВ и установить возможное наличие в МВ белков, отвечающих за развитие иммунного ответа. Интактные клетки отделяли от МВ дифференциальным центрифугированием. Осадки гомогенизировали в воде, отделяли мембраны от цитоплазматических белков и выделяли мембранные белки в детергенте. Белки подвергали 1D-электрофорезу. Разделенные белки переносили на PVDF-мембрану, после чего обрабатывали первыми (к гранзиму B) и вторыми (Anti-Mouse) антителами с пероксидазой. Комплексы визуализировали в растворе люминола и пероксида водорода. В другом случае белковые фракции в геле подвергали трипсинолизу и экстрагировали пептиды, которые анализировали на масс-спектрометре Axima-Resonance MALDI QIT TOF. Были получены данные о количестве фракций белков различных молекулярных масс и относительном количестве белка в этих группах в пробах мембранных и цитоплазматических белков клеток и их МВ. Количество фракций белков (>3%) в клетках было выше (11-12), чем в МВ (5-8), при этом ни одна из этих фракций МВ не совпадала по массе с таковыми клеток-доноров. В мембранах клеток выделялось несколько групп белков (>3%), не представленных в цитоплазме (70-190 кДа). В МВ белки с массой >100 кДа в мембранной фракции составляют 44%. По данным иммуноблоттинга, цитотоксический белок гранзим B ассоциирован с мембранной фракцией как в клетках, так и в МВ. В МВ были также обнаружены хемокины, иммунные рецепторы, семафорин, белки MAP-киназных, тирозин-киназных сигнальных путей, малые ГТФ-азы и их регуляторы, белки теплового шока и гистоны. Распределение мембранных и цитоплазматических белков МВ отличается от такового в клетках. МВ естественных киллеров несут в себе регуляторы иммунного ответа, воспаления и сигнальные белки (часть из которых ассоциирована с мембранами), которые могут обеспечивать альтернативную коммуникацию естественных киллеров с клетками-мишенями. *Работа поддержана грантом РФФИ 19-015-00218.*

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9 ДЛЯ ЖИЗНЕННО ВАЖНЫХ ГЕНОВ НА ПРИМЕРЕ trf2

И.С. Осадчий, О.Г. Максименко, П.Г. Георгиев
Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Изучение структурно-функциональных свойств транскрипционных факторов в системе in vivo подразумевает создание платформы для удобной и специфичной замены кодирующей части соответствующего гена на его мутированные производные; при этом экспрессия осуществляется под собственным промотором гена и в нативном геномном окружении. В нашей лаборатории широко используется платформа, принцип которой основан на замене с помощью метода CRISPR/Cas9 и репарации путём гомологичной рекомбинации кодирующей части гена на удаляемый впоследствии репортерный ген и последовательность attP для сайт-специфической интеграции тестируемой конструкции. Как и многие исследователи, использующие метод CRISPR/Cas9 для редактирования генома животных, мы столкнулись с проблемами низкой эффективности и отсутствия трансформантов, которые обычно объясняются несовершенством этого метода. Однако, разная эффективность при CRISPR/Cas9-опосредованном редактировании генома может объяснятся разной степенью летальности делеции того или иного гена. При делеции и замене на attP сайт гена trf2 D. Melanogaster, кодирующего паралог базального фактора транскрипции TBP, нам удалось разработать и апробировать подход, позволяющий избежать летальности делеции, которая, по-видимому, и приводит к гибели трансформантов и низкой наблюдаемой эффективности метода CRISPR/Cas9. *Работа поддержана грантом РФФИ 18-29-07081-мк.*

ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА: ОСОБЕННОСТИ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ И БЕЛКОВОГО СОСТАВА

Л.В. Пурвиньш[1,2], С.Е. Седых[1,2], Г.А. Невинский[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Одним из важных путей передачи сигнала между разными клетками является везикулярный транспорт. Среди везикул, выделяемых клетками, особое внимание уделяется экзосомам – нановезикулам с диаметром 40-100 нм. Благодаря активному исследованию экзосом стала понятна их роль во многих физиологических и патологических процессах в организме, показано наличие в их составе белков, пептидов, нуклеиновых кислот.

Молоко является богатым источником экзосом, однако выделение стандартными методами молочных экзосом затруднительно в связи с большим количеством примесных белков. Нами был разработан модифицированный протокол выделения экзосом из сложных биологических жидкостей, таких как молоко. Данный метод включает дополнительные стадии по очистке экзосом, полученных ультрацентрифугированием, такие как гель-фильтрация и аффинная хроматография. Полученные препараты анализировались электронной микроскопией, где с помощью иммунноцитохимического анализа было показано наличие на поверхности экзосом тетраспанинов CD9, CD63, CD81. Кроме того, методом проточной цитометрии с мечением антителами против тетраспанинов, также было подтверждено наличие экзосом в препаратах.

Анализ белкового состава экзосом, а также совыделяющихся белков проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и двумерного электрофореза с предварительной изоэлектрофокусировкой белков. Сравнение препаратов экзосом после ультрацентрифугирования без очистки и с дополнительной очисткой гель-фильтрацией показало сильное сокращение количества белков во втором случае. Данные результаты свидетельствуют о наличие множества примесных белков в неочищенных препаратах экзосом молока. Все белки были гидролизованы и были определены с помощью MALDI – масс-спектрометрии.

Исследования белков и пептидов экзосом молока важно для понимания их роли в физиологии молочных желез и организма в целом, а также их влияния на развитие пищеварительной и иммунной систем новорожденных. Кроме того, молочные внеклеточные везикулы – это новая область исследований, фокусирующаяся на возможности их использования в медицине в качестве диагностических и терапевтических инструментов. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-10055).*

АНАЛИЗ ГЕНОВ *E. COLI,* АССОЦИИРОВАННЫХ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА, В МИКРОБИОТЕ КИШЕЧНИКА

Д.В. Ракитина, Ю.П. Байкова, Т.А. Семашко, О.В. Побегуц
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Болезнь Крона (БК) – хроническое генерализованное воспаление желудочно-кишечного тракта, представляющее собой одну из редких форм воспалительных заболеваний кишечника. Считается, что развитию БК способствуют как генетические, так и экологические факторы. Одним из факторов, сопровождающих это заболевание, является в 10-100 раз повышенное присутствие *Escherichia coli* в микробиоте кишечника части больных по сравнению со здоровыми людьми. Ранее нами было проведено исследование геномов изолятов *E. coli,* выделенных у пациентов с БК, и найдены гены, специфичные для БК-ассоциированных *E. coli.* В настоящей работе для нескольких БК-ассоциированных генов *E. coli* было протестировано их содержание в образцах тотальной микробиоты содержимого кишечника (кала) методом ПЦР в реальном времени. Тестируемыми генами являлись гены из оперона утилизации 1,2-пропандиола pduC, ccmk2_1, ccmL и pduU. Образцы были получены от больных БК, неспецифическим язвенным колитом (НЯК), невоспалительными заболеваниями кишечника и здоровых добровольцев. Всего в исследование было включено 150 образцов, из которых 54 относились к группе БК. Было показано, что количественная представленность исследуемых генов в микробиоте демонстрирует достоверные отличия больных БК от здоровых изолятов и изолятов больных циррозом, колоректальным раком и другими заболеваниями кишечника. Отличия между группами БК и НЯК не столь велики, однако, достоверны. В то же время гены, универсальные для E. coli (uid405A) или для всей

микробиоты (16S), не демонстрируют отличий между анализируемыми когортами пациентов. Кластерный PCA анализ присутствия всех четырех исследуемых генов показал кластеризацию образцов от здоровых, больных циррозом и колоректальным раком. Кластер значений от больных БК отличен, в то время как кластер значений для НЯК до некоторой степени пересекается как со «здоровой» группой, так и с группой БК. Таким образом, полученные нами данные демонстрируют при болезни Крона достоверную, более частую, встречаемость генов, позволяющих бактериям выживать в воспалённом кишечнике. *Работа поддержана грантом РНФ 16-15-00258 «E. coli как мишень терапии при болезни Крона».*

АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОГО И АЦИЛКАРНИТИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

А.А. Черноносов[1], М.Ф. Касакин[1], И.А. Меднова[2], Е.Г. Корнетова[2], С.А. Иванова[2], В.В. Коваль[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск [2]НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, Томск, Россия

В работе проведен анализ аминокислотного и ацилкарнитинового профиля у больных шизофренией методом LC-MS/MS в сухих пятнах плазмы крови с использованием изотоп-меченных стандартов для количественного определения аминокислот и ацилкарнитинов. Исследование проводилось в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации, разработанными для экспериментов с участием человека. Всего было проанализировано 124 образца сухих пятен плазмы крови. Из них 72 образца были получены от больных шизофренией (F20 согласно МКБ-10) поступивших в клинику НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Группу контроля составили 93 психически и соматически условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту. Обработка и анализ и визуализация данных проводились на скриптовом языке программирования R с использованием пакетов “dplyr”,“caret”, “factoextra” и других. Полученные данные анализировались с использованием различных подходов. Для поиска различий между двумя группами при попарном сравнении метаболитов был использован тест Манна-Уитни. Было установлено, что концентрации метаболитов между двумя группами значительно отличаются для аминокислот: Val, Asp, Cit, Gly, Arg, Glu и Orn, ацилкарнитинов длинных цепей жирных кислот, а также некоторых ацилкарнитинов коротких цепей жирных кислот. По данным кластерного анализа была выделена группа метаболитов среди ацилкарнитинов длинных цепей жирных кислот: C18, C18OH, C18:1OH, C18:2OH, C16OH, C16:1OH, C14OH, концентрации которых были снижены в группе пациентов по сравнению с контрольной группой. В то же время C4DC-показал обратную зависимость – в группе больных шизофренией его оказалось больше. Полученные данные косвенно указывают на нарушения обмена жирных кислот и липидов в том числе в нервной ткани, так как ацилкарнитины служат переносчиками остатков жирных кислот в митохондрии. Все аминокислоты, у которых были выявлены значительные различия между группами, имеют пониженные значениями у больных шизофренией. Полученные результаты позволяют в качестве потенциальных биомаркеров рассматривать ацилкарнитины - промежуточные продукты окисления жирных и органических кислот. *Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 18-15-00011(за исключением LC-MS/MS анализа) и проекта федерального бюджета № 0309-2019-0007 (LC-MS/MS анализ).*

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ДЛИННЫХ ИЗОФОРМ PHF10/BAF45a - СУБЪЕДИНИЦЫ РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ХРОМАТИН КОМПЛЕКСА PBAF МЛЕКОПИТАЮЩИХ ИГРАЕТ ВАЖНУЮ РОЛЬ В АКТИВАЦИИ ГЕНОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ

А.В. Феоктистов, А.А.Шейнов, С.Г. Георгиева, Н.В. Сошникова
Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Субъединица PHF10 хроматин-ремоделирующего комплекса PBAF играет важную роль в регуляции генов млекопитающих. PHF10 является одной из основных единиц модуля PBAF, который отвечает за его специфическое взаимодействие с таргетными генами. PHF10 интенсивно фосфорилирован в клетках млекопитающих, что указывает на важную роль данной модификации в его регуляции. В клетках и тканях человека и мыши PHF10 представлен четырьмя изоформами, которые отличаются между собой доменной структурой N- и C-концов и паттернами фосфорилирования. В данной работе мы изучали длинные изоформы PHF10-Pl и -Sl, имеющие дополнительные 46 аминокислот на N-конце. Наличие этих аминокислот обусловливает множественное фосфорилирование N-концевой части PHF10 и строго ядерную локализацию длинных изоформ. Длинные изоформы PHF10 наиболее интенсивно экспрессируются в клетках, имеющих повышенную пролиферативную активность, и участвуют в активации генов клеточного цикла, таким образом, способствуя клеточному делению. Мы определили, что факторы роста клеток, такие как FGF и EGF способствуют N-концевому фосфорилированию длинных изоформ PHF10. Фосфорилирование N-конца PHF10 происходит по многим серинам и треонинам, но ключевым является серин 50. Замена этого серина на аланин приводила к элиминированию всего N-концевого фосфорилирования. Также мы установили, что ключевой 50 серин входит в консенсус, узнающийся Akt киназой. Akt киназа активируется с помощью различных сигнальных путей, приводящих к преодолению G1(G0)/S чек-пойнта и дальнешему делению клетки. То есть фосфорилирование N-конца длинных изоформ PHF10 важно для активации генов пролиферации. Отрицательно заряженные аминокислоты аспартат и глутамат, в районе N-конца способствуют более интенсивному фосфорилированию длинных изоформ PHF10. Отрицательно заряженные аминокислоты аспартат и глутамат являются фосфомиметиками, что дает основание полагать, что фосфорилрование N-конца происходит каскадным образом. *Данная работа поддержана грантом РФФИ: № 1804-00885.*

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ АДГЕЗИОННО-ИНВАЗИВНЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

О.Н. Букато, О.В. Побегуц, Д.В. Евсютина, Д.В. Ракитина, Ю.П. Байкова, В.Г. Ладыгина, Г. Ю. Фисунов
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Болезнь Крона (БК) — это хроническое заболевание, которое характеризуется воспалением желудочно-кишечного тракта. Эндоскопическая картина болезни Крона включает утолщенную подслизистую оболочку, трансмуральное воспаление, образование язв и трещин. Этиология БК еще не полностью выяснена. В последние десятилетия было показано, что *E. coli*, особенно адгезивно-инвазивные штаммы (AIEC) ассоциированы с ВЗК и болезнью Крона. По сравнению с комменсальными штаммами *E. coli*, AIEC обладают большим адгезивно-инвазивным потенциалом, поэтому в данной работе мы решили изучить мембранную фракцию штаммов, выделенных у пациентов с болезнью Крона. *In vitro* анализ бактериальной адгезии и инвазии проводился с использованием эпителиальных клеток аденокарциномы человека Caco-2. Мы провели протеомный анализ мембранной фракции трех штаммов AIEC, выделенных у пациентов с болезнью Крона. Было проанализировано три типа клеток: до адгезии и адгезии-инвазии (контроль), после адгезии-инвазии и после инвазии методом ВЭЖХ-МС с последующим безметковым количественным анализом. Таким образом были получены профили, характеризующие изменения в белковом составе после адгезии и инвазии. Все БК-ассоциированные штаммы ярко демонстрировали адгезионно-инвазивные свойства на клеточной линии Caco-2. Так же мы подтвердили, что БК-ассоциированные штаммы *E. coli* из нашей коллекции имеют адгезивно-инвазивный фенотип. *Работа поддержана грантом РНФ 16-15-00258*

ИНВЕНТАРИЗАЦИЯ ПРОТЕОМА ЧЕЛОВЕКА: ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КАК ИСТОЧНИК ВЫЯВЛЕНИЯ ОНКОМАРКЕРОВ

Е.С. Зорина[1], О.А. Клейст[2], Н.В. Белякова[2], О.К. Легина[2], Н.Л. Ронжина[2], С.Н. Нарыжный[1,2]
[1]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; [2]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

После завершения проекта «Геном человека» перед исследователями была поставлена задача в получении подробной информации о протеоме человека. С этой целью был запущен проект «Протеом человека», в котором Россия отвечает за исследование продуктов генов 18 хромосомы. В рамках этой программы нами была проведена масштабная работа по инвентаризации белков/генов не только 18 хромосомы, но и остальных хромосом человека. Так как уровень белкового многообразия (протеолиз, процессинг, посттрансляционные модификации, макромолекулярные взаимодействия, образование комплексов и т.д.) в случае онкологии возрастает многократно, то гетерогенность раковых образцов является одной из критических точек омиксных технологий. Таким образом, детальный анализ белковых профилей образцов позволит лучше понять механизмы канцерогенеза и найти пути противораковой терапии. Для достижения данной цели были применены два разработанных нами метода для поиска и идентификации протеоформ – секционный и полу-виртуальный двумерный гель электрофорез в сочетании с ESI LC-MS/MS. В работе были использованы нормальные и раковые клеточные линии, а также печень и плазма крови человека. Получены профили продуктов более 4000 генов и проведен их сравнительный анализ.

Благодарности: Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013 – 2020 годы. Электрофоретические и масс-спектрометрические работы выполнены с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» в ИБМХ.

ДЕЙСТВИЕ УАБАИНА И МАРИНОБУФАГЕНИНА НА ПРОТЕОМ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Е.А. Климанова, Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко, О.Д. Лопина, С.Н. Орлов
МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

Эндогенные кардиотонические стероиды (КТС), в частности уабаин и маринобуфагенин, являются новым классом стероидных гормонов, синтезирующихся в коре надпочечников и гипофизе. Действие этих соединений на клетки опосредовано их связыванием со специальным рецептором – Na,K-АТРазой (NKA). Согласно принятым на данный момент концепциям, основная функция эндогенных КТС – регуляция артериального давления и водно-солевого баланса в организме, поэтому первыми «мишенями», подверженными их действию, являются сердечно-сосудистая система и почки. В свою очередь эндотелий, выстилающий полость сосудов, играет существенную роль в поддержании локального гомеостаза тканей и органов. Так, показано, что уабаин в концентрациях, не приводящих к ингибированию фермента (1-10 нМ), усиливает продукцию вазоконстриктора эндотелина-1 в клетках эндотелия пупочной артерии человека. В то же время добавление таких же концентраций уабаина приводит к активации протеинкиназы B, фосфорилированию эндотелиальной синтазы NO и усилению продукции вазодилататора NO. Помимо влияния на два основных регулятора тонуса сосудов, обнаружены эффекты уабаина на эндотелий-зависимую гиперполяризацию – физиологическое явление, вызывающее вазодилатацию независимо от действия эндотелина и NO. КТС являются специфическими ингибиторами NKA. Механизм их действия на клетки обусловлен не только изменением внутриклеточного соотношения ионов Na^+ и K^+, но и активацией различных внутриклеточных сигнальных каскадов, опосредованных изменением конформации NKA при связывании с различными КТС. В данной работе мы показали, что при действии 0,1-1 нМ уабаина и 30–100 нМ маринобуфагенина происходит активация NKA в клетках эндотелия пупочной вены человека, более высокие концентрации этих КТС оказывают ингибирующий эффект. Анализ протеомных данных показал, что активирующие NKA концентрации уабаина (0,3 нМ) и маринобуфагенина (30 нМ) увеличивают представленность белков, участвующих в процессах клеточной пролиферации и дифференцировки; действие ингибирующих NKA концентраций уабаина (100 нМ) и маринобуфагенина (300 нМ) приводит к увеличению представленности белков, формирующих клеточный ответ на окислительный стресс. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-34-00344.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТЕОМНЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА И ХИМИОТЕРАПИИ НА ММСК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ДИФФУЗНОЙ В КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЕ

И.К. Мальянц[1,4], В.О. Шендер[1,3], П.В. Шнайдер[1], Г.П. Арапиди[1,3], Н.А. Петинати[2], Н.В. Сац[2], Е.А. Фастова[2], А.У. Магомедова[2], С.К. Кравченко[2], В.Г. Савченко[2], М.А. Лагарькова[1], Н.И. Дризе[2]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]НМИЦ гематологии; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; [4]Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) является наиболее распространенным типом лимфом, быстро прогрессирует и характеризуется высокой летальностью. У большинства пациентов костный мозг (КМ) остается не поврежден опухолевыми клетками, но известно, что и в таком случае функция кроветворения видоизменена у пациентов, находящихся в ремиссии. Удобным объектом для выявления различий являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), которые формируют нишу для гемопоэтических стволовых клеток и секретируют различные регуляторные белки. Предполагалось, что основной вклад в повреждение кроветворного микроокружения вносит химиотерапия (ХТ), но до сих пор не было изучено влияние клеток лимфомы на стромальное микроокружение КМ. Чтобы исследовать данный аспект, нами был проведен протеомный анализ секретомов ММСК, полученных от одних и тех пациентов с ДВКЛ до и после курсов ХТ (n=6), а также здоровых доноров (n=5). В результате сравнительного анализа секретомов было идентифицировано 599 повышенных и 122 пониженных в представленности белков в секретомах культивированных ММСК первичных пациентов с ДВКЛ по сравнению со здоровыми донорами. Функциональная аннотация белков с повышенной представленностью выявила, что ММСК первичных пациентов секретируют белки, отвечающие, в основном, за активацию процессов, связанных с везикулярным транспортом (экзоцитоз), иммунным ответом, а также с регуляцией М-фазы клеточного цикла и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток. Важно отметить, что профили секреции ММСК пациентов до и после лечения также отличались, однако изменений выявлено значительно меньше по сравнению с ММСК здоровых доноров. В секретомах ММСК после ХТ наблюдалась повышенная представленность белков, связанных с процессами регенерации и ответа на повреждение и стресс. В связи с этим, мы предполагаем, что больший вклад в изменение профилей секреции ММСК вносят раковые клетки, а не воздействие ХТ. Мы впервые показали, что профили секреции ММСК от пациентов с ДВКЛ и от здоровых доноров значительно отличаются. На основании этого можно предположить, что несмотря на отсутствие прямого контакта между стромальным микроокружением КМ и раковыми клетками, в процессе гемопоэза происходят существенные изменения. *Работа поддержана грантом РФФИ 17-00-00172.*

ПРОТЕОМНЫЙ ОТВЕТ ШТАММОВ БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI* НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ IgA

В.А. Мусарова, Д.С. Матюшкина, И.О. Бутенко, В.М. Говорун
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Одним из представителей микробиоты кишечника эукариот является условно-патогенная бактерия *Escherichia coli*, встречающаяся в относительно небольших количествах, по сравнению с другими симбиотическими бактериями. Однако именно штаммы *E. coli* могут стать причиной хронических воспалительных заболеваний кишечника, такие как язвенный колит и болезнь Крона. Секреторные антитела класса IgA (sIgA) представляют собой первую линию взаимодействия иммунной системы и бактериальных клеток в просвете кишечника. Известно, что около 75% микробиома кишечника покрыты секреторными IgA, которые могут распознавать рецептор-связывающие домены патогена, избирательно блокировать определенные факторы вирулентности, препятствовать колонизации патогенов в просвете кишечника и выполнять другие функции. Целью данной работы являлось изучение ответа некоторых штаммов *E. coli* на воздействие на них IgA антител. В качестве объектов исследования были выбраны пробиотическая бактерия *E. coli* Nissle 1917, клинический штамм K4, и *E. coli*, выделенная из микробиоты человека, страдающего болезнью Крона. Для исследования физиологического ответа бактерий на первый иммунный барьер макроорганизма все штаммы были обработаны серией поликлональных IgA антител в различных концентрациях. Специфичность связывания антител с антигеном определялась с помощью иммуноферментного анализа и конфокальной лазерной сканирующей микроскопией. По результатам проведенного протеомного анализа клеток трех штаммов *E. coli* при обработке их IgA антителами с помощью ВЭЖХ-МС был определен ряд белков, представленность которых менялась. При более детальном анализе полученных результатов были выявлены ключевые этапы и предложены возможные механизмы взаимодействия *E. coli* с первой линией иммунной системы хозяина. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-00-00293.*

БЕЛКОВЫЙ ИНТЕРАКТОМ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ СИНТЕЗА ТРОМБОКСАНОВ И ПРОСТАЦИКЛИНОВ

А.В. Свирид[1], П.В. Ершов[2], А.А. Гилеп[1], А.С. Иванов[2]
[1]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь [2]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Функциональная активность тромбоксан- и простациклинсинтазы (TXAS, PGIS) важна для регуляции агрегации тромбоцитов и сосудистого тонуса, поскольку простациклин является вазодилататором и ингибитором агрегации тромбоцитов. Дисбаланс между простациклином и его физиологическим антагонистом тромбоксаном А2 способствует развитию инфаркта миокарда, инсульта и атеросклероза. Поиск белковых партнеров этих ферментов и выявление их функциональных связей является актуальной задачей – модуляторы активности ферментов, равно как и транспортеров метастабильных продуктов биосинтеза представляет интерес для лекарственной терапии целого ряда заболеваний. В решении задач исследования применялись различные методы прямой и обратной интерактомики в сочетании с методами shotgun-протеомики. В основу подхода прямой интерактомики легла разработка аффинных сорбентов, несущих биотинилированные исследуемые белки (TXAS_avi,

PGIS_avi). Использование сайт-специфичного биотинилирования и добавление подвижной линкерной последовательности позволило произвести направленную иммобилизацию с сохранением нативной конформации белков. В растворимой фракции лизатов тканей млекопитающих был определен ряд белков (в том числе, участвующих в регуляции процессов пролиферации и трансдукции внеклеточных сигналов), являющихся потенциальными белковыми партнерами TXAS и PGIS, и предположительно участвующих в белок-белковых взаимодействиях с данными ферментами внутри клетки. Для части впервые идентифицированных белок-белковых взаимодействий была проведена валидация образования белковых комплексов *in vitro*. Кроме того, методами обратной интерактомики установлен ряд олигопептидов, образующих высокоаффинные комплексы с исследуемыми белками (Kd > 10^{-7} M), сделано предположение о возможном функциональном значении этих взаимодействий. Полученные данные помогут пролить свет на тонкие механизмы регуляции системы биосинтеза важнейших метастабильных метаболитов, ответственных как за регуляцию созревания и активации тромбоцитов, так и сосудистого тонуса.

ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ПРОТЕОМОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ И БИПОЛЯРНЫМ АФФЕКТИВНЫМ РАССТРОЙСТВОМ

А.А. Серегин[1], Е.М. Дмитриева[1], А.А. Летова[2], А.В. Семке[1], С.А. Иванова[1], Л.П. Смирнова[1]
[1]НИИ психического здоровья Томского НИМЦ; [2] Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Томск, Россия

Целью нашего исследования было выявить достоверные различия в протеомах сыворотки крови больных шизофренией и биполярным аффективным расстройством (БАР). С этой целью обследованы 33 пациента больных шизофренией (F20.0) и 23 пациента с БАР (F31). Больные были госпитализированы в остром состоянии и кровь забиралась до начала терапии. Контрольную группу составили 24 психически и соматически здоровых добровольца. Сыворотка при помощи аффинной хроматографии очищалась от 6 мажорных белков (альбумин, иммуноглобулин G, иммуноглобулин A, антитрипсин, трансферрин и гаптоглобин) на хроматографе АКТА pure (GE Healthcare). После чего образцы разделяли вертикальным электрофорезом в 12% полиакриламидном геле по методу Леммли (Laemmli, U.K, 1970). После проведения трипсинолиза белков в геле и экстракции пептидов, белки идентифицировали при помощи ВЭЖХ/масс-спектрометрии на масс-спектрометре Q-exactive HF (Thermo Scientific) на базе ЦКП «Протеом человека» ИБМХ РАМН им. Ореховича г. Москва. Далее был применен полуколичественный анализ спектров при помощи программного обеспечения MaxQuant (Cox J. et. all, 2014). Сравнение протеомных профилей выявило 27 белков, специфичных для шизофрении, и 18 - для БАР. Специфичные для шизофрении белки в основном ассоциируются с иммунным ответом, регуляцией роста клеток, метаболизмом белка и регуляцией метаболизма нуклеиновых кислот. Набор белков характерных для БАР в основном связан с иммунным ответом, регуляцией мембранного транспорта, ростом и развитием нейронов и олигодендроцитов. Также у больных БАР выявлен белок – фактор транскрипции миелина 1 (MYT1). Во многих работах при шизофрении обнаружена патология олигодендроглии и миелина, выявлена локальная деструкция миелиновых оболочек, атрофия аксонов (Uranova N.A. et al., 2013). Мы предполагаем, что подобные нарушения могут наблюдаться и при БАР. Дальнейшее изучение выявленных нами белков, может помочь в раскрытии неясных моментов патогенеза шизофрении и БАР, а также разработке новых параклинических критериев дифференциальной диагностики. *Работа поддержана грантом РНФ № 18-15-00053 от 20.04.2018 г. «Поиск периферических маркёров, ассоциированных с нарушением миелинизации головного мозга и патогенезом заболевания при шизофрении».*

ПАТОГЕННЫЕ ПРОФИЛИ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI* ОТ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ НЕ ОТЛИЧАЮТСЯ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛНОГЕНОМНОГО СКРИНИНГА

М.Н. Синягина, М.И. Маркелова, А.В. Лайков, А.М. Харченко, Е.А. Булыгина, Т.В. Григорьева
Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Болезнь Крона (БК) – мультифакторное заболевание, характеризующееся неконтролируемым воспалением кишечника в ответ на разнообразные микробные и иммунологические факторы, а также на воздействие окружающей среды. По данным проведенного ранее полногеномного секвенирования микробиома кала от 40 пациентов с болезнью Крона и 42 здоровых добровольцев нами выявлено, что развитие заболевания ассоциировано с увеличением доли представителей *Escherichia coli* (p=0,0016). В настоящем исследовании проведено полногеномное секвенирование 27 штаммов *E. coli*, выделенных из кала от 14 пациентов с БК, и 37 штаммов из 18 здоровых добровольцев. Геномное профилирование штаммов не выявило статистически значимых отличий в частоте встречаемости 98 генов, ассоциированных согласно данным литературы со свойствами патогенности и вирулентности кишечной палочки, включая гены адгезии и инвазии. По результатам исследования чувствительности бактерий к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом различия в частоте встречаемости чувствительных штаммов *E. coli* к 23 антибиотикам между БК и контрольной группой отсутствуют. Однако среди штаммов в группе БК чаще встречается устойчивость к ципрофлоксацину (p=0,02), что может быть связано с его использованием при лечении болезни Крона. В группах БК и контролей нет достоверных различий в количестве антибиотиков, к которым обнаружена дифференциальная чувствительность штаммов. Таким образом, полногеномное профилирование 64 изолятов *E. coli*, полученных от здоровых доноров и пациентов с БК, не выявило ассоциаций между статусом заболевания и вирулентным и патогенным потенциалом бактерий, а также их чувствительностью к различным группам антибиотиков.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ АДАПТАЦИОННОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ХОЛОДНОВОДНЫХ МОРСКИХ ГУБОК

А.Д. Финошин[1], К.И. Адамейко[1], А.А. Георгиев[3], О.И. Кравчук[1], В.С. Михайлов[1], Ю.В. Люпина[1], Е.И. Шагимарданова[2]
[1]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва; [2]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; [3]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Холодноводные беломорские губки отличаются высокой адаптационной пластичностью, которая обеспечивается лабильностью их структуры и способностью клеток к реагрегации и восстановлению исходной организации животного после диссоциации тканей. Убиквитин-протеасомная (УПС) система и шапероны определяют адаптационную пластичность многоклеточных организмов. Различные стрессы активируют защитные реакции клетки, в частности, гидролиз поврежденных белков протеолитической системой протеасом. Активность протеасом, их состав и физико-химические свойства регулируются в соответствии с состоянием клеток и внеклеточными сигналами при участии шаперонов, что позволяет животным адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды. Чтобы исследовать факторы, определяющие адаптационную пластичность губок, нами были подготовлены парноконцевые mRNA-seq библиотеки для образцов *H. panicea* и *H. dujardini* после воздействия различных стрессовых факторов (диссоциация тканей, низкие температуры). Проведено сиквенирования на Illumina HiSeq 2500 platform и определены нуклеотидные последовательности mRNA УПС, различных групп шаперонов, белков, связанных с обменом железа. Исследованы особенности экспрессии белков, ассоциированных со стрессом при разных физиологических состояниях. Принимая во внимание то, что губки являются единственным ныне существующим организмом, близким к гипотетическому предку многоклеточных животных, полученные нами данные могут помочь пониманию механизмов адаптационной пластичности многоклеточных. *Благодарности. Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ (№19-34-50002).*

ВЛИЯНИЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ PHFf10 — СУБЪЕДИНИЦЫ РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ХРОМАТИН КОМПЛЕКСА PBAF НА СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ КОМПЛЕКСА В ПРОЦЕССЕ НЕЙРОГЕНЕЗА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А.А. Шейнов, А.М. Азиева, С.Г. Георгиева, Н.В. Сошникова
Институт биологии гена, Москва, Россия

Развитие мозга млекопитающих представляет собой сложный процесс — большое разнообразие типов нервных клеток, формирующихся в процессе нейрогенеза, определяется точным паттерном экспрессируемых генов. Экспрессия генов определяет клеточную судьбу и контролируется на уровне организации хроматина. Один из основных комплексов эукариот, изменяющих структуру хроматина, – комплекс PBAF, входящий в семейство SWI/SNF. Комплекс состоит из множества субъединиц, часть которых способна замещаться на альтернативные изоформы и гомологи, что приводит к большому комбинаторному разнообразию. SWI/SNF комплексы активно участвуют в нейрогенезе, изменяя экспрессию генов при нейрональной дифференцировке. Мутации в генах, кодирующих субъединицы, связаны с множеством нейродегенеративных заболеваний. Белок PHF10 — один из ключевых компонентов комплекса PBAF, определяющий поддержание пролиферативного статуса нейрональных предшественников. PHF10 экспрессируется в виде четырех изоформ отличающихся доменной структурой. В зависимости от доменной структуры изоформы могут быть по-разному фосфорилированы, что влияет на их свойства и функции. Исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали, что в процессе дифференцировки нейрональных предшественников происходит замена изоформ в комплексе PBAF — длинные изоформы заменяются на короткие. Короткие и длинные изоформы входят в состав различных комплексов PBAF. Эти комплексы помимо разных изоформ PHF10 отличаются другими субъединицами и биохимическими свойствами. Нами было показано, что комплексы, содержащие фосфорилированные формы PHF10, более плотно ассоциированы с хроматином. Данные результаты свидетельствуют о различиях в функциях и механизмах комплексов PBAF, содержащих разные изоформы, в регуляции транскрипции генов. *Данная работа поддержана грантом РНФ № 1814-00303.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТЕОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ВОЗМОЖНЫХ ПРИЧИН ВОЗНИКНОВЕНИЯ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКА

П.В. Шнайдер[1], К.С. Ануфриева[1,2], Г.П. Арапиди[1,2,3], И.К. Мальянц[1], А.В. Смоляков[1,2], О.С. Лебедева[1], М.А. Лагарькова[1], В.М. Говорун[1], В.О. Шендер[1,3]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]Московский физико-технический институт (Государственный университет); [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Основной проблемой химиотерапии (ХТ) при раке яичника является быстрое возникновение рецидива. Ранее было показано, что важный вклад в формирование химиорезистентности может вносить межклеточная коммуникация. Чтобы исследовать возможные причины этого явления, нами была использована клеточная линия SKOV3 (в качестве модели опухолевых клеток) и фибробласты (в качестве контроля). Нами были получены секретомы от опухолевых и нормальных клеток до и через 24 часа после добавления цисплатина, после чего было исследовано влияние этих секретомов на реципиентные клетки. Оказалось, что только секретомы, от обработанных цисплатином клеток SKOV3, но не фибробластов способствуют возникновению устойчивости к ХТ. Чтобы выяснить изменения в профилях секреции клеток до и после ХТ, был проведен протеомный анализ полученных секретомов при помощи масс-спектрометра Q-Exative HF. В целом, было идентифицировано более 2000 белков. Функциональная аннотация показала, что по сравнению с нормальными клетками, химиотерапия опухолевых клеток приводит к повышению секреции РНК-связывающих белков, среди которых большинство относится к регуляции сплайсинга. Более того, мы показали, что компоненты сплайсосомы могут экспортироваться в составе внеклеточных везикул. Для изучения молекулярного механизма этого феномена мы сравнили представленность белков в реципиентных клетках SKOV3, предвари-

тельно инкубированных с секретомами от обработанных или необработанных цисплатином реципиентных опухолевых клеток. Оказалось, что те же сплайсосомные белки были повышены в реципиентных клетках после инкубации с секретомами от погибающих клеток. Кроме того, нами было обнаружено большое число белков, отвечающих за процессинг РНК, регуляцию клеточного цикла и ответ на стресс. Возможно, межклеточная коммуникация посредством сплайсосомных белков может влиять на программу сплайсинга реципиентных клеток и приводить к химиорезистентности. *Данная работа была поддержана грантом РНФ №17-75-20205 (за LC-MS/MS анализ) и РФФИ №18-34-00622.*

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА АМИЛОИДОПОДОБНЫХ АГРЕГАТОВ В МОЧЕ ПРИ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ ОСЛОЖНЕНИЯХ БЕРЕМЕННОСТИ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

А.Э. Юсупов[1,4], В.А. Сергеева[1,3], Н.В. Захарова[1], А.Е. Бугрова[1,2], Н.Л. Стародубцева[1,2], М.И. Индейкина[1], А.С. Кононихин[2,5], В.Е. Франкевич[2], Е.Н. Николаев[3,5]
[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; [2]НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ; [3]Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН; [4]Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет); [5]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Ключевые слова: протеомика, амилоидоподобные агрегаты, Конго красный, преэклампсия, масс-спектрометрия высокого разрешения. Исследование нарушений в постранслляционном процессинге белков представляется перспективным диагностическим подходом для социально-значимых патологий, ассоциированных с накоплением аномальных форм белков. Недавно было показано, что амилоидоподобные агрегаты могут наблюдаться в моче беременных при гипертензивных осложнениях. Белковый состав агрегатов мочи до сих пор детально не исследовали. С помощью протеомного подхода на базе масс-спектрометрии высокого разрешения нами исследован белковый состав амилоидоподобных структур, агрегирующих в присутствии азоафинного красителя Конго красного в моче беременных при гипертензивных осложнениях. Азоафинный краситель Конго красный обладает высокой аффинностью к β-структурам амилоидных пептидов (так называемая, конгофилия) и имеет широкое применение в гистологии и в тестах на наличие амилоидных фибрилл. Масс-спектрометрический анализ триптических фрагментов белков пулированного образца мочи позволил установить, что состав наиболее представленных белков агрегатов, преципитируемых Конго красным, практически не отличается от состава наиболее представленных белков исходного образца, однако 22% пептидов идентифицируются только в агрегатах. Показано, что среди выявленных триптических пептидов ряд фрагментов α-1-антитрипсина, комплемента 3, гаптоглобина, церулоплазмина и трипстатина являются участками амилоидоподобных β-складок, которые могут быть наиболее вероятными мишенями для связывания Конго красного. *Работа поддержана грантом РФФИ 18-315-00435 мол-а. В работе использовано оборудование ЦКП ИБХФ РАН «Новые материалы и новые технологии».*

ГЛУБОКОЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МИКРОБИОМОВ.

С.С. Терехов, И.В. Смирнов, А.С. Назаров, А.Г. Габибов
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Анализ сложных микробных сообществ является важной вехой современной микробиологии, требующей применения методов «глубокого функционального профилирования». Несмотря на то, что высокопроизводительное секвенирование (NGS) произвело революцию в нашем понимании микробиомов, нам все еще не хватает высокопроизводительных технологий для точного определения их функциональности. Разработка ультравысокопроизводительных методов скрининга (uHTS) представляет особый интерес, поскольку позволяет напрямую детектировать биологическую активность даже незначительных компонентов бактериальных сообществ. Кроме того, методики uHTS позволяют исследовать динамику микробиома, что принципиально важно для одновременного исследования различных видов с сильно различающимися параметрами роста и чувствительности к внешним воздействиям окружающей среды. Мы показали, что культивирование единичных микроорганизмов, инкапсулированных внутри капель микрофлюидной двойной эмульсии вода-масло-вода, с последующим флуоресцентно-активированным клеточным сортингом (FACS) позволяет выделять штаммы с желаемой функциональной активностью. Этот подход был успешно применен для количественного определения ферментативной активности на уровне отдельных клеток. Скрининг микробиома ротовой полости Сибирского бурого медведя на наличие бактерий, подавляющих рост патогенных бактерий *S. aureus* позволил выделить высокоэффективного продуцента антибиотика с уникальным механизмом резистентности. Разработанная технология была использована для персонализированного определения спектра активности антибиотиков и изучения резистома. Применение методов глубокого функционального профилирования позволило нам одновременно оценить состав микробиоты и эффективность антибиотиков на уровне целых микробиомов. Данная технология может быть эффективно использована в области биотехнологии, микробиологии и синтетической биологии. *Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ 19-34-70021, СП-2911.2019.4 и РНФ 19-14-00331.*

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА
Устные доклады

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА ДИСКОВ И МЕЖДИСКОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Д.С. Сидоренко, Т.Ю. Зыкова, В.А. Хорошко, Г.В. Похолкова, С.А. Демаков, Е.С. Беляева, И.Ф. Жимулёв
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

На протяжении многих лет интерфазные хромосомы эукариот исследуют на модели политенных хромосом *Drosophila melanogaster*. Они имеют гигантский размер по сравнению с хромосомами диплоидных клеток и уникальный для каждого района рисунок поперечных полос (дисков), возникающий благодаря упорядоченному расположению хроматид. С использованием модели четырёх типов хроматина, выявляющей домены различной степени компактности хромосомного материала (Zhimulev et al., 2014), получена привязка геномной и цитологической карт некоторых районов политенных хромосом и показаны основные свойства генетической и молекулярной организации дисков и междисков. На молекулярной карте генома междиски соответствуют декомпактному хроматину aquamarine и 5' концам повсеместно активных генов. Серые диски содержат хроматин lazurite и malachite, промежуточный по степени компактизации, и, преимущественно, кодирующие части генов. Чёрные плотные транскрипционно неактивные диски обогащены ruby хроматином. Локализация нескольких десятков междисков на молекулярной карте генома позволила детально изучить их архитектуру по данным полногеномных проектов. Распределение белков и регуляторных элементов в промоторных областях генов, локализованных в междисках, показывает, что именно эти части междисков, вероятно, ответственны за образование открытого хроматина, который и визуализируется в политенных хромосомах как междиски. Таким образом, постоянная генетическая активность междисков и серых дисков и неактивность генов в черных дисках являются основой универсального рисунка дисков в хромосомах всех тканей Drosophila. Особый интерес представляет изучение самой маленькой в кариотипе *D. melanogaster* четвертой хромосомы с нетипичным белковым составом хроматина. Мы уточнили её цитологическую карту и определили геномные координаты всех дисков и междисков, используя модель четырёх типов хроматина и флуоресцентную *in situ* гибридизацию. Показано, что, несмотря на особенности этой хромосомы, её дисковая организация в целом соответствует остальной части генома. Приведённой выше общей схеме не соответствуют особо длинные гены дрозофилы, поскольку они могут занимать ряд чередующихся дисков и междисков, образованных частями этих генов (до девяти структур). *Работа поддержана грантами РНФ № 19-14-00051 и РФФИ № 17-00-00284.*

ЯДЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЛИЯЕТ НА ОНКОГЕНЕЗ В-КЛЕТОК

Diego Germini, Fatimata Bintou Sall, Vassily Khammad, Yegor Vassetzky
UMR8126, Université Paris Sud - Paris Saclay, CNRS, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France; LIA 1066, French-Russian Joint Cancer Research Laboratory, 94805 Villejuif, France, 119334 Moscow, Russia

Недавно мы обнаружили новый механизм, объясняющий, как В-клеточные лимфомы могут возникать во время ВИЧ-инфекции. ВИЧ-позитивные пациенты имеют повышенный риск развития специфических подтипов лимфомы, включая лимфому Буркитта. Недавно мы обнаружили, что вирусный трансактиватор транскрипции Tat, который выделяется инфицированными клетками в кровоток, может модифицировать ядро В-клеток, сближая потенциальных партнеров по транслокации, локусы MYC в хромосоме 8 и IGH в хромосоме 14, что увеличивает вероятность транслокации t(8;14), характерной для этой лимфомы. Tat индуцирует подвижность локуса MYC в ядре за счет индукции двухцепочечных разрывов ДНК вблизи гена MYC и их последующей репарации при помощи негомологичной рекомбинации. Для изучения механизма этого процесса мы создали и охарактеризовали лимфобластозную линию клеток RPMI8866, индуктивно экспрессирующих CRISPR/Cas9 и гРНК, нацеленных на область локусы MYC и IGH. При индукции CRISPR/Cas9 происходят разрывы в ДНК и генерируется транслокация t(8;14). Факторы, увеличивающие близость между локусами MYC и IGH, также увеличивают частоту t(8,14) и наоборот, препараты, подавляющие близость, также подавляют частоту транслокации. В нашей работе приводится первое экспериментальное доказательство того, что пространственная близость действительно повышает вероятность хромосомных транслокаций. Переведено с помощью www.DeepL.com/Translator

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*

С.В. Ульянов[1,2], О. Цой[3], А.А. Галицина[3], Е.Е. Храмеева[3], С.С. Стариков [4], М.С. Гельфанд[3], С.В. Разин[1,2]
[1]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Институт биологии гена РАН, Москва; [3]Сколковский институт науки и технологий, Сколково; [4]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Миксомицет *Dictyostelium discoideum* (диктиостелиум) – популярный модельный объект в исследованиях клеточного метаболизма, подвижности, фагоцитоза и взаимоотношений «хозяин-паразит». Сложный жизненный цикл этого организма, включающий одноклеточную и многоклеточную стадии, сделал его так же удобной моделью для исследования процессов клеточной дифференцировки и роли разнообразных транскрипционных факторов в этом процессе. Однако практически ничего не известно о том, как меняется эпигенетический статус и пространственная организация хроматина диктиостелиума в ходе превращения изначально однородной клеточной массы свободноживущих амёбоидных форм в сложноорганизованное плодовое тело, состоящее из нескольких типов узкоспециализированных клеток. Для решения этого вопроса в настоящей работе мы использовали высокопроизводительный метод фиксации конформации хромосомы (Hi-C) для картирования топологии генома, профилирование транскриптома методом РНК-сек для полногеномного определения экспрессии генов и технику ATAC-

seq для выявления участков открытого хроматина на нескольких временных точках дифференцировки клеток диктиостелиума. Мы обнаружили, что на всех исследованных стадиях геном организован в эрреи коротких (10–40 т.п.н.) петель, в основаниях которых расположены конвергентно ориентированные гены. Внутренние области петель содержат гены домашнего хозяйства и прочие высоко активные гены, в то время как основания петель являются участками низкой транскрипционной активности. Компартменты и топологически-ассоциированные домены не были обнаружены в геноме диктиостелиума, выявленные петли основным мотивом укладки его хроматина на масштабе целой хромосомы. Полученные данные позволяют предполагать наличие некоего архитектурного белка, функционально родственного CTCF млекопитающих, связывание которого детерминирует положение оснований петель. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ # 18-34-20104.*

3D-ГЕНОМИКА ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК ЧЕЛОВЕКА

В. Фишман[1,2], М. Гридина[2], П. Белокопытова[1,2], П. Сальников[1,2], Е. Можжейко[2], М. Нуриддинов[2], Д. Фишман[1], А. Кораблев[2], И. Серова[2], Л.П. Назаренко[3], И.Н. Лебедев[3]
[1]Новосибирский государственный университет, Новосибирск; [2]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; [3]НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

Познание принципов формирования трехмерной архитектуры ядра привело к прорыву в понимании механизмов, связывающих хромосомные перестройки в некодирующих областях генома с нарушением генной экспрессии и развитием патологий. С помощью современных биохимических методов была показана фрактальность геномной укладки, при которой частота 3D-контактов хроматина коррелирует с геномным расстоянием между локусами. Помимо геномного расстояния, на трехмерные контакты также влияет комплекс архитектурных белков, обеспечивающей формирование локальных хроматиновых доменов, в рамках которых преимущественно осуществляется взаимодействие регуляторных элементов. Хромосомные перестройки приводят к нарушению пространственной архитектуры ядра, в первую очередь за счет резкого изменения геномного расстояния и, следовательно, числа 3D-контактов между локусами. Основываясь на этом наблюдении, мы разработали метод Exo-C, совмещающий технологии захвата конформации хромосом и экзомного секвенирования для одновременной детекции структурных вариантов и точковых полиморфизмов в геноме человека. Компьютерные симуляции позволили оценить точность и чувствительность такого подхода и показали, что Exo-C наиболее эффективен для поиска сбалансированных транслокаций. Используя модельную линию клеток человека K562 мы показали, что метод Exo-C успешно идентифицирует ранее изученные хромосомные перестройки. Наконец, мы показали применимость метода Exo-C в клинической практике, проведя анализ группы пациентов с генетическими патологиями невыясненной этиологии. Мы использовали методы машинного обучения для предсказания 3D-архитектуры перестроенных геномов на основе интеграции данных о геномном расстоянии, сайтах связывания инсуляторного белка CTCF и генной экспрессии. Для валидации разработанного нами алгоритма мы создали линии трансгенных мышей с хромосомными перестройками в границах пространственных доменов хроматина. Анализ экспрессии генов трансгенных животных показал, что точечные модификации сайтов связывания белка CTCF не ведут к масштабным изменениям транскрипционного статуса близлежащих генов, в то время как удаление крупных районов, содержащих границу доменов, приводит к масштабным нарушениям экспрессии и проявлению патологического фенотипа. *Работа выполнена при поддержке РФФИ #18-29-13021.*

ИЗМЕНЕНИЕ 3D ОРГАНИЗАЦИИ В ЛОКУСЕ Kit/Kdr ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЮ РАЗВИТИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

В.А. Лукьянчикова[1], А.Н. Кораблев[1], А.А. Хабарова[1], А.С. Ржкова[1], И.А. Серова[1], Н.Р. Баттулин[1,2]
[1]Институт цитологии и генетики СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

3D организация хроматина оказывает значительное влияние на многие функции генома. Одним из уровней этой организации являются топологически ассоциированные домены (ТАДы) - области генома, преимущественно контактирующие внутри себя. Считается, что ТАДы ограничивают распространение действия энхансеров на нецелевые соседние гены, тем самым регулируя тканеспецифичность активности многих генов. Несмотря на то, что на сегодняшний день описано несколько примеров возникновения серьезных аномалий развития, вызванных изменением специфической организации ТАДов в районе ключевых генов развития, остается не ясным вопрос насколько универсален данный механизм. Для ответа на этот вопрос мы решили исследовать роль инсуляции 3D контактов хроматина в регуляции тканеспецифичности экспрессии генов на примере локуса Kit/Kdr мыши. Данные гены являются тирозинкиназными рецепторами, регулирующими развитие специфического набора клеточных типов (меланоциты, тучные клетки, эндотелиоциты и немногие другие). Тканеспецифичность генов задается активацией специфических энхансеров. Для ответа на вопрос приведет ли удаление границы ТАДов между этими генами к эктопическим взаимодействиям генов с чужими энхансерами мы создали набор линий мышей, у которых с помощью CRISPR/Cas9 удалили сайты посадки фактора CTCF, обеспечивающего инсуляцию 3D контактов. Удивительно, но мы не обнаружили каких-либо фенотипических проявлений у мышей с делецией границы ТАДов. Для поиска эктопической активации генов мы исследовали тучные клетки, так как в норме у них ген Kdr неактивен, а Kit входит в топ 1% генов с максимальной экспрессией. Однако удаление границы между генами не привело к активации гена Kdr в тучных клетках. Это может свидетельствовать о наличие дополнительных факторов, обеспечивающих координацию энхансеров с целевыми генами. Одним из таких факторов может быть геномное расстояние, так мы обнаружили, что в случае удаления границы ТАДов и около 300 kb из ТАДа гена Kit, у мышей не развиваются тучные клетки. Такие мыши могут служить моделью исследования функций тучных клеток. Таким образом инсуляция пространственных контактов хроматина может быть не единственным фактором, обеспечивающим правильные энхансер-промоторные взаимодействия.

HIV-1 TAT ИНДУЦИРУЕТ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В В-ЛИМФОЦИТАХ

А.А. Валяева[1], М.А. Тихомирова[1], Д.М. Поташникова[2], Е.А. Арифулин[3], М.А. Горбачева[4], А.А. Пенин[2], А. Клепикова[2], М.Д. Логачева[3], Я.Р. Мусинова[3,4], А.А. Жарикова[1], А.А. Саидова[2], А.А. Миронов[1,3], Е.С. Васецкий[4,5], Е.В. Шеваль[2,3]

[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова; [4]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия; [5]UMR8[12]6, CNRS, Université Paris-Sud, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Инфицирование Т-клеток вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) приводит к развитию синдрома приобретенного иммунодефицита. Разработанная и внедренная в клиническую практику в последние годы антиретровирусная терапия (ART) позволяет сдерживать развитие вирусной инфекции. Однако на фоне проводимой терапии могут развиваться различные осложнения, включая В-клеточные лимфомы (лимфома Ходжкина, диффузная В-крупноклеточная лимфома и лимфома Беркитта). Один из механизмов онкогенеза у ВИЧ-инфицированных пациентов связан с действием вирусного Tat белка, который способен проникать в В-клетки. Для изучения действия Tat белка на экспрессию генов в В-лимфоцитах в настоящей работе получены и охарактеризованы клеточные линии на основе культивируемых В-клеток линии RPMI 8866 с постоянной и индуцибельной экспрессией Tat белка. RNA-seq клеточных линий с экспрессией Tat-EGFP позволил выявить дифференциально экспрессируемые гены, экспрессия которых усиливалась или подавлялась в клетках с экспрессией Tat. Выявлены сигнальные и метаболические пути (KEGG), изменяющиеся под действием экспрессии Tat белка (ответ на вирусную инфекцию, цитокиновый сигнальный путь, убиквитин-зависимый протеолиз, межклеточные взаимодействия). По-видимому, некоторые пути активируются непосредственно Tat, часть активируется как результат противовирусной реакции клетки. Индуцибельная экспрессия меняет экспрессию существенно большего числа генов, по сравнению со стабильной, что может быть следствием адаптации клеток к экспрессии вирусного белка. Наконец, мы показали, что под действием экспрессии Tat белка в В-лимфоцитах активируются совсем иные гены по сравнению с Т-лимфоцитами, т.е. действие Tat белка было тканеспецифичным. Таким образом, под действием Tat активируются гены и сигнальные пути, которые могут приводить к онкогенезу В-клеточных лимфом. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-54-16002).*

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*

С.В. Ульянов[1,2], О. Цой[3], А.А. Галицина[3], Е.Е. Храмеева[3], С.С. Стариков[4], М.С. Гельфанд[3], С.В. Разин[1,2]

[1]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Институт биологии гена РАН; [3]Сколковский институт науки и технологий; [4]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Миксомицет *Dictyostelium discoideum* (диктиостелиум) – популярный модельный объект в исследованиях клеточного метаболизма, подвижности, фагоцитоза и взаимоотношений «хозяин-паразит». Сложный жизненный цикл этого организма, включающий одноклеточную и многоклеточную стадии, сделал его так же удобной моделью для исследования процессов клеточной дифференцировки и роли разнообразных транскрипционных факторов в этом процессе. Однако практически ничего не известно о том, как меняется эпигенетический статус и пространственная организация хроматина диктиостелиума в ходе превращения изначально однородной клеточной массы свободноживущих амёбоидных форм в сложноорганизованное плодовое тело, состоящее из нескольких типов узкоспециализированных клеток. Для решения этого вопроса в настоящей работе мы использовали высокопроизводительный метод фиксации конформации хромосомы (Hi-C) для картирования топологии генома, профилирование транскриптома методом РНК-сек для полногеномного определения экспрессии генов и технику ATAC-seq для выявления участков открытого хроматина на нескольких временных точках дифференцировки клеток диктиостелиума. Мы обнаружили, что на всех исследованных стадиях геном организован в эрреи коротких (10-40 т.п.н.) петель, в основаниях которых расположены конвергентно ориентированные гены. Внутренние области петель содержат гены домашнего хозяйства и прочие высоко активные гены, в то время как основания петель являются участками низкой транскрипционной активности. Компартменты и топологически-ассоциированные домены не были обнаружены в геноме диктиостелиума, выявленные петли основным мотивом укладки его хроматина на масштабе целой хромосомы. Полученные данные позволяют предполагать наличие некоего архитектурного белка, функционально родственного CTCF млекопитающих, связывание которого детерминирует положение оснований петель. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ # 18-34-20104.*

МЕХАНИЗМЫ СТРЕСС-ИНДУЦИРУЕМОЙ РЕПРЕССИИ ЯДРЫШКОВОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

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

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Основной функцией ядрышек, крупнейших субъядерных структур, организованных вокруг повторов рибосомных генов (рибосомная ДНК, рДНК), является биогенез рибосом. Одним из основных этапов этого процесса является ядрышковая, РНК-полимераза I (pol I)-зависимая, транскрипция рДНК, в ходе которой продуцируется прерибосомная РНК. Достаточно давно ядрышко рассматривается и как координатор клеточного ответа на различные типы стресса. Действительно, в ответ на клеточный стресс многие ядрышковые белки меняют локализацию и участвуют в регуляции процессов клеточного ответа на стресс. Известно также, что при некоторых видах стресса происходит подавление ядрышковой pol I-зависимой транскрипции. В этой работе мы исследовали новый механизм стресс-индуцированного подавления ядрышковой pol I-зависимой транскрипции. В частности, было показано, что умеренный гипоосмотический стресс приводит к накоплению в ядрышке РНК:ДНК-гибридов (R-петель), которые активируют ATR-зависимый ответ на повреждение ДНК. Интересно, что активация ATR в яд-

рышках полностью зависела от белка Treacle, который, как оказалось, был необходим для эффективного привлечения в ядрышко фактора TopBP1. Последующая ATR-зависимая активация киназы ATM приводила к полной репрессии pol I-зависимой транскрипции. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-74-20030).*

TP63 И TRIM29 РЕГУЛИРУЮТ УРОВЕНЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ЭНХАНСЕРОВ В БАЗАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Р.И. Султанов[1], А.С. Мулюкина[1], О.С. Зубкова[1], А.И. Федосеева[1], А.Н. Богомазова[1], Е.И. Шарова[1], Э.В. Генерозов[1], М.А. Лагарькова[1], Г.П. Арапиди[1,2], В.М. Говорун[1]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Ухудшение клинического прогноза у больных раком предстательной железы (РПЖ) часто ассоциировано с нарушением клеточной идентичности базального эпителия, которое приводит к эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) и последующему метастазированию. Тонкая настройка экспрессии генов, поддерживающих клеточную идентичность, происходит за счет широкого спектра энхансеров и суперэнхансеров, активация которых производится тканеспецифичными транскрипционными факторами. Потому определение факторов, влияющих на спектр активных энхансеров, может пролить свет как на механизмы формирования ЭМП и метастазирования, так и на развитие базального эпителия в целом.

В результате анализа данных проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA) для РПЖ (РНК-секвенирования, полногеномного метилирования и данных по изменению копийности генов) был получен кластер коэкспрессирующихся генов, ассоциированный с ЭМП в РПЖ, и развитием базального эпителия в целом. Открытые данные по нокдауну и сверхэкспрессии генов TP63, TRIM29 и MED12 на различных клеточных моделях показали, что мастер-регуляторами этого кластера являются гены TP63 и TRIM29, а MED12 их корегулятор. Были обнаружены 556 CpG-сайтов (eCpG-сайты), уровень метилирования которых коррелирует (коэффициент Спирмана < -0.8) с экспрессией генов кластера. На данных ChIP-seq на H3K27ac, H3K4me1 и TP63 было показано, что eCpG-сайты лежат в TP63-зависимых энхансерах, специфичных для кератиноцитов и базального эпителия предстательной железы. Более того, полученные данные свидетельствуют о том, что eCpG-сайты лежат в супер-энхансерах, регулирующих экспрессию генов кластера и поддержание клеточной идентичности базального эпителия.

Был обнаружен кластер коэкспрессирующихся генов, который ассоциирован с ЭМП в РПЖ. TP63 и TRIM29 - мастер-регуляторы этого кластера. Уровень метилирования eCpG-сайтов сильно скоррелирован с экспрессией генов кластера. Было предположено, что уровень метилирования eCpG-сайтов регулируется комплексом белков TP63-TRIM29-MED12, который активирует тканеспецифичные энхансеры в базальном эпителии.

Работа проведена при поддержке РФФИ (проект № 17-29-06063).

ГЕНДЕР-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ КЛАСТЕРА ГЕНОВ МИКРОРНК ИЗ ИМПРИНТИРОВАННОГО ЛОКУСА DLK1-DIO3 ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

О.О. Фаворова, Н.М. Баулина, Г.Ж. Осьмак, И.С. Киселев, Е.В. Попова, А.Н. Бойко, О.Г. Кулакова
Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

Исследования последних десятилетий в области функциональной геномики показали важную регуляторную роль микроРНК – малых некодирующих РНК, которые подавляют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Показано вовлечение ряда микроРНК в патогенез рассеянного склероза (РС) − аутоиммунного воспалительного заболевания центральной нервной системы высокой социальной значимости. С целью поиска микроРНК, ассоциированных с формированием РРС, был проведен анализ их экспрессии с использованием полнотранскриптомного профилирования (платформа MiSeq) у мужчин и у женщин в мононуклеарных клетках крови (МНК). Выявлены принципиальные различия в профилях микроРНК, дифференциально экспрессирующихся при РРС у мужчин и у женщин в сравнении с индивидами контрольной группы того же пола (-11; $p<0.05$). У мужчин поправку на множественные сравнения ($padj<0.05$) выдержали данные о повышенной экспрессии 26 микроРНК и о пониженной экспрессии 6 микроРНК. Примечательно, что среди них все гены микроРНК с повышенной экспрессией были локализованы в двух кластерах (14q32.2 и 14q32.31) импринтированного локуса DLK1-DIO3. У женщин отличий с $padj<0.05$ не наблюдали. Повышенная экспрессия miR-431, miR-127-3p, miR-379, miR-376c, miR-381, miR-410 и miR-656 из локуса DLK1-DIO3 в МНК больных РРС мужчин по сравнению со здоровыми мужчинами была верифицирована на независимых расширенных выборках с помощью RT-qPCR ($Log2FC>2.5$; $pcorr<0.05$). Дальнейший анализ показал, что у здоровых мужчин уровни всех исследованных микроРНК оказались ниже, чем у здоровых женщин, в то время как у мужчин с РРС уровни всех микроРНК повышались и достигали (или превышали) таковые у женщин с РРС. ANOVA анализ подтвердил для всех наблюдаемых микроРНК значимую взаимосвязь между статусом «здоровье-болезнь» и полом (padj от 0.026 до 0.0009). Данные биоинформатического анализа указывают на преимущественное вовлечение микроРНК, дифференциально экспрессирующихся при развитии РРС, в регуляцию сигнальных путей, активируемых через рецепторные тирозинкиназы. Таким образом, впервые выявлено участие микроРНК из локуса DLK1-DIO3 в патогенезе РРС, и показано существование гендерных различий в молекулярных механизмах этого заболевания. *Работа выполнена в рамках Госзадания ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ № 2-00-050-056.*

ПРИНЦИПЫ ПРИВЛЕЧЕНИЯ КОМПЛЕКСА ДОЗОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ НА Х-ХРОМОСОМУ САМЦОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

О.Г. Максименко, Е.А. Тихонова, В.А. Бабоша, А.Н. Бончук, А.А. Шилович, А.А. Федотова, П.Г. Георгиев
Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Процесс специфичного связывания комплекса дозовой компенсации дрозофилы исключительно с мужской Х-хромосомой является удобной модельной системой для понимания механизмов селективного рекрутирования регуляторных белковых комплексов на хроматиновые мишени. Ранние исследования показали, что ключевыми игроками в организации специфичности связывания комплекса с мужской Х-хромосомой являются белок MSL2, экспрессирующийся только у самцов, и ДНК-связывающий белок CLAMP, экспрессирующийся и у самцов и у самок и способный связываться не только с Х-хромосомой, но и множеством участков на аутосомах. В составе MSL2 охарактеризован ДНК-связывающий домен, связывающийся с участками посадки комплекса дозовой компенсации *in vitro* с достаточно низкой специфичностью. Другой консервативный домен MSL2 непосредственно формирует контакты с N-концевым доменом белка CLAMP. До сих пор не было известно, как взаимодействия между MSL2, CLAMP и ДНК функционируют *in vivo* в процессе организации посадки комплекса дозовой компенсации. В представленной работе мы проводим детальную характеристику того, как взаимодействия CLAMP-MSL2 и MSL2-ДНК совместно участвуют в процессе рекрутирования комплекса дозовой компенсации *in vivo*. Параллельно мы исследуем роль структуроорганизующего белка MSL1 в процессе специфичной посадки и последующего распространения комплекса вдоль Х-хромосомы. *Работа поддержана грантом РНФ 17-74-20155.*

ИНТЕРАКТОМНЫЕ ДАННЫЕ УКАЗЫВАЮТ НА РОЛЬ НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУР ДНК В РЕМОДЕЛИНГЕ ХРОМАТИНА

А.М. Варижук, Е.А. Исаакова, Ю.И. Павлова, М.Т. Вахитова, Г.Е. Позмогова
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

До недавнего времени G-квадруплексные (G4) ДНК-структуры не рассматривались как непосредственные участники процесса ремоделинга хроматина. В 2016 г. методом G4-ChIP-seq была показана колокализация G4 генома человека с областями низкой нуклеосомной плотности, а также ассоциация с активной транскрипцией; был сделан следующий вывод: ремоделинг хроматина определяет G4-профиль [R. Hänsel-Hertsch et al. Nature Genet. 2016]. Наши результаты профилирования G4-белковых взаимодействий на микрочипах, а также недавние результаты, полученные другими группами [S.Q. Mao et al. Nat Struct Mol Biol. 2018], свидетельствуют о том, что одновременно с прямой реализуется и обратная связь. Иными словами, формирование G4 может отчасти определять нуклеосомную укладку, модификации гистонов и другие эпигенетические параметры (CpG-метилирование). По итогам профилирования из нескольких тысяч белков человека нами было отобрано несколько десятков кандидатов на связывание с G4, в число лидерных вошли факторы ремоделинга хроматина, представители HMGB/HMGN семейств, гетеродимерный комплекс FACT – “сенсор” торсионных напряжений в ДНК [A. Safina et al. NAR 2017] и гистоновые шапероны с FACT-подобной активностью. Мы верифицировали часть G4-белковых взаимодействий независимыми методами и сопоставили данные ChIP-seq для нескольких белков с распределением G4-мотивов в геноме. Результаты не противоречат данным G4-ChIP-seq 2016 г., но позволяют интерпретировать их двояко; дополняют опубликованные недавно результаты профилирования ДНК-белковых и белок-нуклеосомных взаимодействий методом на основе масс-спектрометрического анализа [M.M. Makowski et al. Nature Commun. 2018] и объясняют выявленную ранее подверженность ремоделингу обедненных нуклеосомами областей с G4-мотивами. *Работа поддержана грантом РНФ [19-15-00128].*

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА ВИРУЛЕНТНОСТИ ЛЕЙШМАНИЙ

В.Ю. Юрченко[1,2], Н.Ю. Краева[1], А.Ю. Костыгов[1], Я. Вотыпка[3], П. Волф[3]
[1]Остравский университет, Острава, Чехия; [2]Института паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний имени Е.И. Марциновского, Сеченовский Университет, Москва, Россия; [3]Карлов университет, Прага, Чехия

Род Leishmania объединяет паразитических простейших семейства Trypanosomatidae, которые вызывают лейшманиозы, несколько очень похожих заболеваний человека и животных, которые распространены преимущественно в тропических и субтропических зонах. Клинические признаки могут варьировать от незначительных кожных поражений до прогрессирующих висцеральных инфекций, часто приводящих к летальному исходу. Детали молекулярных механизмов, которые позволяют различным видам лейшманий заражать человека и проходить цикл развития в разных хозяевах (позвоночных и насекомых), а также приобретать устойчивость к различным лекарственным препаратам, практически неизвестны. В целом, факторы вирулентности очень слабо изучены с помощью современных методов генетики, молекулярной и клеточной биологии. Предлагаемый нами новый методический подход основан на *in silico* анализе нескольких видов лейшманий и их сравнении с непатогенными для позвоночных видами. Предварительный геномный и транскриптомный анализы позволили нам идентифицировать 20 орто-групп генов, вовлеченных в вирулентность лейшманий. Некоторые из этих генов оставались неохартеризованными до настоящего времени. В этой работе мы изучали роль двух таких генов (LmxM.30.2090 и LmxM.22.0250) в вирулентности Leishmania mexicana и продемонстрировали, что первый из них кодирует АТФ/ГТФ-связывающий белок, а второй - фосфатазу двойной специфичности, дефосфорилирующей белки и липиды. Удаление обоих генов у *L. mexicana* (с использованием классических и основанных на CRISPR-Cas9 методов) ведёт к замедлению клеточного деления, и частичной потери вирулентности, как в моделях *in vitro* (макрофаги), так и *in vivo*. Интересно, что цикл развития паразитов при этом не изменяется. Мы считаем, что для разработки эффективных методов борьбы с лейшманиозами необходимо подробно изучить все идентифицированные факторы вирулентности и оценить их роль в развитии заболеваний. Лишь основываясь на новых данных (геномный, транскриптомный, протеомный анализы) можно успешно подбирать лекарственные препараты против этих внутриклеточных паразитов человека и животных.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА

Стендовые доклады и конкурс молодых ученых

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ И РЕПРЕССИИ α- И β-ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ *DANIO RERIO*

А.П.Ковина[1,2], Н.В.Петрова[1], С.В. Разин[1,2], О.В.Яровая[1]
[1]Институт биологии гена РАН; [2]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Гены, кодирующие α- и β-субъединицы тетрамерной молекулы гемоглобина, являются традиционной моделью для изучения регуляции транскрипции. У теплокровных животных α- и β-глобиновые гены находятся на разных хромосомах, организованы в хроматиновые домены разного типа, и их экспрессия регулируется с помощью разных механизмов. У холоднокровных позвоночных, в частности у тропической рыбы *Danio rerio*, α- и β- глобиновые гены образуют слитые кластеры. Главный локус глобиновых генов *Danio rerio* расположен на третьей хромосоме и включает в себя 13 α- и β- глобиновых генов эмбрионально-личиночного и взрослого типов, переключение экспрессии между которыми происходит на 18 день после оплодотворения. К 5'-концу от домена находится ген *NPRL3*, в интроне которого располагается главный регуляторный элемент (MRE) главного локуса. В настоящей работе с использованием техники иммунопреципитации хроматина было обнаружено, что профили ацетилирования гистонов в границах эмбрионально-личиночного и взрослого сублокусов главного локуса глобиновых генов *Danio rerio* существенно различаются на разных стадиях онтогенеза. Это согласуется с пространственной организацией изучаемых сублокусов, которая была исследована с помощью техники 5C: содержащий глобиновые гены взрослого типа сублокус *Danio rerio* организован в хроматиновую глобулу в эритроидных клетках взрослых рыб, в то время как эмбрионально-личиночный сублокус имеет расправленную конфигурацию на эмбрионально-личиночной и взрослой стадиях индивидуального развития. Было также продемонстрировано, что в главном локусе глобиновых генов *Danio rerio* стадиеспецифичная репрессия глобиновых генов взрослого и эмбрионально-личиночного типов осуществляется при участии эпигенетической модификации гистонов, которая может привлекать репрессорный комплекс PRC1. Кроме того, было показано, что механизмы тканеспецифичной репрессии глобиновых генов эмбрионально-личиночного и взрослого типов в неэритроидных клетках *Danio rerio* различаются: для репрессии генов взрослого субдомена главного локуса используется универсальный механизм – деацетилирование гистонов, в то время как гены эмбрионально-личиночного субдомена репрессируются с привлечением как гистондеацетилаз, так и гистонметилтрансфераз. *Грант РФФИ № 18-29-07001.*

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ПЛЕРОЦЕРКОИДОВ ЛЕНТЕЦА ЧАЕЧНОГО *DIPHYLLOBOTHRIUM DENDRITICUM* (CESTODA)

Т.В. Сидорова[1], И.А. Кутырев[2], К.В. Хабудаев[1], Л.В. Суханова[2], О.Е. Мазур[1]
[1]Лимнологический институт СО РАН, Иркутск; [2]Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

На территории России ежегодно дифиллоботриозом заболевает более 6 тысяч человек (Беляев и др., 2001; Верещагин и др., 2010, 2014). В ряде северных районов Сибири и в Прибайкалье основным возбудителем дифиллоботриоза человека и животных является лентец чаечный *Diphyllobothrium dendriticum.* Первыми промежуточными хозяевами лентеца являются веслоногие ракообразные родов *Arctodiaptomus, Diaptomus, Eudiaptomus, Cyclops*. Вторые промежуточные и резервуарные хозяева — преимущественно лососевые, хариусовые и сиговые рыбы, однако имеются указания на обнаружение плероцеркоидов этого вида у некоторых карповых и бычковых рыб, а также у щуки, налима и колюшек (Делямуре и др., 1985). В условиях Байкала наблюдается усложнение жизненного цикла за счет включения резервуарных хозяев — эндемичных бычков (Пронина и др., 1990). Окончательные хозяева — различные виды рыбоядных птиц и млекопитающих, в том числе и человек. Было проведено полнотранскриптомное парноконцевое секвенирование на приборе Illumina NextSeq 550, в результате секвенирования было получено 92391817 парных чтения. На основе полученных данных произведена сборка *de novo* с использованием программного пакета Trinityrnaseq. Статистика сборки приведена в таблице

n_seqs	smallest	largest	n_bases	mean_len	n_under_200	n50
79249	291	19960	93849113	1184	23088	1090

Аннотирование полученных транскриптов с помощью программы Blast2Go позволило определить их распределение по следующим категориям: биологические процессы, молекулярные функции и клеточные компоненты. В биологических процессах преобладают транскрипты клеточных процессов (13%), метаболических процессов (10%), биологической регуляции (9%) и компонентов регуляции биологических процессов (10%). Среди молекулярных функций преобладают транскрипты трансферазной активности (14%), гидролазной активности (14%), анионного связывания (12%), ДНК связывания (11%), связывания энзимов (11%) и каталитической активности (11%). В клеточных компонентах преобладают транскрипты белок-содержащих комплексов (15%), эндомембранной системы (12%) и компоненты связи плазматических мембран (8%).

Работа проведена в рамках выполнения темы госзадания, № госрегистрации АААА-А17-117011810039-4, и при финансовой поддержке РФФИ (грант 19-04-00666).

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ПОЧКИ БАЙКАЛЬСКОГО ОМУЛЯ

Т.В. Сидорова[1], И.А. Кутырев[2], К.В. Хабудаев[1], О.Е. Мазур[1], Л.В. Суханова[2]
[1]Лимнологический институт СО РАН, Иркутск; [2]Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

Байкальский омуль (*Coregonus migratorius* (Georgi, 1775), сем. Coregonidae, отр. SALMONIFORMES) — эндемик и основная промысловая рыба, освоившая пелагическую зону озера от прибрежья до глубин 300-400 м.

Впервые проведен полнотранскриптомный анализ головного отдела почки омуля (пронефроса) – гемопоэтического и иммунного органа. С помощью парноконцевого секвенирования на приборе Illumina NextSeq 550 получено 90253643 парных чтения и произведена сборка de-novo с использованием программного пакета Trinityrnaseq. Статистика сборки приведена в таблице.

n_seqs	smallest	largest	n_bases	mean_len	n_under_200	n50
183651	283	18497	237723856	1294	43268	2203

Аннотирование полученных транскриптов с помощью программы Blast2Go позволило определить их распределение по следующим категориям: биологические процессы, молекулярные функции и клеточные компоненты. В биологических процессах преобладают транскрипты клеточных процессов (11%), биологической регуляции (9%), метаболических процессов (9%) и компонентов регуляции биологических процессов (9%). Среди молекулярных функций преобладают транскрипты гидролазной активности (11%), трансферазной активности (11%), enzyme binding (9%) и DNA binding (9%). В клеточных компонентах преобладают транскрипты цитоплазматических везикул (9%), части плазматической мембраны (8%) и нуклеоплазмы (8%). *Работа проведена в рамках выполнения темы госзадания, № госрегистрации АААА-А17-117011810039-4, и при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-34-20015).*

РОЛЬ SETDB1 В РЕГУЛЯЦИИ ТРЕХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЯДРА ПРИ РАКЕ ЛЕГКИХ

В.В. Захарова, Ж. Телье, Л. Дель Маэстро, В. Жолио, С. Аит-Си-Али
CNRS UMR7216 "Epigénétique et Destin Cellulaire" Université Paris Diderot Paris 7, Paris, France

Метилтрансфераза SETDB1, участвующая в метилировании H3K9, вовлечена в процесс прогрессирования рака легких. Триметилирование H3K9 при повышенной экспрессии SETDB1 является одним из диагностических маркеров процесса метастазирования рака легких. Высокие уровни экспрессии SETDB1 коррелируют с повышенным уровнем пролиферации и инвазивности клеток рака легких (Rodriguez-Paredes et al., 2014). С другой стороны, SETDB1 может выступать в качестве супрессора процесса метастазирования рака легких. В то же время неизвестны детальные механизмы участия SETDB1 в онкогенезе рака легких. Известно, что SETDB1 регулирует трехмерную организацию хромосом в ядре (Jiang et al., 2017); мы также обнаружили, что SETDB1 взаимодействует с комплексом когезина и может метилировать некоторые субъединицы этого комплекса. Комплекс CTCF и когезина разграничивает топологически ассоциированные домены (TADs) путем прямого связывания с хроматином на границах TAD. Связывание CTCF с хроматином ингибируется триметилированием H3K9 (H3K9me3) и метилированием ДНК. Мы предполагаем, что SETDB1 меняет трехмерную архитектуру раковых клеток и таким образом способствует онкогенезу. Цель: исследовать роль SETDB1 в регуляции трехмерной организации генома в эпителиальной клеточной линии рака легких с различными уровнями экспрессии SETDB1 (низкий, нормальный или высокий). Мы обнаружили, что SETDB1 регулирует эпителиально-мезенхимальный переход клеток, который играет важную роль при прогрессии и метастазировании рака легких. Мы планируем провести ChIP-Seq анализ с антителами против CTCF, SETDB1 и H3K9me3 в сочетании с Bis-Seq для исследования уровня метилирования ДНК, гистонов в местах связывания CTCF и SETDB1 в наших клеточных моделях. В дальнейшем мы построим Hi-C карты клеток с разными уровнями экспрессии STDB1 и сравним их с данными ChIP-Seq и Bis-Seq. Выводы: SETDB1 взаимодействует с комплексом когезина и модифицирует его, а также регулирует эпителиально-мезенхимальный переход клеток, который играет важную роль при прогрессии и метастазировании рака легких. Мы ожидаем, что SETDB1 взаимодействует с комплексом комплекса когезина и влияет на связывание CTCF с хроматином на границах TAD, тем самым, влияя на трехмерную организацию генома и экспрессию генов при прогрессировании рака легких.

КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И УРОВНЕМ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЁННЫХ В МЕТАБОЛИЗМ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ И АТЕРОГЕНЕЗ

Е.В. Носова[1], В.Г. Дмитриева[1, 2], А.В. Рожкова[1], Д.Ю. Литвинов[2], А.Д. Дергунов[2], С.А. Лимборская[1], Л.В. Дергунова[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины Минздрава России

Цель данной работы – выявление связи между содержанием липидов плазмы крови человека и уровнем транскриптов генов, вовлечённых в метаболизм липопротеинов высокой плотности (ЛВП-кластер) и атерогенез (атероген-кластер). В мононуклеарных клетках крови выборки из 38 мужчин 40-60 лет с широко варьирующим содержанием холестерина (ХС) ЛВП без коронарного атеросклероза исследовано содержание липидов плазмы крови и уровень экспрессии 63 генов обоих кластеров, оцененный методом ПЦР в реальном времени.

Анализ взаимосвязи между уровнем ХС-ЛВП и содержанием транскриптов 22 генов, связанных с метаболизмом ЛВП, выявил отрицательную корреляцию для 10 генов (*ZDHHC8*, *BMP1*, *SCARB1*, *CUBN*, *ABCA1*, *LDLR*, *LCAT*, *PRKACG*, *HDLBP*, *PRKACG*) и положительную корреляцию с уровнем транскриптов гена *APOA1*. Уровень ХС липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛНП) отрицательно коррелировал с содержанием транскриптов генов *CUBN* и *HDLBP*. Анализ связи между уровнем ХС плазмы и содержанием транскриптов генов данного кластера выявил отрицательную корреляцию для 8 генов (*SCARB1*,

HDLBP, *CUBN*, *ABCA1*, *ZDHHC8*, *BMP1*, *PRKACG*, *LCAT*). Отсутствовала связь между содержанием триглицеридов и уровнем экспрессии генов ЛВП-кластера. Анализ корреляции между уровнем ХС-ЛВП и содержанием транскриптов 41 гена, связанных с атерогенезом, выявил отрицательную корреляцию для транскриптов 11 генов: *ITGB3*, *TLR8*, *TNFRSF1B*, *CSF2RB*, *ITGAM*, *PRKACQ*, *IL18R1*, *TNFRSF1A*, *TLR5*, *SREBF1*, *CSF1R*. Для изучения функциональных взаимодействий белковых продуктов 22 генов двух кластеров, содержание транскриптов которых значимо коррелировало с содержанием ХС-ЛВП, использована база данных STRING. 22 узла вовлечены в 50 взаимодействий. ЛВП-кластер и атероген-кластер взаимодействуют между собой только через два гена – ген рецептора колонии-образующего фактора *CSFR1* (6 путей) и ген общей субъединицы бета рецептора цитокинов *CSF2RB* (2 пути).

Полученные данные свидетельствуют об уменьшении роли воспалительного компонента атерогенеза у пациентов с повышенным содержанием ХС-ЛВП. Пересечение двух кластеров генов только в двух узлах (*CSFR1*, *CSF2RB*) может определять различную соотнесенность функциональных и дисфункциональных свойств ЛВП в атерогенезе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00217.

СОЗДАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ lincRNA И ПОДБОР ИНСТРУМЕНТОВ ДЛЯ ИХ АНАЛИЗА

И.А. Сидоренко, В.Н. Бабенко
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

В последние годы наблюдается рост интереса к длинным не кодирующим РНК (lncRNAs), относительно новому объекту исследования, который изучен не в полной мере. Известно несколько примеров lncRNAs, с экспериментально подтвержденными функциями в регуляции экспрессии генов, например, Xist lncRNA, которая участвует в инактивации Х-хромосомы млекопитающих. Функции других некодирующих молекул РНК (рибосомных, транспортных, и др.) уже четко определены, роль lncRNA остаётся в значительной степени неизвестной. Число функционально охарактеризованных lncRNAs остается небольшим. Это ожидаемо, потому что функциональная аннотация lncRNAs протекает через затратные прямые эксперименты (например, нокаут гена или индуцированная экспрессия). Альтернативным подходом исследования lncRNAs является крупномасштабная вычислительная функциональная аннотация с помощью объединения информации из четырех основных источников, определяющих функцию почти всех геномных локусов, а именно: геномную структуру и положение; состояние хроматина; статус экспрессии; эволюционная консервативность. Цель работы - создание базы данных lncRNA, которая объединяет несколько наборов данных по lncRNAs и предоставляет функциональные возможности для интерфейса клиентских запросов с гибкими извлечением, манипуляцией, аннотацией и анализом lncRNAs. Также планируется найти характеристики структуры последовательности, дифференцируя кодирующие и не кодирующие гены. На данном этапе исследований изучены существующие базы lncRNA, выявлены их плюсы и минусы (LNCipedia, DIANA-LncBase, lncRNAdb, DeepBase, lncRNADisease). Проводится тестирование функционала базы данных на хорошо изученных lncRNA: MALAT1, XIST, HOTAIR, KCNQ1OT1.

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

Устные доклады

СИСТЕМА ПЕПТИД–БАКТЕРИОФАГ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ И ТАРГЕТНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Е.Ф. Колесанова[1], М.В. Мельникова[1], Т.Н. Большакова[2], Е.Ю. Рыбалкина[3], И.Г. Сивов[4]
[1]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; [2]НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи; [3]НИИ канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, [4]ООО «Биотехнология», Москва, Россия

Бактериофаги и получаемые из них капсидные частицы представляют собой удобные природные контейнеры для доставки лекарственных соединений, вакцинных иммуногенов, диагностических изотопных меток. Направленность доставки обеспечивается в основном пептидными лигандами, связывающимися с рецепторами на поверхности клеток-мишеней. Пептидные лиганды могут присоединяться к капсидным белкам бактериофагов с помощью конъюгации с участием гомо- и гетеробифункциональных реагентов либо включаться в состав капсидных белков в результате генноинженерных манипуляций, приводящих к продукции этих белков с таргетными пептидами в составе их полипептидных цепей. Наполнение наноконтейнеров на основе бактериофагов осуществляется либо путем ковалентного присоединения лекарственного соединения или диагностической метки на наружную или внутреннюю поверхность капсида, либо за счет взаимодействия РНК бактериофага с наполнителем. Использование указанной системы для направленного транспорта в клетки опухолей и разработка лекарственного препарата на её основе будут рассмотрены на примере частиц бактериофага MS2, конъюгированных с пептидными лигандами интегринов и заполненных ионами Tl+. *Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.*

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ: НОВЫЙ ТРЕНД МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЫ

Г.Е. Позмогова, В.Б. Цветков, В.В. Северов, Ю.Г. Кириллова, Т.А. Волков, Т.А. Николенко, И.П. Смирнов, А.М. Варижук
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Сегодня не вызывают сомнений реализация in vivo метастабильных неканонических конформаций полинуклеотидов (ncNA) и их генно-регуляторная роль [Zeraati (2018) Nat. Chem., Biffi (2014) Nat Chem., Biffi (2013) Nat Chem.]. С точки зрения молекулярного программирования, склонность к фолдингу внутри- и межмолекулярных G-квадруплексов (G4) и I-мотивов (IM) можно рассматривать как встроенную функцию нуклеиновых кислот [Varizhuk (2018) AML]. Изучение молекулярных основ и закономерностей самосборки ncNA стало важным направлением фундаментальных исследований, в том числе, исследования механизмов развития ряда патологий (онкологические, нейродегенеративные, аутоиммунные заболевания и др.). Прикладной аспект таких работ связан с перспективами разработки новых ncNA-адресованных лигандов и ДНК-лекарств (например, G4-аптамеров), биосенсеров и диагностикумов. Применение G4-адресованных лигандов создает новые возможности регуляции экспрессии не только генов человека, но и воздействия на метаболизм сопутствующих инфекций, метагеномных сообществ. Для оценки избирательности G4-лигандов- потенциальных лекарств [Ruggiero (2018) NAR, Duarte (2018) ChemMedChem, Vlasenok (2017) DB] – мы разработали скрининговую систему, включающую расширенный набор ncNA-мишеней геномов человека и ряда патогенов. В исследовании IM/G4 ассоциатов использовался комплекс физико-химических, биоинформатических, генно-инженерных методов, оригинальные подходы к молекулярному моделированию ДНК-комплексов и новые производные олигонуклеотидов. Описаны разнообразные структуры супрамолекулярных IM, показана возможность их управляемой сборки и модуляции pH-переходов [Tsvetkov (2018) NAR, Protopopova (2018) PCCP, Позмогова (2018) Патент РФ 2649369]. Проанализирован структурный полиморфизм модельных и геномных G4 ассоциатов [Varizhuk (2018) NAR]. В совокупности наши результаты впервые проливают свет на правила, регулирующие *in vivo* полинуклеотидные перегруппировки с участием ncNA сайтов и важны для использования G4 и IM в нанотехнологии. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 19-015-00024).*

ПЕПТИД AEDG РЕГУЛИРУЕТ ДЛИНУ ТЕЛОМЕР В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

В.Х. Хавинсон[1,2,3], А.А. Пендина[4], О.А. Ефимова[4], А.С. Кольцова, М.И. Крапивин[4,6], А.В. Тихонов[4], Л.И. Петрова[4], А.В. Петровская-Каминская[4,6], Н.С. Линькова[1,5], В.С. Баранов[4]
[1]Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии; [2]Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН; [3]Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова; [4]НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта; [5]Академия постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России; [6]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Проявлением клеточного старения является уменьшение длины теломер и достижение лимита Хейфлика. Ранее было показано, что добавление пептида AEDG в культуру фибробластов легких человека индуцировало экспрессию гена теломеразы, ее активность и повышало число делений клеток на 42,5%. Цель настоящей работы – изучить влияние пептида AEDG на длину теломер лимфоцитов крови человека.

Кровь была получена от 5 мужчин молодого (18-22 лет) и 6 мужчин среднего (49-54 лет) возраста. Клетки культивирования 72 часа при + 37°C в среде, содержащей RPMI 1640, гентамицин, L-глутамин, сыворотку эмбрионов коров и фитогемагглютинин. Через 48 ч культивирования, в экспериментальные культуры добавляли пептид AEDG в концентрации 1000 нг/мл. Для определения относительной длины теломер была проведена флуоресцентная гибридизация *in situ* с ДНК-зондами, специфичными к теломерным последовательностям хромосом человека. Изображения метафазных пластинок были получены с помо-

щью микроскопа DM5000B (Leica, Германия). Интенсивность флуоресценции ДНК-зондов на изображениях метафазных хромосом определяли с помощью программного обеспечения ImageJ 1.48v. Статистический анализ был проведен в программе GraphPad Prism Version 6.01 по критерию Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p<0.05$.

После воздействия пептида было установлено достоверное увеличение относительной длины теломер ФГА-стимулированных лимфоцитов у двух индивидов младшей возрастной группы на 41% и 55% и у трёх индивидов средней возрастной группы на 156%, 18% и 76%. Достоверное уменьшение – в ФГА-стимулированных лимфоцитах одного индивида младшей возрастной группы на 37% и одного индивида старшей возрастной группы на 15%. У лиц среднего возраста установлено большее число случаев достоверного изменения относительной длины теломер после воздействия пептида AEDG. При этом была отмечена тенденция к нормализации длины теломер: увеличению длины теломер у тех испытуемых, у которых была выявлена исходно меньшая длина теломер, чем средняя величина в соответствующей возрастной группе, и к уменьшению – в случае, если индивидуальное значение превышало среднее в группе.

НАНОРАЗМЕРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С КАТИОНАМИ МЕТАЛЛОВ: НОВАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ РНК В КЛЕТКИ ЖИВОТНЫХ

В.Н. Данилевич, Ю.М. Ходарович, С.В. Сизова
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Ранее описан феномен формирования наночастиц (NPs) из ДНК и РНК при термоциклировании в присутствии катионов бивалентных металлов [1]. В настоящей работе изучены закономерности конденсации РНК и формирования NPs при термоциклировании растворов тРНК бактерий в присутствии катионов бивалентных металлов (Ca^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} и Cu^{2+}) и лантаноидов (Tb^{3+} и Gn^{3+}). Найдены оптимальные условия для эффективной конденсации РНК и получения NPs. Установлено, что катионы Mn^{2+}, Zn^{2+}, а также Tb^{3+} и Gn^{3+} при термоциклировании частично разрушают (гидролизуют) РНК. В то же время катионы Ca^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+} и Cu^{2+} не разрушают РНК, более того, эти катионы ингибируют РНК-гидролитическую активность катионов Mn^{2+}, Zn^{2+} и лантаноидов. Выявлена зависимость размера NPs от соотношения концентраций катионов и тРНК. Подобраны концентрации реагентов для получения NPs небольшого размера – от 5 до 100 нм, обладающих высокой проникающей способностью через гистологические барьеры. Используя РНК MG-аптамера (38 н) [2], способной формировать флуоресцирующий комплекс с малахитовым зеленым, показано, что в процессе получения и диссоциации наночастиц количество интактных молекул РНК снижается в два раза. Причина этого – щелочной гидролиз РНК в буфере с pH 8,5. Изучена стабильность РНК NPs при хранении и показано, что они крайне нестабильны в фосфатном (PBS) буфере с pH 7,4. Проведен поиск стабилизаторов для РНК NPs и выявлено, что небольшие добавки полиаргинина, или других пептидных поликатионов, обеспечивают длительную сохранность наночастиц в PBS-буфере. Модифицированные поликатионами РНК NPs приобретают устойчивость к нуклеазам и могут быть использованы для трансфекции. Отработаны условия трансфекции клеток линии HEK293 с помощью наночастиц и продемонстрировано формирование функционально-активных молекул MG-аптамера при диссоциации NPs в клетках трансфектантов. Таким образом, разработана новая, простая и доступная система для доставки функциональных РНК в клетки животных. *Работа поддержана Грантом РФФИ № 17-08-01034-а.*

1. Danilevich V.N. Dokl. Biochem. Biophys. 2012. V. 443, P. 71–75.
2. Reif R., Haque F., Guo P. Nucleic Acid Ther. 2012. V. 22. P. 428–437.

ДОСТАВКА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ОПУХОЛЬ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ PH-ЗАВИСИМОГО ВСТРАИВАЮЩЕГОСЯ ПЕПТИДА (pHLIP)

А.Г. Першина[1,2], О.Я. Брикунова[1,2], А.М. Демин[3], М.А. Абакумов [4], А.Н. Ванеев[5], В.А. Науменко[4], Т.Р. Низамов[4], А.С. Ерофеев [4], О.Б. Шевелев[6], И.А. Разумов[6], Е.Л. Завьялов[6], С.В. Вторушин[1], П.В. Горелкин[7], В.П. Краснов[3], А.Г. Мажуга[4,5,8]
[1]Сибирский государственный медицинский университет; Томск; [2]Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск; [3]Институт органического синтеза им. П.Я. Постовского, Екатеринбург, [4]Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва; [5]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [6]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; [7]ООО «Медицинские нанотехнологии», Инновационный центр «Сколково», Москва; [8]Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Адресная доставка с pH-чувствительными молекулами является многообещающей альтернативой использованию направляющих молекул с высокой аффинностью к рецепторам, экспрессированным на поверхности опухолевых клеток. Данная стратегия доставки позволяет избежать ограничения, связанные с высокой гетерогенностью раковых клеток и с плохим проникновением вглубь опухоли из-за насыщения рецепторов клеток в поверхностных слоях опухоли (binding site effect). В работе исследовали эффективность доставки магнитных наночастиц оксида железа (МНЧ) на основе Fe_3O_4, модифицированных pH-чувствительным встраивающимся пептидом (pHLIP), на моделях экспериментальных опухолей. Молекулы пептида ковалентно конъюгировали с МНЧ, содержащими на поверхности аминогруппы, с использованием малеимидного кросс-линкера EMCS, либо полиэтиленгликоля, имеющего аналогичные функциональные группы. Исследование проводили на моделях карциномы молочной железы мыши 4T1 у мышей Balb/c и аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB231 у мышей линии SCID. После внутривенного введения МНЧ-pHLIP отмечали подавление сигнала на T2-взвешенных МРТ-изображениях опухоли. Накопление наночастиц в опухоли подтверждено данными измерения концентрации железа методом атомно-эмиссионной спектроскопии. Гистологический и иммуногистохимический анализы показали, что сайты накопления наночастиц в опухоли преимущественно локализованы в областях с высокой плотностью кровеносных сосудов. Однако эффективность накопления MNP-pHLIP в экспериментальных опухолях значительно варьировала внутри экспериментальных групп. Согласно данным измерения pH в опухоли с использованием pH-чувствительного наноэлектрода установлено, что эффективность

накопления наночастиц линейно зависела от значения интерстициального pH опухоли. Использование пониженной pH опухоли в качестве маркера позволяет адресно доставлять магнитные наночастицы в опухоль. Однако эффективность доставки наночастиц в опухоль с использованием pH-чувствительных молекул, зависит от патофизиологических характеристик опухоли. Визуализация накопления магнитных наночастиц в опухоли методом МРТ может быть использована для оценки применимости данной стратегии при терапии конкретных опухолей.

EXTRACELLULAR VESICLES AS DRUG DELIVERY VESICLES

E.V. Batrakova[1], N.L. Klyachko[1,2,3], M.J. Haney[1], Y. Zhao[1], A.V. Kabanov[1,2]
[1]University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA; [2]Deparment of Chemical Enzymology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; [3]G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia

Extracellular vesicles (EVs) (exosomes and microvesicles) are promising naturally occurring nanocarriers for delivery of various types of therapeutics. They have attracted considerable attention as drug delivery vehicles in the past few years. EVs are comprised of natural lipid bilayers with the abundance of adhesive proteins that readily interact with cellular membranes. We posit that EVs secreted by monocytes and macrophages can provide an unprecedented opportunity to avoid entrapment in mononuclear phagocytes (as a part of the host immune system), and at the same time enhance delivery of incorporated drugs to target cells ultimately increasing drug therapeutic efficacy. It the work presented, the use of macrophage-derived EVs will be discussed as delivery systems for antioxidant enzymes, catalase and superoxide dismutase, or proteins, BDNF and GDNF, to treat neurodegenerative diseases; for a soluble lysosomal enzyme, tripeptidyl-peptidase 1 (TPP1), to treat a lysosomal storage disorder (Batten disease); or for low molecular therapeutics like paclitaxel to treat cancer.Overall, EVs-based formulations have a potential to be a versatile strategy to treat different life-threatening disorders. *This study was supported by generous gift from Mr. and Mrs. Lehrman, Eshelman Institute for Innovation UNC·EII29-201 and 29202 grants, and Elsa U Pardee Foundation grant 17-4676 (EVB). The authors are also thankful to BioMarin Pharmaceutical Inc. for their generous gift of recombinant human TPP1 protein. Partial support was provided by RFBR 17-54-33027 and 18-29-09154 grants (NLK).*

МОЖЕТ ЛИ ВИРУС ПОБЕДИТЬ РАК? ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ

В.А. Рихтер[1], О.А. Коваль[1], Г.В. Кочнева[2], Е.В. Кулигина[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия; [2]ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская область, Россия

Сконструирован рекомбинантный штамм вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, продуцирующий ГМ-КСФ человека и онкотоксический белок лактаптин. Встройку трансгенов осуществляли в районы делеций вирусных генов тимидинкиназы (tk) и ростового фактора (vgf). Было показано, что индекс онкоселективности штамма VV-GMCSF-Lact составляет более 200 в паре культур клеток эпителия молочной железы нормальная/раковая MCF 10A/MCF7, а уровень аттенуации превышает 100 по сравнению с родительским штаммом. Рекомбинант VV-GMCSF-Lact эффективно ингибирует рост опухолей молочной железы человека MDA-MB-231 и глиобластомы человека U87-MG, трансплантированных иммунодефицитным мышам. Индекс торможения роста опухоли превышает 80%. После инратуморального введения вирус интенсивно размножается в опухолевых клетках, разносится кровотоком по организму и поражает опухолевые клетки, находящиеся в других органах и тканях организма, т. е. проявляет выраженную антиметастатическую активность. Лактаптин, синтезирующийся внутри инфицированной клетки, активирует апоптоз по установленному ранее механизму. При этом происходит активация эффекторных каспаз 3 и 7, интернализация фосфатидилсерина на поверхность инфицированных клеток, фрагментация клеточной ДНК, индукция проапоптотического белка BAX; снижение митохондриального мембранного потенциала. Экспрессия гена ГМ-КСФ в составе вируса стимулирует миграцию эффекторных клеток иммунной системы в разрушенную вследствие репродукции вирусов опухолевую ткань. К 12 дню после интратуморального введения вирус практически полностью элиминируется из здоровых органов и тканей организма. При этом концентрация вирусных частиц в опухолевых клетках остается на постоянном уровне. В настоящее время закончены доклинические испытания вируса. Полученные результаты, подтверждают безопасность и противоопухолевую активность VV-GMCSF-Lact. Вирус эффективно подавляет рост солидной опухоли, «ищет» метастазы и ингибирует их развитие. Штамм VV-GMCSF-Lact фактически является самореплицирующимся лекарственным препаратом, циркулирующим в организме и размножающимся только в опухолевых клетках.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВЕКТОРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ АТТЕНУИРОВАННОГО ВИРУСА ГРИППА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИН ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ

А.В. Васин, А.Ю. Егоров, М.В. Сергеева, М.А. Стукова
НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Применение вирусных векторов для доставки и экспрессии чужеродных антигенов в верхних дыхательных путях является привлекательным подходом для создания вакцин против респираторных инфекционных заболеваний, для которых вакцины с доказанной эффективностью все еще отсутствуют. Концепция нашей вакцины основана на применении в качестве вектора вируса гриппа, который ослаблен за счет модификации белка NS1. Данный эффект достигается заменой иммуносупрессивного С-концевого домена белка NS1 чужеродными последовательностями, кодирующими протективные антигены инфекционных патогенов. Векторы данного типа характеризуются ограниченной репликацией, но при этом обладают адьювантными свойствами, стимулируя систему врожденного иммунитета, что, в свою очередь, усиливает адаптивный антиген-специфический иммунный ответ. Преимущества вакцинации аттенуированным гриппозным вектором включают стимуляцию местного иммунитета в дыхательных путях и формирование хорошо сбалансированного Th1/Th2 клеточного компонента иммунного ответа.

Поэтому в качестве потенциального патогена-мишени был выбран респираторно-синцитиальный вирус, против которого в настоящее время не существует зарегистрированных вакцин. Нами было разработано несколько векторных конструкций FLU/RSVF на основе вируса гриппа, экспрессирующего консервативные антигенные сайты II и IV белка F респираторно-синцитиального вируса. Было показано, что векторы хорошо репродуцируются и генетически стабильны при многократных пассажах в куриных эмбрионах. Все полученные штаммы были безопасны при интраназальном введении лабораторным мышам. Также на мышиной модели была продемонстрирована защита от РСВ-инфекции: у вакцинированных животных зафиксировано значительное снижение вирусной нагрузки, а также меньшая степень макроскопических и гистологических поражений в легких. Полученные результаты показывают, что векторы Flu/RSVF являются перспективными вакцинными кандидатами. К настоящему времени завершены комплексные доклинические исследования вакцинных кандидатов для профилактики и иммунотерапии туберкулеза легких на основе гриппозного вектора, экспрессирующего антигены M. tuberculosis (ESAT-6, Ag85A, HspX, TB10.4). В ходе клинических исследований 1 фазы у людей был показан хороший профиль безопасности и сбалансированный Т-клеточный иммунный ответ.

ГЛУБОКИЙ ПРОФАЙЛИНГ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

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

Одним из наиболее универсальных показателей состояния системы адаптивного иммунитета организма является количественная и функциональная вариабельность клонального состава периферических Т-лимфоцитов – индивидуальный репертуар Т-клеточных рецепторов (ТкР). Настоящий проект направлен на определение динамики репертуара ТкР в ходе иммунного ответа организма человека на некоторые патогенны рода Flavivirus, а именно – при вакцинации живой аттенуированной вакциной YF-17D против вируса желтой лихорадки и культуральной очищенной инактивированной "Вакциной клещевого энцефалита". В настоящем исследовании нами применена оригинальная технология глубокого профилирования Т-клонов для количественной оценки динамики клонов Т-клеток в репрезентативных группах вакцинируемых доноров. С использованием методов биоинформатического анализа и статистической обработки данных высокопроизводительного секвенирования мы идентифицировали от 600 до 1700 отвечающих на иммунизацию клонов Т-клеток у каждого из вакцинируемых. Сравнительный анализ репертуаров вакцин-ассоциированных Т-клонов обнаружил индивидуальный характер Т-клеточного ответа на вакцины. Случаи клональной экспансии Т-лимфоцитов идентифицировали с использованием пакета программ edgeR. Специфичность клонов к YF-17D вакцине подтверждали секвенированием ТкР фракции Т-лимфоцитов, отобранной на флуоресцентно меченый пептид-МНС декстрамер. Нами было показано, что повторная, даже спустя 30 лет после первичной, иммунизация YF-17D-вакциной вызывает выраженный Т-клеточный ответ, раннюю клональную экспансию в ответ на ревакцинацию и последующее развитие дополнительного ответа, обеспечиваемое отдельными клонами существующего пула наивных Т-клеток. Максимальная экспансия большинства CD4 Т-клонов преимущественно наблюдалась в одной временной точке, тогда как для CD8 Т-клонов были выявлены несколько «пиков» ответа, предполагающих рекрутирование новых CD8+ Т-клонов после каждой инъекции. У каждого донора найдены группы клонов со схожей аминокислотной последовательность ТкР и одинаковой динамикой изменения численности в ходе исследования. *Исследование поддержано грантом РНФ 15-15-00178-П.*

N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНАТ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИН – АДАПТОГЕН ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

И.В Жигачева[1], И.Ф. Русина[2]
[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; [2]Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

Исследована биологическая активность производных 3-оксиксипиридина (3-ОП), в частности N-ацетилцистеината2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридина (3-ГП). Биологическая активность 3-ОП обусловлена тем, что они являются структурными аналогами соединений группы пиридоксина (витамина В6), имеющих значение в жизнедеятельности организма, в том числе выполняющих роль физиологических антиоксидантов, что указывает на возможную роль этих соединений в качестве адаптогенов. Протекторные свойства 3-ГП исследовали на модели «старения» митохондрий печени крыс и митохондрий проростков гороха. «Старение» приводило к активации ПОЛ, как в мембранах митохондрий печени, так и в мембранах митохондрий проростков гороха, что нашло отражение в 3-5-кратном увеличении интенсивности флуоресценции конечных продуктов ПОЛ. Введение10^{-5}–10^{-1} 4М 3-ГП в среду инкубации митохондрий приводило к снижению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ до контрольных значений, что могло указывать на способность препарата проявлять протекторную активность в условиях стресса. В качестве стрессового воздействия использовали модель острой гипобарической гипоксии для крыс и модель дефицита воды для 5-дневных проростков гороха. Стрессовые воздействия приводили к активации ПОЛ в мембранах митохондрий печени крыс и митохондрий проростков гороха: интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ возрастала в 3-6 раз. Этот процесс сопровождался снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов. При этом уменьшалась и эффективность окислительного фосфорилирования. Введение крысам 10^{-8} М 3-ГП за 45 минут до воздействия предотвращало активацию ПОЛ и изменения биоэнергетических характеристик митохондрий печени. Отметим, что обработка семян и проростков гороха 10^{-6} М раствором препарата также предупреждала изменения функциональных характеристик митохондрий. Активация ПОЛ в условиях стресса, вызывающая изменения функциональных характеристик митохондрий, отразилась и на физиологических показателях: продолжительность жизни животных в условиях различных видов гипоксии возрастала в 1,8-2,5 раза, а выживаемость – увеличивалась на 12-20%. Более того, препарат предотвращал торможение роста корней и побегов проростков гороха в условиях дефицита воды. Возможно,3-ГП является адаптогеном широкого спектра действия.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА СЕКРЕТИРУЕМЫХ БЕЛКОВ-ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ В СОСТАВЕ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ

А.В. Ткачёва, Г.Ф. Сиволобова, А.А. Гражданцева, Г.В. Кочнева
ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия

Вирус осповакцины (VACV) обладает природными онколитическими свойствами и широко используется для создания на его основе противоопухолевых препаратов. Нами были сконструированы три аттенуированных рекомбинантных штамма VACV со встройками различных трансгенов. Наиболее популярной иммуностимулирующей молекулой для введения в вирусный геном является ГМ-КСФ. Показано, что вирусы, синтезирующие ГМ-КСФ, улучшают инфильтрацию опухолевых узлов цитотоксическими Т-клетками, увеличивают количество нейтрофилов, моноцитов и базофилов в периферической крови. Первый рекомбинантный штамм – VV-GMCSF-dGF, который продуцирует секретируемый биологически активный ГМ-КСФ. Секретируемая форма белка обеспечивает так называемый «эффект соседа», то есть дополнительное цитотоксическое действие на соседние с инфицированной рекомбинантным вирусом клетки внутри опухоли за счет передачи белка через межклеточное пространство. Поскольку известны адъювантные свойства ГМ-КСФ, а также усиление протективных свойств белков в составе химерных конструкций с ГМ-КСФ, был сконструирован второй рекомбинантный вариант штамма VACV − VV-GMCSF/lact-dGF, со встройкой трансгена химерного белка, в состав которого входит ГМ-КСФ, соединенный через гибкий линкер с онкотоксическим пептидом лактаптином. Лактаптин является фрагментом каппа-казеина молока человека и специфически индуцирует гибель клеток рака молочной железы человека *in vitro* и *in vivo*. В экспериментах *in vitro* (на панели опухолевых клеток человека) и *in vivo* (на иммунодефицитных мышах с ксенографтами опухолей молочной железы человека) было показано, что оба рекомбинантных штамма обладают противоопухолевой активностью и селективно реплицируются в опухолевых клетках. Известно, что онколитические вирусы являются идеальным партнером CAR-клеток для преодоления ими множественных внутриопухолевых барьеров. Прямой лизис опухолевых клеток вирусами разрыхляет опухоль и облегчает инфильтрацию CAR-клеток. Третий сконструированный штамм – VV-GMCSF-CXCLII содержит в качестве трансгенов белки ГМ-КСФ и CXCL11, которые являются секретируемыми хемокинами и будут способствовать привлечению в опухоль не только вводимых экзогенно CAR-клеток, но и собственных клеток иммунной системы. *Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-29-09044).*

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ С 2-АЗИДО-9-ЗАМЕЩЁННЫМ ОРЕОЗЕЛОНОМ

К.И. Мосалев
Институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск, Россия

В последнее время активно изучаются фармакологические свойства производного тритерпена лупанового ряда – бетулиновой кислоты, ввиду её выраженных противовоспалительных (José Fernando Oliveira Costa et al., 2014) и противоопухолевых (Sun Y.F., Song C.K., et al., 2013) свойств, и производных линейных фурокумаринов (псораленов), использующихся при лечении аутоиммунных и гиперпролиферативных заболеваний кожи (Juan Jose Serrano-Perezy et al., 2008). Исследование соединения бетулиновой кислоты с фурокумарином (2-азидо-9-замещённый ореозелон) на предмет противовоспалительной и иммуномодулирующей активности с помощью изучения профиля экспрессии цитокинов, даёт представление о механизмах биологической активности данных соединений. Оценка предполагаемых свойств производилась путём проведения серии экспериментов с преддифференцированной клеточной линией U-937 (ATCC № CRL-1593.2), последующего выделения клеточной РНК, постановки реакции обратной транскрипции, количественной ПЦР с детекцией в реальном времени, а также обработки и интерпретации полученных данных. Эффект от воздействия соединения оценивался в зависимости от их дозы и времени от начала воздействия на клеточную культуру U937. После обработки клеточной линии U-937 соединением бетулиновой кислоты с 2-азидо-9-замещённым ореозелоном наблюдались статистически значимые времязависимое повышение уровня экспрессии ИЛ-12 (через 6 часов инкубации с соединением в концентрации 550мкМ – в 1,35 раз, через 24ч – в 1,28 раз по сравнению с контролем без соединения) и дозо- и времязависимое снижение уровня экспрессии ИЛ-10 (через 2 ч инк. с соед. в конц. 550мкМ – в 1,35 раз, через 6ч – в 2,3 раза, через 24ч – 9,2 раза; через 24ч инк. с соед. в конц 60мкМ – в 2,76 раз по сравнению с контролем без соединения). ИЛ-12 известен как цитокин, стимулирующий клеточное звено приобретённого иммунитета. ИЛ-10 поляризует иммунный ответ в гуморальном направлении, активируя В-клетки, и предотвращает гиперактивацию воспаления, частично являясь иммуносуппрессирующим медиатором (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008). Отсюда следует, что данное вещество можно рассматривать в качестве потенциального средства для борьбы с внутриклеточными патогенами (вирусы, микобактерии, хламидии и др.) а также в качестве иммуностимулятора.

ГЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КАК ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ПРИМЕРЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

И.А. Гривенников[1], Е.В. Новосадова[1], Е.Л. Арсеньева[1], С.А. Антонов[1], Ю.Н. Ванюшина[1], Т.В. Малова[1], Л.С. Иноземцева[1], О.В. Долотов[1], С.Н. Иллариошкин[2], Н.Ф. Мясоедов[1], В.З. Тарантул[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]Научный центр неврологии РАМН, Москва, Россия

В настоящее время большое внимание уделяется изучению нервной системы при развитии патологических процессов на разных уровнях, так как подобный анализ позволит получить наиболее полную информацию о функционировании нервной системы в различных условиях и стать основой для формирования новых подходов к терапии тяжелых распространенных неврологических заболеваний. Известно, что нарушения в функционировании клеток глиального ряда могут сопутствовать, либо предшествовать развитию ряда нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона (БП). Длительное нарушение астроцитарных функций может повысить уязвимость дофаминергических нейронов черной субстанции (СН), ускорить

их дегенерацию и повлиять на способность компенсировать частичную дегенерацию на пресимптомных стадиях этого заболевания. В то же время энергетическая поддержка астроцитов является одним из существенных факторов нейрональных компенсаторных механизмов дофаминергической системы и может играть ведущую роль на пресимптомных стадиях БП. Однако исследования вовлеченности глиальных клеток в развитие нейродегенеративных процессов имеют крайне ограниченный характер. В большей степени это связано с невозможностью получения *in vitro* необходимого количества данного типа клеток человека. В нашей работе с использованием технологии репрограммирования из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека были получены культуры глиальных клеток от двух здоровых доноров и трех пациентов с врожденной формой БП (мутации в гене LRRK2 и PARK2). Было показано, что полученные культуры экспрессируют необходимый паттерн мРНК, характерных для астроцитов. Кроме того, полученные клетки окрашиваются специфичными антителами к маркерам глиальных клеток, таких как S-100 и GFAP. Было осуществлено сокультивирование астроцитов и дифференцированных нейронов от здоровых доноров и пациентов с БП и установлено, что полученные глиальные клетки способны поддерживать жизнеспособность нейронов в течение длительного времени. Таким образом, получена удобная модель для изучения взаимодействия астроцитов и нейронов человека на молекулярно-генетическом и клеточном уровнях *in vitro*, а также для тестирования соединений с нейропротекторной активностью. *Работа выполнена при поддержке Программы ФИМТ и РФФИ (проект № 17-04-01661).*

ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ: ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ГЕНА DUSP1

П.А. Сломинский, Е.В. Филатова, И.Н. Власов, М.И. Шадрина
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Депрессия – гетерогенное заболевание, этиопатогенез которого связан с влиянием большого числа факторов, действующих на разных уровнях – психологическом, биологическом, генетическом, социальном. Нами был проведен полнотранскриптомный анализ гиппокампа крыс в модели острого стресса на основе принудительного плавания (FST) с целью поиска транскрипционных изменений, лежащих в развитии стрессорных реакций – причем анализировались как быстрые эффекты (изменения транскрипционного паттерна сразу после FST теста), так и эффекты отложенные (через 24 часа после теста). Для анализа полнотранскриптомных данных был использован разработанный нами пайплайн, эффективность работы которого была проверена с использованием панели данных SEQC II, позволяющей верифицировать результаты работы пайплайна с использование 16 тысяч генов, экспрессия которых измерена при помощи RT-PCR. В итоге были получены списки дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) – генов, имеющих FC>1,5 между экспериментальной и контрольной группой и FDR t-теста не более 0,05. Далее списки ДЭГ были проанализированы с использованием программ Cytoscape 3.6.1 и Pathway Studio V. 11.4. С использованием данного алгоритма оценки ДЭГ они были выявлены только сразу после FST теста – через 24 часа после принудительного плавания транскрипционный паттерн гиппокампа не отличался от контроля. Анализ этих ДЭГов выявил 4 связанных с реакцией на стресс функциональных кластера, связанных с клеточным ответом на стресс. Для дальнейшего анализа было отобрано 3 гена (ген треонин тирозин фосфатазы (Dusp1); ген инсулин-подобного фактор роста 2 (Igf2) и ген комплемента C4B (C4B). Анализ их экспрессии с использованием ПЦР в тканях гиппокампа и лобной коры мозга крыс с моделью острого стресса на основе FST подтвердил данные, полученные для трех отобранных генов при РНК секвенировании. Наиболее выраженные изменения были показаны для гена Dusp1 – причем они были выявлены как на уровне мРРНК, так и на уровне белка. Ранее повышение уровня мРНК DUSP1 примерно в два раза было обнаружено при постмортальном анализе в зубчатой извилине и CA1 гиппокампе у пациентов с депрессией (Duric, 2010). Это позволяет рассматривать ген Dusp 1 как ген, который может быть связан с развитием острого стресса и переходом от стресса к депрессии.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕНУМБРЕ В ПЕРВЫЕ ЧАСЫ ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

С.В. Демьяненко, А.Б. Узденский
Лаборатория «Молекулярная нейробиология», Академия биологии и биотехнологии, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

При ишемическом инсульте окклюзия сосудов быстро вызывает инфаркт ткани мозга. В следующие часы повреждение распространяется и образуется переходная зона, пенумбра, клетки которой можно спасти. Поиск эффективных нейропротекторов, защищающих нейроны, сосредоточен на модуляции процессов внутриклеточной сигнализации, которые регулируют реакции и смерть клеток. Состояние клеток и их реакции также регулируются эпигенетическими процессами, включая метилирование ДНК, метилирование, ацетилирование и фосфорилирование гистонов. При ишемии мозга они также играют важную роль. В докладе рассмотрены современные данные о эпигенетических механизмах повреждения мозга в первые часы после ишемического инсульта. Особое внимание уделено их роли в формировании ишемической пенумбры и данным о фармакологических агентах, способных защитить нейроны и уменьшить степень повреждения мозга. Мы приводим данные об исследовании этих процессов на модели фототромботического инсульта (ФТИ), созданного локальным лазерным облучением коры мозга крыс после инъекции фотосенсибилизатора бенгальского розового. Разные эпигенетические факторы могут вызывать разнонаправленные изменения основных клеточных процессов, и судьба клеток является результатом баланса между ними. Так, метилирование лизина 4 в гистоне H3 (H3K4me) направлено на активацию белкового синтеза в клетках пенумбры, а снижение ацетилирования лизина 9 и фосфорилирование серина 10 в гистоне H3 через 1, 4 или 24 часа после ФТИ могло приводить к снижению синтеза белков в пенумбре. Деацетилирование гистонов является результатом повышения уровня гистондеацетилаз HDAC1 и HDAC2 в ФТИ-индуцированной пенумбре, а также снижения активности гистонацетилтрансфераз. Но мы наблюдали повышение экспрессии гистоацетилтрансфераз HAT1 и PSAF через 24, но не через 1-4 часа после ФТИ. ФТИ стимулировал апоптоз клеток пенумбры через 24, но не 4 часа. Колокализация H3K4me- и HDAC2-позитивных и апоптотических клеток свидетельствует о связи этих белков с развитием апоптоза в клетках пенумбры. Повышение уровня H3K4me,

HAT1 и PSAF могло стимулировать синтез проапоптотических белков. Некоторые ингибиторы гистондеацетилаз могут играть защитную роль при ишемическом инсульте. *Поддержано грантом РНФ №18-15-00110.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИКЛОПРОЛИЛГЛИЦИНА В КАЧЕСТВЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО РЕГУЛЯТОРА HIF-1-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ

Л.Ф. Зайнуллина, Т.В. Иванова, Т.А. Гудашева, Ю.В. Вахитова, С.Б. Середенин
НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия

L-циклопролилглицин (L-ЦПГ) – эндогенный циклический ноотропный дипептид, обнаруженный в мозге крыс, структура которого была предложена в качестве прообраза Пирацетама. В данной работе изучено влияния L-ЦПГ на активность транскрипционного фактора HIF-1, содержание белков HIF1α и HIF-1 пролилгидроксилазы в клетках SH-SY5Y. Показано, что L-ЦПГ увеличивает как базальную, так и стимулированную миметиками гипоксии ДНК-связывающую активность HIF-1. В частности, установлено, что инкубация клеток SH-SY5Y с L-ЦПГ (100 мкМ, 24 ч) приводила к повышению ДНК-связывающей активности HIF-1 в условиях нормоксии, в среднем на 40%, а в присутствии агентов ДФО и ДМОГ, стабилизирующих HIF-1α, на 15% и 45% соответственно. Механизм стабилизации кислород-чувствительной субъединицы HIF1α при действии L-ЦПГ может включать как ингибирование HIF-1 пролилгидроксилазы, на что косвенно указывают данные, полученные с использованием репортера ODD-Luc, так и позитивный эффект соединений на уровень белка HIF1α, о чем судили по результатам вестерн-блот анализа. В совокупности результаты исследования свидетельствуют о модулирующем влиянии L-ЦПГ в отношении HIF-1 – зависимого пути. Для выявления возможного митогенного действия L-ЦПГ оценивали его влияние на пролиферативную активность клеток. Показано, что L-ЦПГ не оказывает влияния на жизнеспособность клеток SH-SY5Y и на относительный уровень маркёра пролиферации Ki-67. Анализ прогрессии клеточного цикла показал, что L-ЦПГ вызывает уменьшение количества клеток в S-фазе (через 72 ч инкубации) с их возрастанием в фазе G1 через 48 и 72 ч. Способность L-ЦПГ снижать содержание клеток в S-фазе была подтверждена анализом инкорпорации в ДНК модифицированного аналога нуклеотида EdU. Кроме того, L-ЦПГ статистически значимо снижает долю клеток в фазе subG0 и приводит к снижению ранних апоптотических событий. Таким образом, в совокупности полученные результаты свидетельствуют об отсутствии у L-ЦПГ собственной митогенной активности и снижать уровень спонтанного апоптоза. *Работа поддержана грантом Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Исследование линейных и замещенных пролин-содержащих пептидов в качестве низкомолекулярных регуляторов HIF-1–зависимых процессов».*

ПОТЕРЯ ФУНКЦИИ БЕЛКА TDP-43 АКТИВИРУЕТ СБОРКУ ПАРАСПЕКЛОВ ПРИ БОКОВОМ АМИОТРОФИЧЕСКОМ СКЛЕРОЗЕ

М.С. Кухарский[1,2], Т.В. Шелковникова[2]
[1]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, МЗ РФ, Москва;
[2]Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия

Длинная некодирующая РНК NEAT1 является основой для сборки внутриядерных структур параспеклов, функции которых связывают с РНК процессингом и регуляцией экспрессии ряда генов. Одним из компонентов параспеклов является белок TDP-43, агрегация которого является также основным гистопатологическим маркером бокового амиотрофического склероза (БАС). Более того, при БАС обнаруживается образование параспеклов в нейронах спинного мозга. Целью данной работы являлось оценить влияние нарушения функции TDP-43 на сборку параспеклов. Формирование параспеклов в образцах спинного мозга пациентов с БАС было проанализировано методом RNA-FISH, а также методом qRT-PCR. Для моделирования потери и усиления функции белка TDP-43 использовали метод нокдауна гена с помощью миРНК и экспрессию экзогенного белка. В качестве модельных систем использовались стабильные клеточные линии, первичные культуры нейронов мыши и нейроны дифференцированные из эмбриональных клеток человека. В результате было показано, что образование параспеклов в нейронах спинного мозга, а также в клетках глии, наблюдается как в образцах от пациентов со спорадическими, так и семейными формами БАС. В культуре клеток потеря функции TDP-43 усиливала сборку парспеклов, в то время как его накопление в цитоплазме или агрегация не оказывала никакого эффекта. Снижение уровня TDP-43 приводило к накоплению в клетках двухцепочечных РНК (дцРНК) и, как следствие, к активации ответа интерфирона I типа. Более того, обработка клеток интерфероном бета сама по себе способна активировать сборку параспеклов. Одновременный нокдаун TDP-43 и NEAT1 приводил к активации маркеров апоптоза. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что образование в клетках параспеклов носит протективный характер при нарушении метаболизма мкРНК/дцРНК. Наши данные демонстрируют один из возможных механизмов накопления параспеклов в нейронах при БАС и указывают на возможность их использования в качестве потенциальных мишеней для терапии БАС, а также других заболеваний с нарушенным метаболизмом мкРНК и дцРНК. *Исследование поддержано грантом РНФ (№ 18-15-00357).*

ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЕМА СОМЫ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ГЛУТАМАТА

Р.Р. Шарипов[1], И.А. Красильникова[2], В.Г. Пинелис[2], А.М. Сурин[1,2]
[1]НИИ общей патологии и патофизиологии Москва; [2]Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей МЗ РФ, Москва, Россия

Предложен метод оценки объёма сомы нейронов одновременно с измерениями внутриклеточной концентрации Ca^{2+} с помощью двухволновых индикаторов Fura2 и Fura-FF. Введение: Глутамат (Glu) – основной возбуждающий нейромедиатор ЦНС. В патологических случаях, таких как черепно-мозговая травма, ишемия и инсульт, в области поражения Glu достигает высоких концентраций, вызывая повреждение и гибель нейронов и глиальных клеток [Khodorov, 2004; Verkhratsky, Kirchhoff,

2007]. В результате действия Glu значительно повышается внутриклеточная концентрация Na+ [Kiedrowski et al., 1994; Gerkau et al., 2017] и развивается отсроченная кальциевая дизрегуляция (ОКД) [Nicholls, Ward, 2000; Khodorov, 2004]. Эти изменения ионного состава увеличивают осмотическое давление цитозоля, меняя форму и объём сомы. Материалы и методы: Первичные культуры нейронов мозжечкаа крыс готовили, как описано в работах [Khodorov et al., 2012]. Динамику изменений внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]i$) измеряли с помощью двухволновых красителей Fura-2 или Fura-FF, используя систему анализа изображений на основе инвертированнного флуоресцентного микроскопа Olympus IX-71 с объективом 20x/N=0.70. Результаты: Псевдо-изобестическую точку возбуждения флуоресценции Fura-2 или Fura-FF получали путём сложения сигналов этих индикаторов при возбуждении 340 и 380 нм, подбирая множитель для сигнала при одной из этих длин волн. Этот множитель компенсирует различия во времени экспозиции, интенсивности возбуждающего света, молярной экстинкции индикаторов на 340 и 380 нм [Surin et al, 2000]. Изменения сигнала, модифицированные таким образом, зависят от количества индикатора в цитозоле, изменений фокусного расстояния и формы сомы. Сохраняя постоянство первых двух факторов, удалось проследить динамику изменений площади и объема нейронов при развитии ОКД. Контур сомы клеток очерчивали с помощью программы ImageJ. Выводы: Предложенный метод позволяет, используя двухволновой индикатор Fura-2 (или Fura-FF), одновременно с измерениями $[Ca^{2+}]i$ отследить относительные изменения объема клеток. Значимость этого параметра очевидна, поскольку от объема клеток зависят концентрации компонентов, а значит и клеточный метаболизм. *Исследование поддержано грантами РНФ 17-15-01487 (измерения $[Na^{+}]i$) и РФФИ-КОМФИ 17-00-00106.*

LIFE AT THE TIP OF A NANOPIPETTE

Pavel Novak, Andrew Shevchuk, Peter Gorelkin, Alexandr Erofeev, Yuri Korchev
Imperial College London, London, UK, ICAPPIC Ltd., London, UK; National University of Science and Technology (MISiS), Russian Federation

Pipettes, in one form or another, have been used for sampling and transferring liquids in biology and chemistry for almost three centuries. The functionality of this rather simple tool has been dramatically expanded with miniaturisation of the pipette tip down to nanometre scale, and invention of scanning ion conductance microscopy (SICM). SICM uses ion current flowing out of the tip of a glass nanopipette (pipette with tip diameter <100 nm) filled with electrolyte to detect presence of a surface in a noncontact fashion. By scanning the sample in x-y plane and moving the nanopipette up and down on the z-axis the SICM recreates 3D topography image of the sample surface. We have shown that scanning nanopipettes are capable of reproducing 3D topography of complex, soft, live biological samples such as neuronal networks or inner ear hair cells [1] at resolution better than atomic force microscopy [2]. We have successfully combined scanning nanopipettes with principles of electrophysiology, fluorescence microscopy, electrochemistry, electrophoresis, and electroosmosis to investigate single channels and receptors in cellular membranes, to deliver biomolecules to precisely defined locations in cell cultures [3,4], and to perform single cell analysis [5]. With recent progress in nanopore-based biosensing and sequencing, and also nanopipette-based 3D printing we are only just beginning to open a new window into the life at nanoscale and realising new possibilities for engineering of interfaces between single cells and man-made electronics for therapeutic and diagnostic purposes or synthesis of entirely novel bioelectrical circuits.

1. Novak, P. et al. Nat. Methods 6, 279–281 (2009).
2. Seifert, J., Rheinlaender, J., Novak, P., Korchev, Y.E. & Schäffer, T.E. Langmuir 31, 6807–6813 (2015).
3. Novak, P. et al. Neuron 79, 1067–1077 (2013).
4. Babakinejad, B. et al. Anal. Chem. 85, 9333–42 (2013). 5. Actis, P. et al. ACS Nano 8, 875–884 (2014).

ADDUCTOMICS: A POWERFUL TOOL FOR HUMAN EXPOSOME ASSESSMENT

H. Grigoryan, S.M. Rappaport
School of Public Health, University of California, Berkeley, California, 94720, United States

Biologically active chemicals enter the body from inhalation and ingestion of xenobiotic substances and are generated endogenously by human and microbial metabolism, oxidative stress, lipid peroxidation, and other processes. Evidence that the risks of acquiring chronic diseases are driven largely by diverse exposures rather than heritable genetic factors has generated interest in the “blood exposome” for studies of disease ethology. By comparing exposomes in blood from diseased and healthy subjects, discriminating features can be identified and then targeted for follow-up. An understudied class of exposures includes reactive electrophiles that are generated from metabolic processes. These electrophilic molecules are potentially toxic because they react with nucleophilic sites in DNA and proteins to produce mutations and post-translational modifications, respectively, and their degradation and partitioning behaviours can contribute to reactive toxicity. Although reactive electrophiles cannot generally be measured in vivo, due to their short life-spans, the systemic concentrations of these reactive chemicals have been estimated from targeted studies of their modifications with blood proteins, notably Cys34 of human serum albumin. In fact, Cys34 is the only free thiol in blood and represents a nucleophilic hotspot that accounts for about 80% of the antioxidant capacity of serum. Although targeted assays can relate Cys34 adducts to specific targeted exposures, they are not well suited for discovering unknown causes of human diseases arising from exposures to all electrophilic species. With this in mind, we developed an **untargeted** assay for Cys34 modifications that we refer to as “Cys34 adductomics”. We validated our adductomics methodology with archived serum/plasma from healthy smoking and non-smoking subjects and subsequently applied it to populations with and without high exposures to indoor combustion products or benzene, to subjects with and without lung or heart disease, and patients with colorectal and blood cancers. This led to discovery of over 120 adducts, several of which were significantly associated with particular exposures, chronic diseases or cancer type. Some associations had been anticipated; for example, adducts of two prominent constituents of cigarette smoke – ethylene oxide and acrylonitrile – were more abundant in smokers. Also, as expected, adducts of reactive benzene metabolites as well as reactive oxygen and carbonyl species were associated with occupational exposure to benzene. However, contrary to our initial expectations, smoking and the presence of chronic lung and heart disease were associated

with lower levels of Cys34 oxidation products; a result that we suspect was caused by chronic hypoxia in these populations. These results highlight the ability of Cys34 adductomics to discover potentially important health risks arising from reactive electrophilic intermediates generated by diverse human exposures.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ПОДХОДА В ОПРЕДЕЛЕНИИ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКАХ ПАЦИЕНТОВ С ПЫЛЬЦЕВОЙ АЛЛЕРГИЕЙ

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

Аллергические заболевания стали серьезной проблемой человечества и по прогнозу ВОЗ в XXI веке выйдут на первое место по распространенности в структуре заболеваний. Растительные липид-транспортирующие белки и гомологи основного аллергена пыльцы берёзы Bet v 1 являются важнейшими классами аллергенов, участвующих в развитии аллергических реакций различной степени тяжести на пищевые продукты и пыльцу. Из-за широкой перекрестной реактивности данные белки являются мажорными аллергенами этих двух классов белков и основными сенсибилизаторами иммунной системы человека, вызывающими развитие реакций гиперчувствительности на растительные пищевые продукты и пыльцу. В данной работе были исследованы сыворотки пациентов (n=48) Московского региона с аллергией на пыльцу деревьев и сорных трав. Из их числа были отобраны сыворотки 15 пациентов, имеющих специфические антитела класса IgE к Bet v 1 и/или Pru p 3. Было показано, что почти у трети пациентов в сыворотках присутствовали антитела IgE к Bet v 1 и Pru p 3, что свидетельствовало о клинически значимой роли этих аллергенов в сенсибилизации пациентов Московского региона. Таким образом, данные рекомбинантные аллергены могут быть использованы для компонентной аллергодиагностики и специфической иммуннотерапии у пациентов Московского региона. Следующим этапом работы стало определение в сыворотках пациентов, содержащих специфические антитела класса IgE к аллергенам Bet v 1 и Pru p 3, целого ряда цитокинов, ассоциированных с развитием и клинической манифестацией аллергических реакций: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN-γ, TNF-α и TNF-β. С этой целью был выбран мультиплексный подход на основе технологии xMAP® (Luminex®). Подобранная нами панель “MILLIPLEX® MAP kit” (HCYTOMAG-60K-09, Merck) позволила оценить уровни содержания 9 цитокинов одновременно в каждом образце сыворотки. С использованием данного подхода установлено, что у пациентов с аллергией на пыльцу часто наблюдается TH2-тип иммунного ответа, хотя в некоторых случаях имеют место более редкие механизмы развития аллергических реакций, такие как TH17, смешанный TH1/TH2 или Treg. Полученные данные указывают на необходимость анализа индивидуального механизма развития аллергической реакции у конкретного пациента для дальнейшего подбора персонализированной схемы лечения.

CONJUGATES OF NANOPARTICLES WITH BIORECEPTORS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND APPLICATION IN RAPID TESTS FOR MEDICAL DIAGNOSTICS

B.B. Dzantiev
A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

In modern medical diagnostics, the use of bioreceptors conjugated with nanoparticles, tools separating components of the samples to be tested and generating a detectable signal, is of great importance. In this report, the properties of conjugates of antibodies and aptamers with such nanodispersed carriers and markers as colloidal gold, magnetite particles, quantum dots that are the most widely used in analytical systems are considered. On the basis of experimental data and analysis of mathematical models, the relationship between the optical characteristics of nanoparticles, the receptor-ligand binding affinity and the minimum theoretically achievable limits of detection for analytical systems using these reagents and labels has been determined. A set of parameters is established for a priori assessment of analytical capabilities for candidate reagents and labels. The conjugates of gold nanoparticles having various sizes and shapes with bioreceptors are compared; the effect of these parameters as well as the composition of the conjugates on their affinity is analyzed. Methods are proposed for assessing the properties of conjugates, including fluorimetric determination of their composition, analysis of their size and surface modification using transmission electron and atomic force microscopy. The preservation of antibodies reactivity after adsorption, covalent and bioaffine immobilization is investigated. Conditions for the formation of mono- and multilayers of bioreceptors for adsorption binding are established. The aggregation processes provided by the interactions of functionalized nanoparticles (antigen-antibody, biotin-streptavidin and other reactions) and resulted in an amplification of the analytical signal are considered. The effectiveness of the aptamer – gold nanoparticle complexes in homogeneous assays with the registration of fluorescence polarization is shown. Test systems based on membrane flow assay and polarization fluorescence assay and implemented using nanoparticle-receptor conjugates of optimum composition were successfully applied to sensitive detection of antibiotics, cardiac and inflammatory markers, bacterial and viral pathogens of gastrointestinal tract.

This work was supported by the Russian Science Foundation, project No. 19-14-00370.

«ЛАБОРАТОРИЯ НА ЧИПЕ»: ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА

И.Н. Курочкин
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

Глобальным технологическим трендом в области молекулярной диагностики является расширение спектра биоаналитических методов, основанных на комплексном использовании биосенсорных и микрофлюидных технологических платформ. Развитие этих платформ в области биомедицинских применений связано с созданием быстрых и мультиплексных (мультимодальных) иммунологических, ДНК-специфических и клеточных систем, основанных на использовании миниатюрных оптических

детекторов. С развитием спектроскопических методов, возрос интерес к применению спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) в биоаналитических исследованиях. Именно поэтому сейчас пристальное внимание уделяется созданию тандемных ГКР-технологий, объединяющих регистрацию сигнала и сепарацию или концентрирование бактериальных агентов для быстрой и высокочувствительной регистрации в формате микрофлюидных систем типа «лаборатория на чипе». В докладе рассмотрены возможности диагностической система на основе микрофлюидных технологий, позволяющей проводить быстрый анализ белковых маркеров. Тест-система представляет собой роботизированное устройство-манипулятор с интегрированными микрофлюидными чипами. Формат анализа основан на использовании иммунного разделения белковых маркеров на магнитных частицах и регистрации сигнала КР и ГКР с усиленным на наночастицах серебра. Система позволяет проводить диагностику по одной капле крови в течение нескольких минут. Уже сейчас прототип тест-системы способен определять в исследуемом образце маркеры острого инфаркта миокарда. В перспективе можно будет анализировать до 25–50 параметров крови, что позволит получить информацию о заболеваниях, связанных с обменными и воспалительными процессами, о состоянии иммунитета, а также для экспресс-определения антибиотикорезистентности клинических изолятов бактериальных патогенов. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 16-14-00209-П и Гос. задания «Физико-химические основы высокочувствительных биоаналитических процессов и создание новых сенсорных материалов».*

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ НА БИОЧИПАХ ДЛЯ КОНТРОЛЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТНОСТИ БАКТЕРИЙ

А.А. Филиппова, М.Ю. Рубцова, Г.В. Преснова, Н.В. Добрякова, М.М. Уляшова, А.М. Егоров
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Значительный рост распространенности мульти- и пан-резистентных к антибиотикам бактерий является существенной проблемой здравоохранения. Наиболее распространенной является устойчивость к бета-лактамным антибиотикам, обусловленная продукцией бактериальных бета-лактамаз. Бактерии с множественной устойчивостью имеют, как правило, несколько генов бета-лактамаз. Целью данной работы являлась разработка метода определения уровня экспрессии генов бета-лактамаз с использованием клеток *E.coli* – продуцентов бета-лактамаз TEM типа. Разработанный метод состоит из последовательных стадий культивирования клеток, выделения общей РНК, получения первой цепи кДНК в реакции обратной транскрипции (ОТ), амплификации генов бета-лактамаз и контрольных генов в ПЦР с введением биотиновой метки, гибридизации полученной ДНК на биочипах с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена. Нами оптимизированы: методика выделения и очистки РНК, условия проведения мультиплексных реакций ОТ и ПЦР, гибридизационного анализа. Выбраны контрольные гены на основе гена «домашнего хозяйства» rpsL и фрагмента рибосомальной 16S РНК. Проведен дизайн олигонуклеотидных зондов для идентификации на биочипах генов бета-лактамаз и контрольных генов с высокой чувствительностью и хорошим диапазоном значений аналитического сигнала, в качестве которого используется интенсивность окрашивания зон биочипа. Показано, что уровень экспрессии контрольных генов линейно коррелирует с количеством клеток, что используется для нормировки значений аналитических сигналов гибридизационного анализа генов бета-лактамаз и количественного определения уровня экспрессии. Разработанная методика применена для количественного определения экспрессии бета-лактамазы TEM-1 клетками *E. coli* в диапазоне концентраций 3×10^6–2×10^8 КОЕ/мл. Хороший динамический диапазон значений аналитических сигналов позволил достоверно разделить уровень экспрессии бета-лактамаз на три: высокий, средний и низкий. Определяемые уровни коррелируют с концентрацией мРНК специфических генов. Также была показана корреляция определяемых уровней экспрессии гена бета-лактамазы TEM-1 с активностью этого фермента при гидролизе ампициллина в периплазматических фракциях клеток. *Работа выполнялась при поддержке РНФ (Проект № 15-14-00014-П).*

СТВОЛОВОЙ ПЕРЕХОД ОПРЕДЕЛЯЕТ СПОСОБНОСТЬ ОПУХОЛИ К МЕТАСТАЗИРОВАНИЮ

Н.В. Литвяков[1], М.К. Ибрагимова[1], М.М. Цыганов[1], Е.М. Слонимская[1], В.А. Бычков[1], О.В. Першина[2], Н.Н. Ермакова[2], И.В. Дерюшева[1], П.В. Казанцева[1], А.В. Дорошенко[1]
[1]НИИ онкологии Томского НИМЦ; [2]НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, Томск, Россия

Нами было выдвинуто предположение о том, что опухоль может метастазировать, когда ее клетки становятся способными к переходу из дифференцированного состояния в стволовое (non-CSCs to CSCs) – стволовому переходу. Феномен стволового перехода был ранее показан во многих исследованиях и происходит при эктопической экспрессии генов стволовости, таких как OCT3, SOX2, KLF4, c-MYC, NOTCH, NANOG, LIN28. Приобретение способности к эктопической экспрессии генов стволовости и, соответственно к стволовому переходу, по нашему мнению, обусловлено амплификацией следующих регионов их локализации (3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p,10q21.1, 16p, 18chr, 19p). Нами было показано значение амплификаций генов стволовости для метастазирования и стволового перехода. На выборке более 9 тыс пациентов разных локализаций (по данным проекта TCGA) показано высокая корреляция (R=0.733, p=0.0008) частоты амплификаций генов стволовости при разных локализациях со смертностью при данных локализациях по данным GLOBOCAN 2018. Это свидетельствует об универсальной прогностической значимости амплификаций генов стволовости при разных локализациях. Появление амплификаций регионов локализации генов стволовости в процессе НАХТ или наличие 2 и более в остаточной резидуальной опухоли ассоциировано с драматически высокой частотой метастазирования (92% и 52% соответственно). При отсутствии амплификаций или при 1 амплификации в опухоли после НАХТ ни у одного больного не развились метастазы. Элиминация опухолевых клонов с амплификациями генов стволовости при помощи НАХТ также приводит к 100% безметастатической выживаемости. Первичные культуры $EpCam^+$ опухолевых клеток от больной с амплификациями генов стволовости обладает высокой пролиферативной активностью. Под действием ИЛ6 в этой популяции клеток отмечается увеличение содержания $EpCam^+CD44hiCD24^-$/low и

снижение EpCam$^+$CD44 lowCD24-субпопуляций опухолевых стволовых клеток, а также образование маммосфер. У первичных культур EpCam$^+$ опухолевых клеток от больной без амплификаций генов стволовости таких эффектов не было. Результаты проспективного исследования показали, 100% безметастатическую выживаемость у больных без амплификаций генов стволовости в опухоли, даже если у них не проводиться предоперационная химиотерапия. *Работа поддержана грантом РНФ 17-15-01.*

РОЛЬ РЕДОКСИНОВ И АДАПТИВНОГО АНТИОКСИДАНТНОГО ОТВЕТА В РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССАХ ФОРМИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, М.Д. Новичкова, Н.К. Нурмурадов
Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Редокс-зависимые механизмы лежат в основе регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Значительный вклад в поддерживание клеточного редокс-гомеостаза вносит активность важных для клеточного редокс-контроля ферментных систем – тиоредоксин/тиоредоксинредуктаза (Trx/TrxR), пероксиредоксин/тиоредоксин (Prx/Trx), осуществляющих тиолдисульфидный регуляцию. Представленные в данной работе результаты демонстрируют существенные изменения в экспрессии генов, связанных с антиоксидантной защитой, при формировании резистентности к цисплатину (цис-диаминдихлорплатина, CDDP) клеточных линий различного генеза: эритролейкемии K562, аденокарциномы яичника SKOV-3 и аденокарциномы молочной железы MCF-7. Установлено, что повышение внутриклеточного содержания GSH у резистентных к цисплатину клеток K562/CDDP, MCF-7/CDDP и SKOV-3/CDDP связано с скоординированным ростом экспрессии генов ключевых ферментов синтеза GSH de novo – g-глутамилцистеинсинтетазы (каталитической и регуляторной субъединиц) и глутатионсинтетазы. В резистентных клетках K562/CDDP и MCF-7/CDDP этот эффект усиливался повышением экспрессии гена g-глутамилтрансферазы. Рост соотношения GSH/GSSG в процессе развития лекарственной устойчивости опухолевых клеток наблюдался наряду с повышением активности как Trx/TrxR, так и Prx/Trx системы в результате значительного роста экспрессии генов TRX1, TRX2, TRXRD1, TRXRD2, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX6, что происходило при одновременном повышении экспрессии генов ключевых антиоксидантных ферментов (SOD2, CAT, GPX1, HO-1) и, напротив, снижения экспрессии гена изоформы NADPH-оксидазы NOX5. Скоординированному характеру изменения экспрессии генов, контролирующих клеточный редокс-статус, может способствовать рост экспрессии гена редокс-зависимого транскрипционного фактора Nrf2, уровни мРНК и внутриклеточного содержания белка которого были значительно повышены в резистентных клетках. Полученные результаты свидетельствуют в пользу роли Trx/TrxR и Prx/Trx систем в развитии адаптивного антиоксидантного ответа как важного редокс-зависимого механизма формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток к цисплатину, обладающему прооксидантным действием. *Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».*

РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В МЕТАСТАЗИРОВАНИИ: ОМИКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Н.Л. Миронова, Л.А. Алексеева, А.В. Сенькова, М.А. Зенкова
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Накоплено множество данных, указывающих на участие внеклеточных ДНК и РНК (внДНК и внРНК) в трансформации нормальных клеток и усилении миграции опухоли. На уровне организма опухоль осуществляет свою диссеминацию за счет: перепрограммирования здоровых клеток путем трансфекции внДНК опухолевого происхождения (Garcia-Olmo et al, 2000); паракринной регуляции с участием миРНК (Dalmay et al, 2006); укрепления нейтрофильных ловушек путем встройки опухолеспецифических внДНК (Jiménez-Alcázar et al, 2015). Проведенные ранее исследования показали, что нуклеазы могут быть использованы для поиска мишеней среди циркулирующих внРНК и внДНК как инструмент неприцельного действия, разрушающий нуклеиновые кислоты в кровотоке, вносящие вклад в прогрессию опухоли и метастазирование (Mironova et al, 2013; Alekseeva et al, 2017). В данной работе на модели карциномы легких Льюис проводили в кровотоке поиск внРНК и внДНК, имеющих значение для развития опухоли. На основе данных NGS получали панели внРНК и внДНК, которые далее использовали для сравнения с помощью ПЦР в реальном времени профилей миРНК и внДНК из крови животных с экспериментальными опухолями различного гистогенеза. Среди циркулирующих миРНК, вносящих вклад в прогрессию опухолей, были обнаружены миРНК miR-107, miR-155, miR-21, miR-10b, miR-145, miR-451a, miR-29b1, miR-17 и miK-18a. Оказалось, что из циркулирующих внДНК основной вклад в метастазирование вносят 224 типа тандемных повторов, включающие SINE и LINE элементы, а также фрагменты онкогенов Hmga2, Myc и Jun. Прогрессирование опухолей различного гистогенеза (карциномы легких Льюис, меланомы B16 и лимфосаркомы RLS40 мыши) сопровождалось увеличением уровня SINE и LINE элементов в пуле внДНК, а в случае меланомы увеличением также уровней нескольких миРНК из выявленной нами панели. Полученные результаты показали, что выявленные миРНК и SINE и LINE элементы являются важными участниками метастазирования и могут быть использованы в качестве новых мишеней для контроля прогрессирования опухоли под действием терапевтических нуклеиновых кислот, а также маркеров ответа на проводимую терапию. *Работа выполнена при финансовой поддержке Проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8 и РНФ 19-74-30011.*

РОЛЬ ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ ИЛИ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ ЖИДКОСТИ В ФОРМИРОВАНИИ И РЕГУЛЯЦИИ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Т.А. Штам[1,2], С.Н. Нарыжный[1,4], А.В. Волницкий[1], Р.Б. Самсонов[2,3], А. Копылов[4], Е. Петренко[4], Я.А. Забродская[1], Р.А. Камышинский[5], А. Буздин[6], А.В. Малек[2,3]

[1]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова, НИЦ "Курчатовский институт", Гатчина; [2]НМИЦ онкологии им.Н.Н. Петрова МЗ РФ, Санкт-Петербург; [3]ООО «Онкосистема», Сколково; [4]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича", Москва; [5]НИЦ "Курчатовский институт», Москва; [6]Институт биоорганической химии им М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В течение последних лет заметно возросла активность изучения роли экзосомальной системы межклеточных коммуникаций в процессе метастазирования. Однако, на сегодняшний день общая картина молекулярных "экзосомальных" механизмов метастазирования далека от полноты. Экзосомы – это мембранные везикулы (30–150-нм), секретируемые клетками и выполняющие роль системы межклеточного транспорта веществ и информации. Представленное исследование направлено на оценку роли неопухолевых экзосом плазмы крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) на метастатические свойства клеток рака молочной железы (РМЖ) и глиобластомы, а также на определение молекулярных механизмах такого влияния. В ряде *in vitro* и *in vivo* экспериментов показано, что экзосомы, выделенные из плазмы крови здоровых доноров, повышают инвазивный потенциал клеток РМЖ. Для определения механизма, который лежит в основе стимулирующего действия экзосом на клетки РМЖ, использовали мягкую обработку экзосом трипсином для удаления поверхностных компонентов; сравнение инвазивных характеристик клеток РМЖ после инкубации с обработанными и необработанными экзосомами; идентификацию белков методами сравнительного протеомного анализа. В работе показано, что контакт с экзосомами плазмы крови здоровых доноров изменяет адгезивные характеристики и двигательную активность опухолевых клеток РМЖ. Этот стимулирующий эффект опосредуется взаимодействием между поверхностными экзосомальными белками и клетками РМЖ. Поверхность циркулирующих экзосом экранирована белками плазмы, являющихся стимуляторами запуска ряда сигнальных путей, среди которых сигнальный путь фокальной адгезионной киназы (FAK). Knock-down FAK-киназы в клетках РМЖ значительно ослаблял их реакцию на стимуляцию экзосомами. Кроме того, в работе проведена оценка влияния условно «нормальных» экзосом ликвора на инвазивные свойства ряда глиобластом в системе *in vitro*. Наблюдаемый эффект, который оказывают экзосомы СМЖ на миграционную и пролиферативную способность клеток глиом является избирательным в зависимости от клеточной линии и зависит от профиля экспрессии генов глиальных клеток. В целом, представленные результаты указывают на значимость наноразмерных компонентов внутренней среды организма на процесс развития онкологического заболевания. *Работа поддержана РФФИ 18-015-00289.*

ФЕНОМЕН ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КОНФОРМАЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

К.А. Ефетов

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

Человеческие иммуноглобулины (IgG) исследовались методом температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии. Анализировалась устойчивость конформации IgG к воздействию неденатурирующей концентрации мочевины (12 %). В качестве критерия устойчивости предложен показатель Ef, представляющий собой отношение числа пертурбируемых температурой тирозиновых остатков в IgG, находящихся в забуференном изотоническом растворе (pH = 7,2–7,3), к этому же параметру после добавления в раствор мочевины. Было обнаружено, что IgG из сыворотки крови больных с онкологической патологией (хронический лимфолейкоз, рак желудка, прямой кишки и другой локализации) характеризуются повышенной устойчивостью (жёсткостью) конформации по сравнению с IgG здоровых людей, у которых показатель Ef составлял 1,6–2,2, в то время как при патологии – 0,9–1,6. Обнаруженный феномен может быть объяснён неспецифическим лигандированием IgG продуктами деградации опухолевой ткани, что было показано в модельных экспериментах при взаимодействии IgG здоровых людей с фосфатидилхолином и амфифильными пептидами.

Исследование жёсткости конформации сывороточных IgG можно рекомендовать при профилактических осмотрах разных групп населения, а также в процессе лечения онкопатологии как критерий его эффективности.

THE SEARCH FOR TARGETS ASSOCIATED WITH TUMOR PROGRESSION AND METASTASES SPREADING AMONG TUMOR AND CIRCULATING miRNAs

I.S. Mohamed[1,2], A. Nadyrova[3], A.V. Sen'kova[1], M.A. Zenkova[1], N.L. Mironova[1]

1Institute of chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia 2Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia 3 Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal (Volga-Region) University, Kazan, Russia

Exogenous ribonucleases (RNases) have potential cytotoxicity on cancer cells due to their ability to cleave RNA and, can be used as tools for search for RNA targets both among intracellular and extracellular coding and non-coding RNA. Here, the miRNA profile of melanoma B16 of mouse was assessed in vitro and in vivo, and exogenous ribonucleases of microbial and mammalian origin were used as tolls for search of tumor-associated miRNAs. In vitro the upregulation of tumor suppressor miRNAs and downregulation of oncomirs was detected upon cell treatment with ribonucleases. In vivo in experimental mice model of drug-resistant lymphosarcoma RLS40 it was shown that microbial ribonuclease caused 3-fold retardation of primary tumor growth and essential decrease in metastases area in the liver. In the tumor tissue of mice bearing RLS40 microbial ribonuclease caused the upregulation of both oncomirs and tumour-suppressor microRNAs, including microRNAs of the let-7 family, known to negatively regulate tumor progression. While in the blood serum of mice bearing RLS40, microbial ribonuclease caused the decrease of oncomir levels and increase in tumor-suppressor microRNAs (let-7 family). In conclusion, as tools for search for miRNA among oncomirs overexpressed upon tumor progression these

two exogenous ribonucleases can be used both as promising antitumor therapeutics and that can be targeted by antisense oligonucleotides or their derivatives. *This work was supported by Russian State funded budget project of ICBFM SB RAS # AAAA-A17-117020210024-8 and grant RSF 19-74-30011.*

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ ДНК И КОНТРОЛЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА С ДЛИТЕЛЬНОСТЬЮ ВРЕМЕНИ БЕЗ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ РАКА ЯИЧНИКОВ ПОСЛЕ ПЛАТИНОСОДЕРЖАЩЕЙ ХИМИОТЕРАПИИ

Т.М. Заварыкина[1], А.С. Тюляндина[2], П.К. Бреннер[1,3], М.А. Капралова[1,3], М.В. Аткарская[1], Д.С. Ходырев[4], А.М. Бурденный[1,5], В.И. Логинов[5], М.Б. Стенина[2]

[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; [2]Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина МЗ РФ; Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина; [4]ФКНЦ специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА; [5]НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

Рак яичников (РЯ) занимает ведущее место среди онкогинекологических заболеваний. Основу химиотерапии (ХТ) при РЯ составляют производные платины, поэтому поиск маркеров чувствительности к платиносодержащей ХТ является важной задачей. Целью работы было исследование молекулярно-генетических маркеров ряда генов репарации ДНК и контроля клеточного цикла и их связи с длительностью времени без прогрессирования (ВБП), которое является суррогатным клиническим маркером чувствительности к производным платины при РЯ. Были изучены образцы опухолевой ткани 31 больной распространенным РЯ (II–IV стадии). Забор образцов проводился до начала ХТ при первичной циторедуктивной операции, после чего больные получили стандартную ХТ на основе препаратов платины в комбинации с паклитакселом. Далее больные наблюдались до прогрессирования заболевания. Полиморфные маркеры Gln399Arg гена XRCC1, Lys751Gln гена ERCC2, Arg72Pro гена TP53, T(-410)G гена MDM2, Ser31Arg гена CDKN1A и мутация 5382insC гена BRCA1 были исследованы методом ПЦР-ПДРФ с подтверждением результата методом ПЦР в реальном времени с последующим анализом кривых плавления продукта ПЦР. Метилирование промоторных регионов генов BRCA1 и TP53 было изучено в 19 парных образцах крови и опухолевой ткани с использованием метода бисульфитной конверсии и последующей метил-специфичной ПЦР в реальном времени. Результаты определения маркеров были сопоставлены с длительностью ВБП. Выявлена тенденция к статистически значимому увеличению медианы ВБП при носительстве аллеля Gln маркера Gln399Arg XRCC1 (p=0.07), а также к уменьшению медианы ВБП при носительстве аллеля G маркера T(-410)G MDM2 (p=0,06). Были обнаружены тренды к уменьшению значений медианы (M) ВБП при носительстве минорных аллелей маркеров Lys751Gln ERCC2 (M(Gln+)=14,1, M(Gln-)=18,3мес.) и Arg72Pro TP53 (M(Pro+)=11,8 мес., M(Pro-)=17,0 мес.). Выявлено гиперметилирование промотора гена BRCA1 в 3 образцах опухолевой ткани. У всех этих пациентов не был зафиксирован рецидив и наблюдался тренд к увеличению медианы ВБП (18,0 по сравнению с 15,1 мес.). Полученные результаты позволяют говорить о перспективности дальнейшего изучения ряда исследованных маркеров. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-08-01258).*

ПОИСК ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРОГРЕССИИ/ИНГИБИРОВАНИЯ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ: АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ И МЕТАПЛАСТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЯХ

А.А. Пономарева[1], Е.В. Денисов[1,2], П.А. Гервас[1], О.В. Панкова[1], А.А. Щеголева[1], А.М. Киселев[3], Н.В. Чердынцева[1,2], В.М. Перельмутер[1]

[1]НИИ онкологии Томский НИМЦ, Томск; [2]Томский государственный университет, Томск; [3]Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Плоскоклеточный рак легкого (ПРЛ) возникает в результате прогрессивно развивающихся на фоне хронического воспаления предопухолевых изменений эпителия бронхов, встречающихся изолированно или сочетано друг с другом: базальноклеточной гиперплазии (БКГ), плоскоклеточной метаплазии (ПМ) и дисплазии I–III степеней. Процесс перехода может прерваться на любой стадии, оставаться в стабильном состоянии и далее подвергаться ингибированию или прогрессировать. Причины и механизмы разных «сценариев» изменений бронхиального эпителия в условиях хронического воспаления неизвестны. В связи с этим актуальным является выявление маркеров не только специфичных для БКГ, ПМ и дисплазии I-III степени, но и однозначно прогнозирующих их прогрессию или обратное развитие. Материалы и методы. С помощью лазерной микродиссекции (PALM, Carl Zeiss) из образцов нормальной ткани лёгкого, полученных от больных ПРЛ, были выделены фокусы БКГ (3 образца иБКГ и 3 – пмБКГ) и нормального эпителия (n=6, от тех же пациентов с БКГ). Для приготовления ДНК-библиотек использовали набор Pico Methyl-Seq Library Prep Kit (Zymo Research). Полногеномное секвенирование проводили на приборе HiSeq (Illumina). Результаты. Выявлено 5 383 297 CpG островков, перекрывающихся хотя бы одним ридом между изученными образцами: иБКГ, пмБКГ, нормальный эпителий бронхов. С помощью метода главных компонент, удалось подтвердить схожесть профилей метилирования ДНК между образцами БКГ и нормального эпителия, полученными от одних и тех же пациентов, и кроме того, найти образцы со значительными отличиями в метиломе. С использованием кластерного анализа показана близость образцов БКГ и нормального эпителия в пределах одного и того же случая. Также нам удалось идентифицировать несколько кластеров, в число которых вошли образцы с максимально близким профилем метилирования. В целом, распределение метилирования не значительно различалось между образцами, что говорит о корректности бисульфитной обработки и подготовки библиотек. Выявлено гипометилирование гена SAPCD2, вовлеченного в регуляцию деления опухолевых клеток, и гиперметилирование гена-онкосупрессора ST14 в БКГ по сравнению с нормальным эпителием бронхов. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-29-06002, стипендии Президента РФ (№ СП-1549.2018.4, 2018-2020 гг.*

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO* КОРРЕЛИРУЕТ С ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МАРКЕРАМИ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ПРОГНОЗА И ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

А.В. Сенькова[1], М.А. Колесникова[2], С.А. Таирова[3], Т.И. Поспелова[2], М.А. Зенкова[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [2]Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск;[3]Городской гематологический центр, Новосибирск, Россия

Лейкоз – клональное злокачественное заболевание кроветворной системы, основной формой лечения которого является химиотерапия. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) – нечувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам – является одним из факторов неблагоприятного прогноза для пациентов с лейкозами. Механизмы МЛУ многообразны, однако активация ABC-транспортеров является одной из наиболее частых причин неэффективного лечения. Целью данного исследования была оценка прогностического значения лекарственной чувствительности опухолевых клеток, определенной *in vitro* в момент постановки диагноза, цитогенетических аномалий, связанных с первичной химиорезистентностью и неблагоприятным прогнозом, а также их взаимного влияния для пациентов с острыми лейкозами. Исследование включало 65 пациентов с острыми лейкозами, для которых до начала химиотерапии были определены чувствительность опухолевых клеток к ряду цитостатических препаратов с помощью WST-теста, уровни экспрессии гена MDR1 и P-gp, а также цитогенетические маркеры, связанные с течением заболевания. Далее были разработаны шкалы в соответствии с ответом на терапию, лекарственной чувствительностью или резистентностью опухолевых клеток, МЛУ фенотипом (MDR1/P-gp), а также неблагоприятными генетическими маркерами для последующего корреляционного анализа. У пациентов с острыми лейкозами резистентность опухолевых клеток к цитостатическим препаратам *in vitro* коррелировала с плохим ответом на химиотерапию, высокой экспрессией MDR1/P-gp, а также с наличием цитогенетических нарушений, связанных с опухолевой трансформацией cMYC(8q24), MYB(6q23.3); нарушением подавления опухолевой прогрессии P53(17p13.1), TES(q31); первичной химиорезистентностью RELN(q22), E2A(19p13.3), MLL(11q23.3) и неблагоприятным прогнозом del 5, t(9;22)(q34;q11), EVI1(3q26.2). На основании проведенного анализа предложено использовать оценку чувствительности опухолевых клеток к цитостатическим препаратам *in vitro* до начала химиотерапии как одного из этапов индивидуализации лечения и персонализированного подхода к терапии больных с острыми лейкозами. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №19-74-30011 и проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8.*

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ АНФЕН ВЫЗЫВАЕТ СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ АНТИАПОПТОЗНОГО БЕЛКА BCL-2 И АПОПТОЗ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ЛЬЮИС

Е.М. Миль, В.Н. Ерохин, В.И. Бинюков, А.А. Албантова, А.А. Володькин
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

Как известно, опухолевый процесс характеризуется снижением апоптоза клеток, нарушением баланса в системе про- и антиапоптозных белков семейства Bc1-2. Было изучено воздействие анфена натрия на развитие солидной карциномы Льюис и асцитной саркомы 37 у мышей. Установлено, что анфен, введенный после трансплантации опухолевых клеток в течении 11 суток приводил к 100% торможению развития саркомы 37. 4-х кратное предварительное введение анфена (1 мг/кг) не влияло на развитие карциномы Льюис у мышей. Однако, на последней стадии наблюдалось снижение содержания белка Bcl-2, что можно было связать с усилением апоптоза опухолевых клеток. Как известно, современная химиотерапия опухолей часто базируется на усилении апоптоза раковых клеток, который, как правило, в них подавлен. Одной из стратегий лечения является воздействие на систему белков семейства Bcl-2, которые условно подразделяются на 3 группы. Это белки, содержащие гомологичные последовательности – домены BH 1–4, такие как антиапоптозные Bcl-2, Bcl-XL или проапоптозные BAX и др., а также активаторы и регуляторы BAD, PUMA и др. (имеющие только BH-3 домен). Предполагается, что белок Bcl-2 блокируют протеин BAX, препятствуя его олигомеризации и началу апоптоза. Методом иммуноблоттинга было показано, что после инъекции анфена (10^{-6}M) в суспензию опухолевых клеток карциномы Льюис уровень антиапоптозного белка Bcl-2(мономера и гомодимера) снижался на 80% по отношению к контролю, в течении 1–3 часов и в клетках селезенки белых мышей после 4-кратного введения анфена ($2\text{-}10^{-6M}$). При этом происходит увеличение содержания белков BAD и Bcl-XL. В эксперименте *in vitro* методом флуоресцентной микроскопии с использованием акридинового оранжевого и этидиум бромида (АО/ЭБ) было обнаружено, что анфен (10^{-4}M) в течении 1–3 часов вызывал апоптоз клеток карциномы Льюис. Эти данные свидетельствуют о том, что анфен способен вызывать дисбаланс в системе белков семейства Bcl-2 и процесс апоптоза в клетках по митохондриальному пути. Предложена модель и квантово химический расчет взаимодействия анфена с гидрофобным карманом (домен BH-3) белка Bcl-2.

РОЛЬ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА КОМПОНЕНТОВ СПЛАЙСОСОМЫ В ФОРМИРОВАНИИ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

В.О. Шендер[1,2], П.В. Шнайдер[1], К.С. Ануфриева[1,3], Г.П. Арапиди[1,2,3], И.А. Семенов [1], М.С. Павлюков[2], И.О. Бутенко[1], И.К. Мальянц[1], Г.А. Степанов[4], Е.С. Журавлев[4], Т.В. Григорьева[5], С.Ю. Маланин[5], О.С. Лебедева[1], М.А. Лагарькова[1], В.М. Говорун[2,3]
[1]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [3]Московский физико-технический институт (Государственный университет), Москва; [4]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [5]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Дисрегуляция альтернативного сплайсинга (АС) является характерной особенностью раковых клеток. Во многих работах была показана взаимосвязь между АС и возникновением химиорезистентности. Считается, что белки сплайсосомы выполняют

свои функции преимущественно в клетке. Однако нами впервые было показано, что белки сплайсосомы могут играть важную роль в межклеточной коммуникации. Анализируя парные асциты от одних и тех же пациенток с раком яичника (РЯ) до и после химиотерапии (ХТ), мы показали, что погибающие под действием ХТ раковые клетки способны секретировать компоненты сплайсосомы во внеклеточное пространство в составе внеклеточных везикул. Дальнейшие эксперименты позволили выяснить, что секретомы от погибающих клеток способствовали повышению химиорезистентности реципиентных клеток, усиливали подвижность и приводили к эпителиально-мезенхимальному переходу (ЕМП). С помощью изотопных меток нами было показано, что из всего разнообразия белков, идентифицированных в секретомах раковых клеток после ХТ, именно белки сплайсосомы наиболее активно поглощаются реципиентными клетками. Для установления механизма возникновения химиорезистентности *in vivo* нами был проведен транскриптомный анализ раковых клеток, напрямую выделенных из тех же парных асцитов от пациенток с РЯ до и после ХТ. Выявлено, что в выживших раковых клетках происходила активация сигнальных путей Hedgehog и Wnt, которые способствуют ЭМП и поддержанию высокой способности к метастазированию опухолевых клеток. Анализ генов, затронутых АС, выявил значительное число генов из пути сплайсинга мРНК, а также генов, регулирующих репарацию ДНК и реакцию клетки на стресс. Также было выяснено, что ХТ индуцирует в раковых клетках изменения в сплайсинге 13 из 20 ранее описанных ключевых белков, ассоциированных с ЭМП. Этот результат подтверждает данные, показывающие, что инкубация с асцитами после ХТ повышает химиорезистентность реципиентных опухолевых клеток. Возможно, сплайсинговые факторы, циркулирующие во внеклеточной части асцитов, и изменения в АС, вызванные ХТ, могут «подготовить» раковые клетки к последующему воздействию препарата. Возможно, ХТ, сочетающая препараты группы платины и ингибиторы сплайсосомы, позволит улучшить выживаемость пациенток с РЯ. *Работа поддержана грантами РНФ17-75-20205, РФФИ18-34-00622.*

УЧАСТИЕ НАВИГАЦИОННЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПРОЦЕССАХ НЕЙРО- И АНГИОГЕНЕЗА И ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ

К.А. Рубина[1], Е.В. Семина[1,2], В.Ю. Сысоева[1], А.А. Шмакова[1], К.Д. Рысенкова[1,2], П.С. Климович[1,2], В.А. Ткачук[1,2]
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины; [2]НМИЦ кардиологии МЗ РФ, лаборатория молекулярной эндокринологии, Москва, Россия

В физиологии в последние годы накопились данные о молекулярно-биологических механизмах нейроэндокринной регуляции биоэлектрических процессов в нервной системе, мышечного сокращения, секреции и метаболизма. Однако, принципиально остаются не выяснены ключевые вопросы, определяющие характеристики роста сосудов и нервов в эмбриогенезе и при регенерации, процессы формообразования, формирования границ между органами и тканями, регуляции миграции и обновления клеток в органах и тканях.

В последнее время помимо основных молекул, регулирующих процессы ангио- и нейрогенеза, таких как факторы роста, цитокины и хемокины, внимание привлекают навигационные молекулы, определяющие направление роста сосудов и нервов. Помимо контролирования траектории роста сосудов и нервов в эмбриогенезе и регенерации, навигационные молекулы играю важную роль при патологии.

Т-кадгерин является навигационной молекулой, для которой ранее было обнаружено участие в регуляции нейрогенеза. Во взрослом организме человека максимальная экспрессия Т-кадгерина выявляется в сердечно-сосудистой и нервной системах, повышение его экспрессии характерно для различных патологий. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что Т-кадгерин является молекулой негативного регулирования как при нормальном ангиогенезе, так и при опухолевом неоангиогенезе. Различные нарушения экспрессии Т-кадгерина в сосудах характерны для опухолевой прогрессии новообразований кожи человека и меланомы.

Рецептор урокиназы (uPAR) также относят к навигационным молекулам. Ранее нами было показано участие uPAR в процессах ангиогенеза и ремоделирования сосудов. Нарушение экспрессии или функционирования uPAR коррелирует с расстройствами нервной системы и ассоциировано с некоторыми онтогенетическими патологиями. По нашим данным uPAR экспрессируется на конусе роста аксонов. Блокирование uPAR нарушает миграцию нейрональных клеток в эмбриогенезе, направленный рост аксонов и их ветвление в модельных экспериментах. Урокиназный рецептор оказывается необходим для эффективной регенерации нервов после повреждения.

Понимание фундаментальных вопросов регуляции ангио- и нейрогенеза необходимо как для разработки новых методов в регенеративной медицине, так и для лечения онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-30007).

NET FORMATION IN HEALTH AND DISEASE

Luis Munoz, Martin Herrmann
Department of Internal Medicine 3 – Rheumatology and Immunology, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

Since the first report on neutrophil extracellular traps (NETs) in defense against microbes, their initially positive image has been steadily worsening. Several articles reported favorable disease outcomes when NET formation was abolished or reduced in models of chronic inflammatory diseases. The NET-borne serine proteases and occlusion of vessels and channels by NET aggregates are prone to cause tissue damage, thrombosis, as well as ductal obstruction. I will add new aspects (I) to physiological inducers of NETs (II) on their effects on vascular or ductal occlusions and tissue damage, and (III) on healing and repair.

The ability to form NETs is widespread in mammals. That’s why I argue that NETs play a mainly beneficial, evolutionally recognized role. Now is the time to challenge NET's paradigm as "bad guys". Instead, I consider neutrophils and NETs to be often altruistic defenders of our health orchestrating the dissolution of inflammation and initiating the healing process.

Originally described as a mechanism for bacterial sequestration and killing, alternative functional properties of NETs have become the focus of both basic and clinical researchers. From today's perspective, NETs (I) kill bacteria and hyphal fungi (II) degrade soluble

proinflammatory mediators (III) immobilize crystals and (IV) orchestrate the resolution of neutrophilic inflammation. However, NETs (I) cause or precipitate thrombotic events (II) clog vessels and ducts (III) act as a potential autoimmunogen (IV) cause interferon-induced inflammation (V) serve as an antigen for interfering immune complexes and (VI) promote the initiation and growth of gallstones.

Among the immune cells, allegedly all granulocytes, mononuclear phagocytes and mast cells share the characteristic of externalizing chromatin. Macrophages externalize DNA from phagocytosed apoptotic prey; However, the DNA is relatively small and does not form NET-like structures. Reports of ETs from other cells, such as epithelial cells, are anecdotal and require further confirmation.

Granulocytes like neutrophils also respond to endogenous hazard and damage signals such as various crystals and immune complexes. Impaired ability to remove NET residues contributes to the chronicity of inflammation. In this case, NETs can serve as antigen in pathogenic interferogenic immune complexes. Both phagocytosis and NET formation compete in controlling fungal infections. The size, number and species of the pathogen determine the reactions of the neutrophils. The inhibition of NET formation often protects against tissue damage when infectious pathogens can be phagocytosed and killed intracellularly.

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК И АКТИВАЦИЯ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА

А.С. Приходько[1], Л.А. Зиновкина[2], Р.А. Зиновкин[1]
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и [2]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Тяжёлые травмы могут приводить к возникновению так называемого синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), схожего по симптомам с сепсисом, но протекающем стерильно. Одной из основных причин ССВО считаются разрушающиеся при травме митохондрии, содержимое которых попадает в кровь. При этом митохондриальная ДНК считается важным фактором развития провоспалительного ответа. В нашей работе мы показали, что экзогенная митохондриальная ДНК не вызывает провоспалительной активации нейтрофилов, и для активации этих клеток требуется предварительное праймирование. Даже с учетом этого фактора, вклад мтДНК в активацию нейтрофилов не является доминирующим. При этом вклад ядерной ДНК в активацию нейтрофилов также является заметным. Также было показано, что внеклеточная ДНК действует на нейтрофилы человека через TLR9. *Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-04-01110.*

AGGREGATED NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (agg-NETs) RESOLVED OCULAR INFLAMMATION IN CLOSED EYES

Johann Krebs, Melissa Sari, Luis Munoz, Martin Herrmann, Aparna Mahajan
Friedrich-Alexander University of Erlangen Nürnberg and Universitätsklinikum Erlangen – Medizinische Klinik 3, Erlangen, Germany

Neutrophils canonically fight with pathogenic microorganisms by generation of reactive oxygen species (ROS), phagocytosis, and secretion of granular proteins (degranulation). Neutrophils also exert another function by externalization of DNA fibers decorated with cytoplasmic and granular proteins which are referred as neutrophil extracellular traps (NETs). We found the presence of neutrophils, aggregated NETs (agg-NETs), entrapped bacteria and particulate matter in the eye rheum which is ocular physiological discharge formed after overnight eyeclosure. Ocular surface is constantly encountering various environmental antigens, particles, and pathogenic microorganisms. Eye rheum analysis revealed that the ocular surface is patrolled by neutrophils, suggesting subclinical inflammation on the ocular surface. This observation was supported with the evidence of increased IL-8 in closed eye tear sample as compared to open eye tear samples. In agreement with other reports our results suggest that a prolonged eye closure bears the risk to cause clinical overt inflammatory conditions in the tear film.

Agg-NETs reportedly degrade proinflammatory mediators through an intrinsic proteolytic potential rendered by serine proteases such as elastase, cathepsin G. We detected enzymatically active neutrophil effector proteins including elastase, myeloperoxidase, and cathepsin G in the eye rheum. DNase treatment of eye rheum caused release of DNA-bound neutrophil elastase and showed increased elastase activity. We have previously reported that aggregated NETs limit inflammation in gouty arthritis via proteolysis of cytokines and chemokines. Proteolytically active aggNETs of eye rheum significantly degraded pro-inflammatory cytokines and chemokines such as IL-12, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23, and MCP-1. We propose that proteolytically active eye rheum is involved in the resolution of inflammation induced in the tear film during overnight eye closure. Impairment of these processes may cause an overt clinical inflammation.

EXTRACELLUAR NEUTROPHIL-DERIVED GLYCOSIDASES – NEW POST-SECRETIONAL MODIFIERS OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN G GLYCOSYLATION?

Jasmin Knopf
Universitätsklinikum Erlangen, Department of Medicine 3, Erlangen, Germany

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) were first described to help neutrophils in trapping in killing bacteria. Since then, many more functions are described for NETs in physiological and pathological conditions. Whereas nowadays NETs are seen as detrimental, we also described beneficial roles of NETs, e.g. by fostering resolution of inflammation. NETs act as a scaffold for many enzymes including Neutrophil Elastase (NE) and Proteinase3 (Pr3). These enzymes contribute to the anti-inflammatory properties of NETs by not only degrading cytokines, but also toxic histones. We further investigated if glycosidases are part of the polyenzymatic machinery of NETs and are able to modify Immunoglobulin G (IgG) glycosylation. This is of major importance since glycosylation of Asparagine[297] of IgG heavy chain is known to influence the effector functions of IgG.

The potential glycan modifiers neuraminidase1, beta-galactosidase, beta-N-acetylglucosaminidase and hexosaminidase A were expressed in human neutrophils and aggregated NETs contained enzyme activities as assessed by specific substrate conversion. Strikingly,

co-incubation of IgG with aggregated NETs reduced the percentage of bisecting N-acetylglucosamine and terminal sialic acid. Importantly, these changes in IgG glycosylation lead to a reduced phagocytosis of IgG-coated beads in an *ex vivo* phagocytosis assay accompanied by a decreased production of pro-inflammatory cytokines.

To further analyze the role of glycosidases in modifying IgG glycans, we are going to analyze their effect on the glycans of circulating IgG and its functional implications *in vivo*.

PATROLLING NEUTROPHILS AND EXTRACELLULAR TRAPS NETs SAFEGUARD THE EYE

Melissa Sari, Johann Krebs, Luis Munoz, Martin Herrmann & Aparna Mahajan
Friedrich-Alexander University of Erlangen Nürnberg and Universitätsklinikum Erlangen – Medizinische Klinik 3, Erlangen, Germany

Eye rheum is a flowing physiological discharge which accumulates at the medial angle of the closed healthy eye after overnight eye closure. It has been reported that the eye rheum contains mucus, dust particles, skin cells and debris. Hematoxylin and eosin staining of eyerheum showed aggregated cells with multi-lobulated nucleus and extracellular DNA traps. Further, immunofluorescence analysis of eyerheum revealed the presence of neutrophils and neutrophil extracellular traps (NETs) decorated with neutrophil elastase and citrullinated histone 3. Scanning electron microscopy analysis showed immobilized bacteria, dust particles and crystals in aggregated NETs (aggNETs) of the eye rheum.

We found that the eye rheum was susceptible to DNase digestion and resulted in single cell suspension. Flow cytometric analysis of eye rheum derived cells showed that the eye rheum contains approximately 80% (±10%) of CD45 positive and CD16 positive immune cells. To assess the cell viability, eyerheum-derived cells were stained with Annexin V, propidium iodide, mitochondrial potential dye (DilC9) and anti-CD16 antibody followed by flow cytometry. In this analysis, we observed significantly higher percentage of viable neutrophils (62.3 ± 16.8%, $p < 0.001$) as compared to apoptotic (31.9 ± 15.8%), apoptotic, and necrotic (10.3 ± 11.3%) neutrophils. Further we identified the presence of neutrophil related proteins like neutrophil elastase, cathepsin G, myeloperoxidase, and protein S100 in eye rheum preparation by gel electrophoresis and mass spectrometry analysis. These observations about eyerheum suggested that viable neutrophils patrol the closed eye and form NETs to collect and remove the harmful particles/antigens from the ocular surface.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В АКТИВАЦИИ И АПОПТОЗЕ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА

А.С. Приходько, И.И. Галкин, Р.А. Зиновкин
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Активные формы кислорода (АФК) прямо или косвенно регулируют множество процессов в нейтрофилах: активацию, нетоз, хемотаксис, апоптоз и другие. Основным источником АФК в нейтрофилах считается НАДФН-оксидаза, однако митохондрии также могут вносить свою лепту в продукцию АФК. Тем не менее, долгое время роль АФК митохондриального происхождения оставалась малоизученной. Мы показали, что уменьшение количества митохондриальных активных форм кислорода с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов увеличивает уровень спонтанного апоптоза покоящихся нейтрофилов. Более того, снижение уровня митохондриальных АФК приводит к уменьшению активации нейтрофилов под действием липополисахарида, мощного провоспалительного фактора, и к увеличению уровня апоптоза. Полученные результаты расширяют представления о значении митохондриальных АФК в физиологии нейтрофилов, что в дальнейшем может служить базисом для разработки противовоспалительных препаратов на базе митохондриально-направленных соединений. *Исследование поддержано грантом РФФИ №18-04-01110.*

ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА SWISS CHEESE *DROSOPHILA MELANOGASTER* ПРИВОДИТ К СНИЖЕНИЮ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ И УВЕЛИЧЕНИЮ УРОВНЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

А.Е. Комиссаров, П.А. Мелентьев, Е.В. Рябова, С.В. Саранцева
Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ«Курчатовский институт» Гатчина, Россия

У известных на сегодняшний день мутантов Drosophila melanogaster по гену sws наблюдается патология аксонов и глии в мозге, отмирание нейронов происходит путем апоптоза. Уже на ранних стадиях развития насекомого детектируется наличие аномальных складчатых структур вокруг тел нейронов и аксонов, образованных глиальными клетками. Ранее нами было показано уменьшение количества митохондрий в нейромышечных соединениях и аксонах в линиях с подавленной экспрессией гена sws Drosophila melanogaster, а также мы обнаружили гибель клеток глии кортекса. Данные нарушения могут быть вызваны окислительным стрессом. Окислительный стресс – это ответная реакция клетки повышенную концентрацию активных форм кислорода (АФК). АФК образуются при нарушении функций дыхательных цепей митохондрий, вследствие чего происходит утечка электронов и их перенос на атомы кислорода. Такие молекулы легко взаимодействуют с компонентами клетками, провоцируя каскад патологических реакций, приводящие к апоптозу клетки. В данной работе оценен уровень окислительного стресса у *Drosophila melanogaster* в линиях с подавленной экспрессией sws в нейронах и глиальных клетках с помощью системы тканеспецифичного запуска интерференции РНК для гена sws при использовании системы трансгенов UAS-GAL4. Для определения уровня активных форм кислорода был выбран распространённый зонд H2DCF-DA, флуоресцирующий при окислении. У линий с подавлением экспрессии в нейронах, в глии кортекса, в субпериневральной и периневральной глии, а также одновременно во всех типах глиальных клеток уровень АФК в мозге повышается с возрастом особей. Уровень АФК в мозге особей исследованных генотипов выше по сравнению с контролем, что, возможно, является одной из причин нейродегенерации. Кроме того, подавление экспрессии гена sws в разных типах клеток нервной системы приводит к уменьшению показателей продолжительности жизни. *Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00982.*

РЕАКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ НА ИЗМЕНЕНИЕ СВЕТОВОГО РЕЖИМА

В.А. Кашуро, Е.Г. Батоцыренова, М.Б. Иванов
Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Вследствие изменения светового режима нарушается согласованность регуляторных механизмов поддержания гомеостаза, в частности, антиоксидантной системы (АОС). В нашем исследовании было изучено состояние АОС и перекисного окисления липидов (ПОЛ) в условиях изменения светового режима в эксперименте. Эксперимент был проведен на 60 беспородных белых крысах-самцах, весом 200-220 г. Крысы были разделены на 3 группы: первая – обычное освещение, вторая – режим постоянного дня и третья группа – режим постоянной ночи. Через 1 и 3 месяца изменения светового режима определялись показатели системы АОС и перекисного окисления липидов в гемолизате эритроцитов. Концентрации диеновых конъюгат (ДК) и малонового диальдегида (МДА) в гемолизате, полученном в группе при постоянном освещении достоверно снижены на 13,3% и на 17,4%, соответственно, по сравнению с аналогичными показателями в группе обычное освещение. Концентрация восстановленного глутатиона (ВГ) в группе с постоянным освещением достоверно снижается на 16,9% по сравнению с группой обычного освещения. Активность СОД в группе постоянное освещение повышается на 25,9% ($p<0,05$), а в группе постоянная темнота снижается на 9,4% ($p<0,05$) по сравнению с группой обычного освещения. Значимо снижается активность Г-6-ФДГ в гемолизате у группы постоянное освещение, на 51,6%, а в группе постоянная темнота – на 16,1% соответственно по сравнению с группой обычного освещения. Через 3 месяца в обеих группах с измененным световым режимом наблюдается снижение активности Г-6-ФДГ: в группе с постоянным освещением на 33,3% ($p<0,05$), в группе с постоянной темнотой на 27,7% ($p<0,05$) по сравнению с группой обычного освещения. Концентрация ДК в группе с постоянным освещением достоверно выше на 36,4% по сравнению с группой обычного освещения, а в группе с постоянной темнотой концентрация ДК повышается почти в 2 раза ($p<0,05$) по сравнению с группой обычного освещения. Таким образом, нарушение ритмичности синтеза мелатонина как мощного антиоксиданта в течение 3 месяцев привело к дисбалансу показателей системы АОС и процессов ПОЛ у животных, находящихся в условиях измененного светового режима.

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СВЕТОВОГО РЕЖИМА НА УРОВЕНЬ КАТЕХОЛАМИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Е.Г. Батоцыренова[1,2], В.А. Кашуро, С.В. Степанов
[1]Институт токсикологии ФМБА России; [2]Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Нарушение периодичности светового режима в течение длительного периода приводит к развитию различных патологических состояний, включая, онкологические заболевания, психические нарушения. Результатом является изменение концентраций катехоламинов (КА) в плазме крови и в моче. Эксперимент был проведен на беспородных белых крысах-самцах, весом 200-220 гр. Животные были разделены на три группы: первая находилась при обычном освещении, вторая находилась в условиях постоянного освещения, третья – в условиях постоянной темноты. Через 1 и 3 месяца пребывания в условиях измененного светового режима определяли концентрации КА в плазме крови и в моче экспериментальных животных с помощью наборов компании «Chromsystems» методом ВЭЖХ на хроматографе Shimadsu с электрохимической ячейкой. Через 1 месяц изменение светового режима привело к достоверному снижению концентрации дофамина в плазме крови (на 86%) животных с одновременным увеличением его концентрации в моче по сравнению с показателями из группы с обычным освещением. Уровень норадреналина в плазме достоверно увеличился в 2 раза в группе с постоянной темнотой, а в моче повысился в обеих группах с измененным световым режимом. Концентрация адреналина достоверно увеличилась в плазме крови (в 2 раза) и в моче (в 3 раза) в условиях постоянной темноты по сравнению с показателями из группы с обычным освещением. Через 3 месяца исследования концентрация дофамина в плазме крови животных всех экспериментальных групп находится примерно на одном уровне. В моче концентрация дофамина достоверно увеличивается как в группе с постоянным освещением (в 3 раза), так и в группе с постоянной темнотой (в 4 раза). Концентрации норадреналина (на 22,1%) и адреналина (на 44,6%) в плазме крови в группах с измененным световым режимом снижаются по сравнению с показателями группы обычное освещение. При этом в моче обнаружено увеличение концентрации адреналина (на 54%) в группе с постоянной темнотой. Таким образом, изменение светового режима, приводящее к изменению суточного ритма синтеза мелатонина, влияет на скорость синтеза дофамина, предшественника катехоламинов. Последствиями этих изменений являются нарушения баланса в иерархии осцилляторной системы и адаптивные изменения для приведения организма в состояние динамического равновесия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПОТЕРМИИ И ГИПОБИОЗА ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ ПУТЁМ ВВЕДЕНИЯ ГИПОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ В ВИДЕ ОСНОВАНИЙ ШИФФА С АЦЕТАЛЬДЕГИДОМ

Б.М. Кершенгольц, О.Н. Колосова
Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия

Согласно модели академика И.П. Ашмарина, гипометаболическим (гипотермическим) регуляторным действием обладают не отдельные пептиды, а определённый пептидный ансамбль. С биотехнологических позиций это означает, что наиболее перспективным путём моделирования гипотермического состояния у холонеадаптированных млекопитающих, включая человека, является выделение соответствующего пептидного ансамбля из тканей зимоспящих, а не их химический синтез. Ткани мелких гибернирующих животных – недостаточная сырьевая база для этих целей. Фракции гипометаболических пептидов (ГП), обладающих и гипометаболической активностью, были выделены из тканей мозга крупных холодоадаптированных животных, обитающих в Якутии (якутская лошадь, северный олень, бурый медведь и др.), методом дробной ультрафильтрации. По величине и силе эффекта они оказались сравнимы с аналогичной пептидной фракцией, выделенной ранее из тканей мозга и слизистой кишечника зимоспящих сусликов. Гипометаболическую и гипотермическую физиологическую активность фракции ГП по отношению к теплокровным животным исследовали, определяя уровни потребления кислорода и изменения температуры

тела при внутрибрю¬шинном введении беспородным белым мышам. Наибольшей гипотермической и гипометаболической активностью обладала фракция ГП мозга 1^{-10} кД. Модификация ГП из мозга северного оленя по аминогруппе микромолярными концентрациями ацетальдегида (сравнимыми с физиологическими концентрациями) увеличивала их молярную активность в десятки раз. Был получен дозозависимый ответ, а также зависимость от формы введения ГП. Так, модификация ГП ацетальдегидом *in vivo* (за счет предварительного введения микромолярных концентраций ацетальдегида в организм) вызывала обратимый гипотермический эффект в 3-4˚С, длящийся до 4 часов. А ацетальдегидная модификация ГП *in vitro* позволяла обратимо снизить температуру тела мышей на 5-8˚С и уровень потребления кислорода на 60-70% на 40-50 минут. По-видимому, введение ГП в виде оснований Шиффа является наиболее физиологичным. Полученные результаты открывают реальные перспективы формирования состояния физиологичной гипотермии (гипобиоза) и в организме человека в интересах кардио- и нейрохирургии, трансплантологии, космической и других областей медицины.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ GSR В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К САХАРНОМУ ДИАБЕТУ 2 ТИПА У ЖИТЕЛЕЙ КУРСКОЙ ОБЛАСТИ

Ю.Э. Азарова[1], Е.Ю. Клёсова[1], В.А. Азарова[2], А.И. Конопля[1], А.В. Полоников[1]
[1]Курский государственный медицинский университет; [2]Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи, Курск, Россия

Важным аспектом патогенеза сахарного диабета 2 типа (СД2) является нарушение баланса в системе редокс гомеостаза. Глутатионредуктаза принадлежит к числу антиоксидантных ферментов и катализирует ресинтез глутатиона GSH, мощной ловушки свободно-радикальных и перекисных соединений, из его окисленной формы GSSG. Цель исследования – изучить ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов гена глутатионредуктазы GSR rs2551715 (C>T), rs2911678 (T>A), rs3757918 (C>T) с риском развития СД2 у жителей Курской области. Материалы и методы. В исследование включено 1023 больных сахарным диабетом 2 типа, группу контроля составили 1037 практически здоровых добровольцев. Генотипирование полиморфизмов гена GSR rs2551715, rs2911678, rs3757918 проводили с использованием технологии iPLEX на геномном времяпролетном масс-спектрометре MassArray Analyzer 4 (Agena Bioscience). Уровень перекиси водорода в плазме крови оценивали флуориметрическим методом с помощью набора OxiSelect ROS/RNS (Cell Biolabs) на микропланшетном ридере Varioscan (Thermo Fisher Scientific). Для статистической обработки полученных данных использовали онлайн программу SNPStats (https://www.snpstats.net/). Результаты. Частоты генотипов GSR по двум локусам из трех (rs2911678, rs3757918) не отличались между собой в группах больных СД2 и здоровых лиц (P>0,05). Генотипы C/T и T/T гена GSR (rs2551715) ассоциированы с пониженным риском развития заболевания (OR 0,82, 95%CI 0,69-0,99, P=0,04, доминантная модель). Значимость выявленной ассоциации возросла после введения поправок на пол, возраст и индекс массы тела (ORcorr 0,79, 95%CI 0,65-0,97, Pcorr=0,028). Эти же генотипы C/T и T/T также оказались связанными с пониженным на 0,35 мкмоль/л содержанием H2O2 в плазме крови (P=0,03). Стратифицированный по полу анализ выявил протективную ассоциацию rs2551715 только у женщин. При изучении ассоциаций гена GSR у лиц с различным отношением к потреблению растительной пищи, протективный характер ассоциации rs2551715 сохраняется только при условии потребления достаточного (согласно критериям ВОЗ) количества растительной пищи, природного источника антиоксидантов. Выводы. Из трех изученных полиморфизмов гена GSR, rs2551715 (C>T) обладает протективным в отношении риска развития СД2 эффектом у жителей Курской области.

AMPK/ULK1-ЗАВИСИМАЯ АУТОФАГИЯ КАК КЛЮЧЕВОЙ РЕГУЛЯТОР СИГНАЛЬНОГО ПУТИ mTOR В КОНТЕКСТЕ КЛЕТОЧНОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

И.И. Суворова
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Плюрипотентные клетки, к которым относятся эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), являются предшественниками всех типов тканей взрослого организма, что делает эти клетки перспективным инструментом в регенеративной медицине. Однако эффективное получение дифференцированных тканей из ЭСК или ИПСК до сих пор является актуальной проблемой в области клеточной терапии. В первую очередь это связано с тем, что полученные линии ЭСК и ИПСК терапевтического класса имеют различный дифференцировочный потенциал, что проявляется в виде их склонности образовывать те или иные специализированные клеточные типы. Во-вторых, существует огромный риск образования тератомы у пациента после трансплантации клеточного материала, полученного из ЭСК или ИПСК. Как правило, этот риск связан с тем, что в популяции зрелых клеток сохраняются плюрипотентные клетки, устойчивые к дифференцировке. Эти дефектные клетки по каким-то причинам не смогли выйти из состояния плюрипотентности при действии митогенных стимулов и остались недифференцированными. Поэтому самые последние исследования в области изучения стволовых клеток сосредоточены на поиске механизмов, являющихся критичными для выхода из клеток из плюрипотентности и их комитированности к дифференцировке. Ряд последних работ, выполненных с помощью высокопроизводительноых скринингов на основе siRNA и CRISPR/cas9, показали, что появление дефектных плюрипотентных клеток с ослабленным потенциалом развития связано с нарушением передачи сигналов, ведущих к активации пути mTOR. Путь mTOR индуцирует синтез белка и клеточный рост в ответ на митогенные стимулы, при наличии достаточного количества питательных веществ и в условиях низкого стресса. Последние данные, полученные Суворовой И.И., раскрывают ключевой механизм, регулирующий сигнальный путь mTOR: AMPK/Ulk1-зависимую аутофагию. Используя каталитически инактивированный белок Cas9 (dCas9), слитый с транскрипционным активатором VP64 (система CRISPRa), была получена линия ЭСК мыши со сверх-активацией гена ulk1. Полученная линия была успешно охарактеризована, и подробно исследован сигнальный путь AMPK/Ulk1-зависимой аутофагии в этих клетках. *Работа была поддержана грантом РФФИ №18-015-00230А.*

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

А.В. Зубова[1], О.Н. Потеряева[2], Г.С. Русских[2], Л.М. Поляков[2]
[1]Новосибирский государственный медицинский университет; [2]НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия

Отсутствие общепринятых теорий этиологии и патогенеза сахарного диабета 2 (СД 2) типа определяет актуальность исследования этого гетерогенного заболевания. Цель: исследовать роль липопротеинов плазмы крови (ЛП) и матриксных металлопротеиназ (ММП) в патогенезе СД 2 типа. Сыворотка крови была получена у больных СД 2 типа (n=78). Экспериментальная часть была выполнена на крысах-самцах (180-200 г). Островки Лангерганса выделяли седиментационным методом согласно Lacy P. et al. (1967). Концентрацию стимулированного крысиного инсулина измеряли методом ИФА. Активность ММП-2,7 определяли флюориметрическим методом. При сравнении результатов измерения секреции инсулина в присутствии глюкозы (20 мМ) было выявлено: интенсивный синтез инсулина происходил под действием сыворотки крови здоровых людей (0,85±0,13 нг/мл, p<0,01); сыворотка больных СД 2 типа в стадии декомпенсации снижала синтез инсулина в 5 раз по сравнению с сывороткой здоровых людей (0,17±0,04 нг/мл, p<0,001). Под влиянием ЛПОНП секреция инсулина уменьшалась до 0,49±0,2 нг/мл. Под влиянием ЛПВП секреция инсулина увеличивалась в 3,8 раза (0,98 нг/мл), а активность ММП-2,7 возрастала в 4 раза (20,0±0,99 мкмоль МСА/л в 1 ч). Таким образом, ЛПВП увеличивали, а ЛПОНП и ЛПНП снижали синтез инсулина. Выводы. У больных СД 2 типа в стадии декомпенсации снижение синтеза инсулина может происходить из-за повышенного содержания атерогенных ЛП и снижения активности ММП. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии ММП и ЛП в патогенезе СД 2 типа.

ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТАРНЫХ, МОДЕЛЬНЫХ И ВЕЗИКУЛ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

О.М. Алексеева[1], А.В. Кременцова[1], А.В. Кривандин[1], А.Н. Голощапов[1], Ю.А. Ким[2]
[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, Москва; [2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской обл., Россия

Действие эндогенных и экзогенных факторов химической природы направлено в качестве первых мишеней на мембраны биологических клеток. В настоящей работе в качестве экспериментальных объектов разного уровня организации мембран использовали тени эритроцитов (ТЭ), целые эритроциты (Э) и везикулы фрагментированного саркоплазматического ретикулума (ФСР). Использовали также модельные мембраны – фосфолипидные мультиламеллярные липосомы (ФМЛ), сформированные из индивидуального синтетического фосфолипида димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) или из смеси природных фосфолипидов – яичного лецитина (ЯЛ).

Показано методами ДСК и малоуглового рентгеновского рассеяния влияние на структуру ФМЛ при действии гидрофобных и гидрофильных экзогенных веществ – мелафена (меламиновая соль бис (оксиметил)фосфиновой кислоты) и калиевой соли фенозана (-β-(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота) и его гидрофобных производных – ИХФАНы, (сложноэфирные производные (метилокса) (3,5 дитрет бутил -4-гидроксифенилпропановой кислоты) и этаноламина (коламина), замещенного алкильными заместителями с разной длиной цепи 8; 10; 12; 16 углеродных атомов). Мелафен, феноксан, ИХФАН С-10 изменяют микродоменную организацию ДМФХ-ФМЛ. Мелафен не меняет расположение бислоев в ЯЛ-ФМЛ и их толщины, также не влияет и на белковые микродомены в ТЭ. Однако, производные фенозана значительно влияют на микродомены в ТЭ, образованные белками ионных каналов, снижая их термоустойчивость и взаимное расположение. В изолированных целых эритроцитах исследовали белок-липидные взаимодействия. Обнаружили, что доза-зависимо меняется микровязкость мембраны и повышается ее проницаемость в присутствии указанных веществ.

Действие эндогенных (свободные жирные кислоты, Mg^{2+}, Ca^{2+}, сывороточный альбумин) и экзогенных веществ (метилксантины, флуоресцентные красители) на белок-липидные взаимодействия на мембранах внутриклеточных органелл исследовали на препаратах ФСР. Спектральными и потенциометрическим методами показано, что эндогенные и экзогенные вещества изменяют проницаемость мембраны ФСР, неспецифически влияя на структуру гидрофобной фазы мембран и направленно на активности белковых компонентов. Обнаружено влияние веществ разной природы и разного происхождения на мембраны разного уровня организации.

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

Стендовые доклады и конкурс молодых ученых

WAYS TO CONTROL PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF ACTIVE TARGETED LIPOSOMAL FLUOROQUINOLONE DELIVERY SYSTEMS

I.M. Le-Deygen, A.A. Skuredina, P.V. Mamaeva, E.V. Kudryashova
Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, Lomonosov MSU, Moscow, Russia

Liposomes are perspective drug delivery carrier for active molecules, which usually possess limited bioavailability and a number of side effects. In current research, we have studied ways to control physicochemical properties of liposomal form of two fluoroquinolones: levofloxacin (LLev) and moxiflocan (LMox). Both of these drugs are widely used in therapy of different infections including tuberculosis and ophthalmologic infections. To control the physicochemical properties of liposomal containers for the delivery of fluoroquinolones two approaches were used: variation of the lipid composition of liposomes and the way the antibiotic loading, and the selection of a functionalizing polymer. It has been established that the presence of the anionic phospholipid cardiolipin in the liposome

composition increases the loading efficiency by 10–30%. Methods for active loading of levofloxacin and moxifloxacin are proposed to achieve an antibiotic loading up to 90% efficiency (3.6 mg of moxifloxacin per 5 mg of lipids). The mechanism of embedding antibiotics into membranes was studied, and the main binding sites were determined. For functionalization of the liposomal surface, it was proposed to use chitosan derivatives. Complexes of liposomal forms of antibiotics with chitosan derivatives obtained in the project and with commercially available chitosan glycol were obtained. Based on the analysis of the interaction of vesicles with polymers, criteria have been developed for the selection of a polymeric shell for liposomal forms of fluoroquinolones. The method for determining the binding constant mannose-containing polymer molecules with ConA, which is a model lectin in the study of the binding of ligands of different composition to the mannose receptor, based on Fourier transform infrared spectroscopy was developed. As ligands, mannose samples were examined: galactomannan, chitosan-mannose (5kD, mannosylation degree 35%) and chitosan-mannose (90kDa, 25%, respectively), as well as D-mannose as a control system. *This research is supported by RFBR 18-33-00134.*

МИКРОСКОПИЯ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ НАРУШЕНИЙ, ПРИВОДЯЩИХ К РАЗВИТИЮ БАРЬЕРНОЙ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ

А.С. Шахов, И.Б. Алиева
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Эндотелиальные клетки (ЭК, эндотелиоциты) – специализированные клетки, выстилающие внутреннюю поверхность сосудов. В норме ЭК имеют уплощенную форму и плотно прилегают друг к другу, что позволяет им выполнять основную функцию эндотелия, заключающуюся в регуляции проницаемости сосудистой стенки. Эндотелиальный слой обеспечивает регулируемый обмен между циркулирующей в сосудах кровью и тканевой жидкостью. Эндотелиальный барьер динамичен и крайне чувствителен к воздействию различных стимулов. Цитоскелет ЭК (актиновые компоненты и система микротрубочек) играет решающую роль в поддержании барьерной функции эндотелия, его реорганизация обеспечивает структурную основу для усиления или ослабления барьерной функции. Главными компонентами, обеспечивающими сокращение клетки, являются ее актиновые структуры. Биохимические исследования показали, что в ЭК, как *in vivo*, так и *in vitro*, присутствует две изоформы актина: немышечные β- и γ- цитоплазматические актины. Использование двойного иммунофлуоресцентного мечения и микроскопии сверхвысокого разрешения (SIM, Structural Illumination Microscopy) в сочетании с методами корреляционного анализа позволили описать взаимное расположение актиновых структур в клетке в норме и исследовать его в ходе реорганизации цитосклета ЭК под действием веществ, разрушающих микротрубочки. В отличие от предыдущих исследований, проводившихся методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии и утверждавших, что β- и γ-актиновые структуры в ЭК колокализованы (Pasquier et al., 2015), применение SIM-микроскопии позволило установить что эти структуры по разному организованы в пространстве эндотелиоцитов: β-актин образует преимущественно стресс фибриллы и кольцевые пучки, а разветвленная актиновая сеть в кортикальных областях клетки состоит из γ-актина. Колокализация цитоплазматических β- и γ-актиновых структур может наблюдаться в районе ламеллиподий, однако взаимное расположение β- и γ-актиновых компонентов клетки динамично меняется при любых изменениях формы клетки – как в норме (например, при формировании эндотелиального монослоя), так и при развитии барьерной дисфункции эндотелия в результате целого ряда экспериментальных воздействий, разрушающих микротрубочки. *Поддержано РФФИ (№ 18-29-09082) и Программой развития МГУ (PNR 5.13).*

ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСА rs5370 ГЕНА ЭНДОТЕЛИНА-1 И УРОВЕНЬ ЕГО БЕЛКОВОГО ПРОДУКТА В КРОВИ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

А.А. Байгильдина
Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Уфа, Россия

Изменение тонуса сосудов является патогенетическим звеном развития таких осложнений гемолихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), как ИТШ, ОПН, кровоизлияние в гипофиз и др. Одним из мощных вазорегуляторов эндотелиального происхождения является эндотелин-1 (ЭТ-1). Цель исследования – изучение распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса rs5370 гена ЭТ-1 как возможного предиктора ГЛПС и уровня его белкового продукта в крови больных в зависимости от периода и тяжести течения болезни. Обследованы 319 больных ГЛПС (278 мужчин и 41 женщина) в возрасте 41,2 [26,7; 51,3] лет, в т. ч. со среднетяжелой формой – 54,9% (1 гр.), тяжелой неосложненной – 29,8% (2 гр.), тяжелой осложненной – 15,3% (3 гр.). Группа контроля – 171 практически здоровых добровольцев. Критерий исключения из исследования – наличие в анамнезе сердечно-сосудистых, эндокринных, злокачественных заболеваний, болезней печени и почек. Геномную ДНК из лейкоцитов периферической крови выделяли методом фенол-хлороформной экстракции, типирование локусов проводили методом ПЦР синтеза ДНК. Уровень ЭТ-1 в плазме крови определяли методом ИФА. Различия в распределения частот генотипов и аллелей исследуемого локуса между больными ГЛПС и серонегативными донорами статистически незначимы. Генотип *G/*G чаще встречается в 1- и 2-й гр. (62,8 и 64,8% соответственно). Генотип *T/*G распределен между группами одинаково. Генотип *T/*T встречается тем чаще, чем тяжелее протекает ГЛПС. Встречаемость аллеля *T прямо, а аллеля *G – обратно коррелирует с тяжестью течения болезни. Концентрация ЭТ-1 (нг/мл, $p<0,05$, FDR): 1 гр. – период лихорадки – 0,26 [0,19; 0,31] против 0,38 [0,29; 0,56] для контроля ($p=0,04$), олигурии – 0,21 [0,17; 0,25] ($p=0,02$), полиурии – 0,15 [0,05; 0,26] ($p=0,03$), восстановленного диуреза – 0,20 [0,17; 0,23] ($p=0,01$); 2 гр. – соответственно 0,19 [0,13; 0,23] ($p=0,006$), 0,10 [0,04; 0,11] ($p=0,004$), 0,08 [0,05; 0,22] ($p=0,007$) и 0,14 [0,11; 0,19] ($p=0,004$); 3 гр. – соответственно 0,15 [0,12; 0,17] ($p=0,004$), 0,07 [0,05; 0,16] ($p=0,004$), 0,12 [0,09; 0,19] ($p=0,004$) и 0,09 [0,07; 0,17] ($p=0,01$). Таким образом, полиморфный локус rs5370 гена ЭТ-1 не ассоциирован с тяжестью течения ГЛПС и снижение продукции пептида может быть трактовано как звено адаптации организма к действию возбудителя болезни.

ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ РЕПЕРТУАРА Т КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ С ВОЗРАСТОМ И ПРИ ИММУНОДЕФИЦИТАХ

Е.С. Егоров[2], П.В.Шелякин[2,4], И.А. Кофиади[3], Д.Б. Староверов[1,2], Е.А. Богданова[1,2], И.А. Манто[3], Т.В. Латышева[3], М.Р. Хаитов[3], Д.М. Чудаков[1,2], О.В. Британова[2]
[1]Институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [3]Институт иммунологии ФМБА, Москва, Россия

Значительная часть работ, касающаяся иммунодефицитов, связана с изучением репертуара Т клеточных рецепторов (ТКР) при Т-клеточных иммунодефицитах, тогда как первичный В-клеточный иммунодефицит, агаммаглобулинемия (XLA), остается малоизученным в этом направлении. Патогенез XLA обусловлен мутациями в одном гене, тирозинкиназы Брутона, и характеризуется отсутствием зрелых В-клеток. Целью данной работы было исследование влияния В-клеток на формирование репертуара ТКР у пациентов с XLA.

Проведен иммунофенотипический анализ мононуклеарной фракции крови здоровых доноров (n=79) и пациентов с XLA (n=10) по маркерам, определяющим наивные и Т клетки памяти. С использованием клеточной сортировки из образцов периферической крови были получены фракции наивных $CD4^+$ лимфоцитов, включая регуляторные Т клетки (Treg). С помощью разработанного ранее подхода к анализу репертуаров ТКР, который включает: получение кДНК библиотек репертуаров, высокопроизводительное секвенирование и анализ с помощью программного обеспечения MiGEC, MiXCR и VDJtools, проведено сравнение между когортами пациентов XLA (n=7), здоровых молодых (n=6) и пожилых доноров (n=4***)***.

1. У пациентов с XLA снижена доля наивных CD4 и CD8 лимфоцитов по сравнению со здоровыми донорами такого же возраста; 2. антиген-связывающий участок ТКР (CDR3) в репертуаре наивных CD4 лимфоцитов XLA-пациентов отличается от здоровых доноров обоих возрастов высоким содержанием сильно-связывающих аминокислотных остатков, которые могут вносить вклад в увеличение аффинности ТКР; 3. наивные Treg у пациентов с XLA значительно отличаются по репертуару от молодых здоровых доноров, представляя собой менее разнообразный набор Т клеточных рецепторов с выраженной клональной экспансией. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, во-первых, о сниженной продукции Treg в результате нарушения селекции в тимусе, что компенсируется их периферическим делением, а во-вторых, потенциально высокое содержание Т клеток с высоко-аффинными ТКР у пациентов с XLA может быть ассоциировано с повышенным риском развития аутоиммунных заболеваний. *Работа поддержана грантом РНФ №16-15-00149.*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ СУБЪЕДИНИЦ ПРОТЕАСОМ С УБИКВИТИНИРОВАННЫМИ И НЕУБИКВИТИНИРОВАННЫМИ БЕЛКАМИ

О.А. Бунеева, О.В. Гнеденко, А.С. Иванов, А.Е. Медведев
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Протеасомы – мультиферментные комплексы, осуществляющие таргетную деградацию внутриклеточных белков, которые сначала убиквитинируются, затем связываются с регуляторной субчастицей протеасомы (19S), а после поступают в коровую ее часть (20S), где и происходит протеолиз. Белки, содержащие неструктурированные участки, не требуют убиквитинирования и связываются непосредственно с 20S протеасомой. Исследовали взаимодействие с Rpn10 и Rpn13 субъединицами 19S-субчастицы протеасомы ряда высокоочищенных белков (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), пируваткиназа, гистоны H2A и H2B), связывание которых с регуляторной субчастицей протеасомы было обнаружено нами ранее в ходе протеомного профилирования препаратов мозга мышей с использованием в качестве аффинного лиганда Rpn10 субъединицы протеасом. По данным биосенсорного анализа, выполненного с помощью оптического биосенсора Biacore 3000 (GE Healthcare, США), работающего на основе поверхностного плазмонного резонанса, все исследуемые белки количественно взаимодействовали с Rpn10 и Rpn13 субъединицами (Kd порядка 10^{-6} M, а в случае гистонов H2A и H2B с субъединицей Rpn10 Kd порядка 10^{-8} M и 10^{-9} M соответственно). При этом убиквитиновая сигнатура (Gly-Gly) обнаружена только в препарате ГАФД. Вероятно, связывание неубиквитинированных белков с субъединицами 19S-субчастицы протеасомы может как регулировать работу этих протеасомных рецепторов убиквитина, конкурируя с убиквитинированными субстратами, так и способствовать активации других путей поступления в протеасому белков, подлежащих деградации. Предварительные результаты также свидетельствуют о взаимодействии с коровой частью протеасомы (20S) не содержащих убиквитиновую метку белков (альдолаза, пируваткиназа (Kd порядка 10^{-7} M)). *Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00073а.*

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВЫХ МАРКЕРОВ

Н.А. Бызова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев
Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Оперативное начало терапевтических мероприятий при острых воспалительных процессах требует эффективных средств диагностики, сочетающих быстрое получение информации и возможность тестирования во внелабораторных условиях. Оптимальным подходом к решению этой задачи является иммунохроматографическая детекция специфических белковых маркеров, попадающих в кровь при воспалительных процессах. Разработаны и апробированы два вида экспрессных иммунохроматографических мультипараметрических тест-систем для детекции кардиомаркеров сердечных дисфункций (тропонина I, ТнI, белка, связывающего жирные кислоты, БСЖК, и С-реактивного белка, СРБ) и для детекции воспалительных маркеров (миоглобина, Мио, СРБ и Д-димера, ДДм), отличающихся геометрией расположения зон связывания на рабочей мембране. В рамках разработки тест-систем получены препараты наночастиц золота со средним диаметром 34 нм и их конъюгаты с моноклональными антителами против ТнI, БСЖК, СРБ, Мио и ДДм. Сопоставлена антигенсвязывающая способность конъюгатов разного состава; изучена динамика формирования детектируемых иммунных комплексов при проведении иммунохроматографии

с использованием различных мембранных носителей; установлены условия нанесения иммунореагентов на мембраны и их концентрации, обеспечивающие возможность одновременного детектирования различных по внутриклеточной локализации и физико-химическим свойствам биомаркеров и минимальные пределы их обнаружения. Проведена апробация тест-системы на клиническом материале. Показано, что разработанные тест-системы позволяют за 10 мин детектировать в сыворотке и плазме крови: ТнI в концентрациях до 1 нг/мл, БСЖК – до 4 нг/мл и СРБ – до 600 нг/мл; Мио – до 30 нг/мл, СРБ – до 1 мкг/мл и ДДм – до 500 нг/мл. Показана корреляция результатов, получаемых с помощью разработанных тест-систем и других методов, традиционно используемых в кардиодиагностике и диагностике воспалительных процессов. Одновременный контроль нескольких биомаркеров позволяет делать более информативные выводы о динамике и особенностях развития патологических процессов, выбирать эффективные терапевтические решения. *Выполненная работа частично поддержана грантом РФФИ № 18-08-01397_а.*

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ PDU ОПЕРОНА У ИЗОЛЯТОВ *E. COLI*, АССОЦИИРОВАННЫХ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

Ю.П. Байкова, Д.В. Ракитина, Т.А. Семашко, Д.В. Евсютина, О.Н. Букато, О.В. Побегутц
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Болезнь Крона (БК) – это хроническое заболевание, которое вызывает воспаление желудочно-кишечного тракта. Этиология БК еще не полностью выяснена. Кишечный бактериальный дисбаланс связан с БК и может быть причиной развития хронического воспаления. Действительно, метагеномный анализ кала и биопсии показал, что количество *Escherichia coli* у пациентов с болезнью Крона часто увеличено по сравнению со здоровыми людьми [1]. Штаммы БК-ассоциированной кишечной палочки имеют адгезивно-инвазивный фенотип (AIEC). Анализ геномов таких изолятов показал наличие генов pdu оперона, участвующих в утилизации 1,2-пропандиола [2–3]. Использование альтернативных источников углерода и азота во многом характерно для патогенных бактерией, обитающих в сложных бактериальных сообществах. В нашем исследовании мы сосредоточились на выявлении разницы в экспрессии генов pdu оперона между БК-ассоциированными клиническими изолятами кишечной палочки и комменсальными штаммами при их росте на различных источниках углерода. Для исследования были отобраны пять штаммов *E. coli*, выделенных из фекалий и просвета кишечника пациентов с болезнью Крона. Наши результаты показали, что наиболее выраженный эффект активации оперона pdu наблюдался при использовании 1,2-пропандиола, сукцината и лактозы в качестве источника углерода. Также оперон pdu активировался с ростом на богатой среде LB. Компоненты слизистой оболочки кишечника, как фукоза и муцин, не оказывали значительного стимулирующего эффекта.

1. Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, et al. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. Gut. 2006;55:1760–1767. doi: 10.1136/gut.2005.078824
2. Dogan, B. et al. Inflammation-associated adherent-invasive *Escherichia coli* are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation. Inflamm. Bowel Dis. 20, 1919–1932 (2014).
3. Rakitina D. et al. Genome analysis of *E. coli* isolated from Crohn's disease patients. BMC Genomics 12: 316 (2011).

АМИЛОИДНЫЕ СТРУКТУРЫ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТЕЛЬЦАХ ВКЛЮЧЕНИЯ

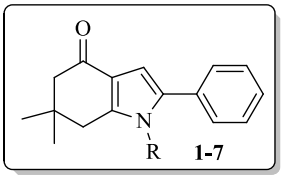
С.И. Бахолдина[1], Е.А. Пименова[2], Н.Ю. Ким[1], Н.Ю. Чернышова[1], Т.Ф. Соловьева[1]
[1]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; [2]Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток, Россия

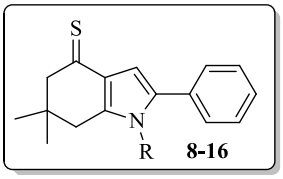
В настоящее время с образованием амилоидной формы белка связывают ряд тяжелых заболеваний человека. Недавними исследованиями было установлено, что в бактериальных тельцах включения (ТВ), образующихся при гиперэкспрессии рекомбинантного белка, присутствуют амилоидоподобные структуры. Существует очень мало информации о механизме образования амилоидов. ТВ являются удобной моделью для данного рода исследований. В данной работе мы исследовали амилоидные структуры в ТВ, образованных фосфолипазой А1 (PldA) *Yersinia pseudotuberculosis* в *E.coli* при 37°С. ТВ взаимодействовали со специфическим красителем тиофлавином Т, что свидетельствует о наличии амилоидных структур белка в их составе. Небольшое увеличение содержания амилоидов наблюдалось при уменьшении концентрации ТВ в PBS от 20 до 5 мкг/мл (по белку), а также при увеличении температуры от 23 до 37°С. При полной дезагрегации ТВ в 0,04% SDS уровень амилоидных структур возрастал в 2 раза в течение 2 ч. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) показала, что на поверхности ТВ, инкубированных в PBS при 37°С, появляются мелкие сферические структуры, собранные в короткие цепочки, которые напоминают постулированные ранее олигомерные интермедиаты амилоидов. Для визуализации амилоидных структур ТВ были обработаны протеиназой К, которая легко расщепляет белки с высокоорганизованной и развернутой структурой и слабо активна в отношении амилоидов. По данным ТЭМ уже через 20 мин после инкубации по периметру ТВ обнаруживаются сферические формы белка и короткие протофибриллы, а через 40 мин становятся видимыми амилоидные фибриллы более 6 мкм длиной и толщиной 2–5 нм. Интересно, что содержание амилоидов в ТВ, обработанных ферментом, было ниже, чем в контрольном образце (без протеиназы). Возможно, это связано с относительно низкой устойчивостью к действию протеиназы низкомолекулярных амилоидных форм белка. По данным SDS-PAGE доля белка в ТВ, устойчивого к действию протеиназы К, составляет около 10%. Таким образом, в ТВ PldA присутствует небольшое количество амилоидов. Однако, дополнительное количество их может увеличиваться при дезагрегации/диссоциации ТВ, в результате которой образуются интермедиаты белка, склонные к формированию амилоидных структур.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ОРИГИНАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ РЯДА ИНДОЛА

З.Р. Зилеева[1], М.А. Максимова[1], А.В. Ковальская[2], И.А. Положенцева[3], И.П. Цыпышева[2]
[1]Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН; [2]Уфимский институт химии УФИЦ РАН; [3]Башкирский медицинский университет, Уфа, Россия

С целью поиска новых производных тетрагидроиндолона и соответствующего -тиона с потенциальной цитотоксической/цитостатической активностью, исходя из доступных предшественников, синтезирован ряд производных 1-16 с различными заместителями у атома азота.





R = All (1), CH_2CH_2OH (2), 4-BrPh (3), 4-OPh-Ph (4), 2-MePh (5), 3,4-diFPh (6), 3-ClPh (7)

R = CH_2CH_2OH (8), 4-OPh-Ph (9) 3-ClPh (10), 3,4-diFPh (11), CH_2Py (12), Ph(13), 4-BrPh (14), 2-MePh (15), Bn (16)

С помощью витального красителя PrestoBlue® была проведена оценка цитотоксической активности новых соединений – производных ряда индола. В соответствии с полученными результатами, цитотоксическими свойствами в отношении клеток линии Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия) обладают производные **1** (IC_{50}=25,4±3,2, p=0,000012), **5** (IC_{50}=14,79±2,11, p=0,00001), **6** (IC_{50}=77,92±12,73, p=0,02), **7** (IC_{50}=16,76±8,05, p=0,000008) и **14** (IC_{50}=77,03±11,66, p=0,002). Влияние данных соединений на жизнеспособность клеток линии HEK293 (условно-нормальные клетки эмбриональной почки человека), A549 (карцинома легкого) и MCF7 (аденокарцинома молочной железы) не обнаружено. Таким образом, среди производных тетрагидроиндолона и соответствующего -тиона, показавших тканеспецифичную активность, наиболее перспективными для дальнейшего изучения являются соединения 5 и 7, как наиболее токсичные для клеток Т-лимфобластной лейкемии и не влияющие на жизнеспособность линий условно-нормальных клеток. *Работа выполнена в соответствии с планами госзадания ИБГ УфИЦ РАН № АААА-Ф16-116020350033-8 и УфИХ УфИЦ РАН № АААА-А17–117011910025–6.*

НАРУШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ, К НОРАДРЕНАЛИНУ

А.М. Иванова, В.И. Чечехин, П.А. Тюрин-Кузьмин, Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) выявляются в большинстве тканей организма и играют ключевую роль во многих процессах, включая обновление жировой ткани. Функциональная активность МСК регулируется гормонами, а одним из ключевых является норадреналин. Ранее в нашей лаборатории был показан феномен переключения внутриклеточной сигнализации с бета-адренорецептеров на альфа1А-адренорецепторы в МСК и назван «гетерологической сенситизацией», которая ранее была обнаружена только в эмбриональных клетках. Также было показано, что соотношение между субпопуляциями МСК, полученных из жировой ткани, экспрессирующих адренергические рецепторы α1A, α1B, α2A, α2B, β1, β2 и β3, существенно варьируется от донора к донору. Из-за высокой гетерогенности первичных МСК для дальнейшего исследования механизмов мы использовали гомогенную популяциею иммортализованных мезенхимальных стволовых клеток, происходящих из жировой ткани (hTERT-МСК). В данной работе мы исследовали чувствительность hTERT-МСК к норадреналину, а также способность их регулировать чувствительность к нему. С помощью иммунофлуоресцентного анализа было показано, что hTERT-МСК экспрессируют все формы адренорецепторов. Анализ с помощью проточной цитометрии показал, что процент клеток, содержащих данные изоформы адренорецепторов, был довольно стабильным, но на более низком уровне. При исследовании чувствительности hTERT-МСК к норадреналину путем регистрации $Ca2^+$-ответа мы продемонстрировали, что процент клеток, отвечающих на норадреналин, был в 4 раза ниже по сравнению с первичными МСК, а вариабельность ответа hTERT-МСК была сходной. Используя ингибиторный анализ, мы показали, что hTERT-МСК отвечают на норадреналин $Ca2^+$-зависимым путем только через α1-адренорецепторы. Исследуя феномен «гетерологической сенситизации» у hTERT-МСК, мы показали, что у данных клеток нарушена регуляция норадреналином по сравнению с первичными МСК. Используя метод ELISA, мы показали, что норадреналин стимулирует синтез цАМФ в первичных МСК, тогда как в hTERT-МСК этого не делает. Таким образом, hTERT- МСК проявляют ослабленную чувствительность к норадреналину, а также ослабленную способность регулировать чувствительность к данному гормону. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта No 19-315-80018.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ P2Y-РЕЦЕПТОРОВ НА CD34⁺/C-KIT⁺, CD34⁺ КЛЕТКАХ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Р.Р. Казакова[1], И.Г. Мустафин[2], А.У. Зиганшин[2]
[1]Научно-образовательный центр фармацевтики Казанского федерального университета; [2]Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

P2-рецепторы, агонистом которых является АТФ, найдены практически во всех органах и тканях человека, включая сосуды и клетки периферической крови [1–2]. Функциональные свойства любой клетки определяются во многом ее рецепторным аппаратом, вместе с тем изменения качественного состава рецепторов в процессе онтогенеза для большинства клеточных типов практически не исследованы. Целью данной работы являлось определение экспрессии P2Y1-, P2Y4-, P2Y6- рецепторов на на $CD34^+$/c-kit^+, $CD34^+$ клетках, а также лимфоцитах и моноцитах пуповинной крови человека. Пуповинную кровь отбирали во время родов в пробирки с антикоагулянтом. На проведение экспериментов было получено разрешение локального этического комитета. Мононуклеары (лимфоциты, моноциты, $CD34^+$-клетки) выделяли на градиенте плотности фиколла (Sigma) [3]. Затем проводили процедуру иммуномагнитной сепарации $CD34^+$клеток из фракции мононуклеаров, окрашивание клеток антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями, дальнейший анализ осуществляли на проточном цитометре FACSCanto II (BD) в программе FACSDiva. Нами обнаружена экспрессия P2Y1-, P2Y4-, P2Y6- рецепторов на $CD34^+$/c-kit^+, $CD34^+$ клетках, а также лимфоцитах и моноцитах пуповинной крови человека (таблица 1). Бóльшее относительное содержание моноцитов, экспрессирующих P2Y-рецепторы на своей поверхности, вероятно, связано с их функцией. Таблица 1 – Относительное содержание (%) клеток пуповинной крови человека, экспрессирующих P2Y-рецепторы, (M±SEM, %) * -p<0,05 относительно экспрессии P2Y1- рецепторов на $CD34^+$ клетках Подтип рецепторов $CD34^+$/$ckit^+$ (n=3) $CD34^+$ (n=8-11) Лимфоциты (n=10-11) Моноциты (n=6) P2Y1 3,3±0,8 5,1±1,5 0,5±0,3 21,2±7,3 P2Y4 7,0±1,1 9,0±1,9 17,6±4,6 71,7±9,4* P2Y6 3,0±1,1 4,3±1,3 5,5±1,8 30,4±11,7.

1. Burnstock G., Ralevie V. Purinergic Signaling and Blood Vessels in Health and Disease // Pharmacol Rev 66:102–192, January 2014.
2. Казакова Р.Р., Мустафин И.Г., Мавлюдов Т.И., Киясов А.П., Зиганшин А.У. Определение экспрессии P2X-рецепторов на CD34- и c-kit-положительных клетках пуповинной крови человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – т. 151. – С. 39-44.
3. Boyum A (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. Scand J Clin Lab Invest Suppl 9.

ВЛИЯНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ЦИТОХАЛАЗИНОМ В МИКРОВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА РАЗВИТИЕ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

О.А. Неустроева, А.М. Аймалетдинов, С.К. Клетухина, С.В. Курбангалеева, А.А. Ризванов, М.О. Гомзикова
Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Микровезикулы – это межклеточные медиаторы округлой структуры, которые состоят из цитоплазмы и окружающего её билипидного слоя. Естественные МВ мезенхимных стволовых клеток (МСК) обладают иммуномодулирующими свойствами: сдвигают баланс в сторону образования регуляторных Т-клеток, подавляют активность натуральных киллеров, снижают выработку антител В-клетками и ингибируют дифференцировку моноцитов в дендритные клетки. Данные свойства говорят о том, что как и МСК, МВ могут быть использованы при острой реакции «трансплантат против хозяина» для снижения иммунного конфликта между клетками донора и реципиента и при аутоиммунных заболеваниях для супрессивного воздействия на Т-лимфоциты. В отличие от стволовых клеток (СК), которые имеют риск закупорки сосудов, МВ являются наиболее безопасным и перспективным инструментом для лечения иммунных расстройств. Однако, на данный момент не существует способа получения терапевтически значимого количества естественных микровезикул в короткие сроки. В связи с актуальностью данного вопроса мы исследовали влияние внутривенной инъекции (в.в) аллогенных индуцированных цитохалазином В МВ (МВ-ЦВ) на развитие клеточного иммунного ответа. На первом этапе работы методом проточной цитофлуориметрии был подтвержден мезенхимный иммунофенотип клеток выделенных из жировой ткани мыши. По результатам иммуноокрашивания на МСК мыши были детектированы специфичные поверхностные маркеры стволовых клеток (Sca-1^+, $CD49e^+$, $CD44^+$) и не обнаружена экспрессия маркера, характерного для гематопоэтических СК ($CD45^-$). Далее, путем обработки МСК цитохалазином В получали МВ. Молекулярный состав МВ-ЦВ МСК и МСК, анализировали при помощи Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad, USA). Полученные данные подтвердили наличие схожих биоактивных молекул у МВ-ЦВ МСК и МСК. Далее, мы оценивали влияние в.в инъекции аллогенных МСК или МВ-ЦВ МСК на активность нейтрофилов и макрофагов. Результаты показали, что инъекция МСК или МВ-ЦВ МСК не повлияла на активность нейтрофилов по сравнению с контрольными мышами. В случае с макрофагами была обнаружена тенденция к снижению фагоцитарной активности. Таким образом, мы установили, что МВ-ЦВ МСК обладают сходным с родительскими МСК иммунофенотипом, молекулярным составом, а также сдерживают развитие воспалительной реакции.

СОПРЯЖЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЕЙ Р-СЕЛЕКТИНА И АНТИТЕЛ К дцДНК В КРОВИ БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

И.А. Андрианова, А.И. Хабирова, Р.И. Литвинов
Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Системная красная волчанка (СКВ) – это аутоиммунное заболевание, при котором, как правило, повышен титр антител (АТ) к дцДНК. СКВ часто осложняется венозным или артериальным тромбозом, возникающим, среди других причин, в результате активации тромбоцитов. Активированные тромбоциты экспрессируют на поверхность плазматической мембраны и секретируют в кровь белок клеточной адгезии Р-селектин, который является молекулярным маркером активации тромбоцитов.

Чтобы выявить связь иммунной реакции с активацией тромбоцитов при СКВ, мы сопоставили концентрацию свободного Р-селектина, уровень связанного Р-селектина и содержание АТ к дцДНК в крови пациентов с СКВ.

Концентрацию свободного Р-селектина в плазме крови больных СКВ (n=15) и здоровых доноров (n=10) и уровень АТ к дцДНК в сыворотке крови больных СКВ определяли с помощью иммуноферментного анализа. Уровень связанного Р-селектина в плазме больных СКВ и доноров определяли методом проточной цитометрии, используя меченные флуорохромом АТ к человеческому Р-селектину. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена.

Уровень свободного Р-селектина был равен 104±19 нг/мл у больных СКВ против 57±6 нг/мл в контроле ($p<0,05$). Уровень АТ к дцДНК составлял 85±22 Ед/мл и был значительно выше референсных значений <10 Ед/мл. Экспрессия Р-селектина на поверхности тромбоцитов больных СКВ была в среднем на 20% выше, чем у здоровых. Между свободным Р-селектином и связанным Р-селектином наблюдалась обратная корреляция ($R=-0,59$; $p<0,05$). Титр АТ к дцДНК находился в обратной зависимости от уровня связанного Р-селектина ($R=-0,69$; $p<0,01$) и в прямой зависимости от уровня свободного Р-селектина ($R=0,86$; $p<0,01$).

Высокий уровень АТ к дцДНК в крови пациентов с СКВ коррелирует с признаками активации тромбоцитов по данным экспрессии Р-селектина. В ответ на активацию ДНК-содержащими иммунными комплексами, тромбоциты экспрессируют Р-селектин из альфа-гранул на поверхность плазматической мембраны с последующим его высвобождением в кровь в растворимой форме. Таким образом, хроническая иммунная активация тромбоцитов является важным протромботическим механизмом у пациентов с СКВ. *Работа выполнена по Программе повышения конкурентоспособности КФУ и при поддержке гранта 19-015-00075 РФФИ.*

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ ГОЛОГО ЗЕМЛЕКОПА

Е.А. Горшкова[1,2,3], А.Д. Медведовская[1], М.Ю. Высоких[3], С. Хольце4, Т.Б. Хильдебрандт4, М.С. Друцкая[1,2], С.А. Недоспасов[1,2,3]

[1]Кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; [3]Лаборатория молекулярных механизмов старения и отдел иммунологии, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [4]Отдел репродуктивной биологии, институт зоологии и дикой природы Лейбница, Берлин, Германия

Голые землекопы (*Heterocephalus glaber*) обладают рядом физиологических особенностей, сформировавшихся в ходе адаптации к подземному образу жизни. Иммунная система этих животных также была подвержена адаптации как под воздействием инфекционного давления, так и вследствие компенсации таких уникальных черт физиологии, как пойкилотермия и особый механизм контроля клеточного цикла. Тем не менее, сведений об особенностях строения и функционирования лимфоидной ткани *H. glaber* крайне мало. В настоящей работе была выполнена первичная характеристика лимфоидных органов, а также культур миелоидных клеток голого землекопа. Анализ структуры и клеточного состава лимфоидных органов *H. glaber* проводили методами гистологии и проточной цитометрии. Культуры миелоидных клеток получали из костного мозга в присутствии факторов роста и дифференцировки кроветворных клеток-предшественников мыши и человека при температурах 32°C и 37°C в стандартной и полужидкой средах. В качестве контроля во всех опытах использовали иммунные органы мыши дикого типа (линии C57Bl/6). В структуре лимфоидных органов *H. glaber* наблюдаются отличия по сравнению с мышью: меньшее абсолютное количество иммунных клеток костного мозга и селезенки, малый размер лимфоидных фолликулов. Также у *H. glaber* увеличено относительное содержание миелоидных клеток на периферии. Факторы роста кроветворных клеток-предшественников мыши и человека могут поддерживать рост миелоидных клеток *H. glaber*, однако их выживаемость и дифференцировка зависят от температуры: культуры макрофагов, полученные при 32°C, характеризуются большим содержанием клеток, экспрессирующих маркеры CD11b и CD14, чем полученные при 37°C. При культивировании костномозговых клеток-предшественников в полужидкой среде при 32°C у *H. glaber* формируется больше гранулоцитарно-моноцитарных колоний, чем при 37°C, в то время как у мыши температура влияет на размер колоний, но не на их количество. Увеличение содержания миелоидных клеток может указывать на их исключительную роль в развитии защитных реакций у *H. glaber* на фоне ограниченного вклада адаптивного иммунитета, при этом опыты *in vitro* демонстрируют специфические свойства миелоидных клеток, вероятно, связанные с характерным для вида режимом терморегуляции. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-04-02112.*

КОНТРАКТИЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Н.Г. Евтюгина[1], А.Д. Пешкова[1], С.И. Сафиуллина[2], Р.И. Литвинов[1]

[1]Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет; [2]Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Врожденные и приобретенные нарушения гемостаза являются одним из патогенетических факторов привычного невынашивания беременности (ПНБ), изучение которого важно для прогноза и профилактики акушерской патологии. Одной из наименее изученных реакций свертывания крови и тромбообразования, в том числе при акушерской патологии, является процесс спонтанного сжатия (контракции, ретракции) сгустка крови под действием активированных тромбоцитов. Для изучения кинетики контракции сгустков крови in vitro мы разработали новый аппаратный метод, который позволяет определить кинетические параметры (лаг-период, степень и скорость) сжатия сгустка, образованного в цельной цитратной крови под действием тромбина в присутствии ионов кальция. Размер сгустка фиксировали фотографически каждые 15 секунд в течение 20 минут с последующей компьютерной обработкой кинетических кривых контракции. В данной работе исследовали кровь

50 женщин с ПНБ в анамнезе в сравнении с 30 рожавшими женщинами без отягощенного акушерского анамнеза на этапе планирования беременности. Нами обнаружено достоверное угнетение контракции сгустков крови у пациенток с историей ПНБ по сравнению с контрольной группой. Об этом свидетельствуют достоверное торможение всех стадий контракции: снижение средней степени (с 43±1% до 35±1%, p<0,001) и средней скорости контракции (с 0,034±0.001 %/сек до 0,028±0.001 %/сек, p<0,001), уменьшение площади под кинетической кривой (с 310±11 усл.ед. до 249±13 усл.ед., p<0,01), а также удлинение лаг-периода (с 253±17 сек. до 196±14 сек., p<0,05) у пациенток с ПНБ и здоровых доноров, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли нарушений гемостаза в патогенезе невынашивания беременности. Угнетение контракции сгустков крови может говорить о дисфункции тромбоцитов у пациенток с ПНБ вследствие их хронической гиперактивации клеток на фоне гиперкоагуляции и тромбинемии. Кроме того, полученные данные указывают на возможность использования результатов теста кинетики контракции сгустков крови в качестве прогностического критерия риска спонтанного прерывания беременности. *Работа выполнена по Программе повышения конкурентоспособности КФУ и гранта 18-415-160004 РФФИ и РТ.*

РОЛЬ АКТИНА ТРОМБОЦИТОВ В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ СГУСТКОВ КРОВИ

Н.Г. Евтюгина[1], Р.Р. Хисматуллин[1,2], А.М. Аухадиева[2], Р.Р. Курбаналиева[2], А.З. Шакирова[2], Р.И. Литвинов[1]
[1]Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, [2]Кафедра общей патологии, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Контракция (ретракция) – это процесс сжатия и структурной реорганизации сгустков крови и тромбов под действием сократительных сил активированных тромбоцитов. Компактизация внутрисосудистого тромба уменьшает степень закупорки сосуда и улучшает локальную гемодинамику. Помимо уменьшения общего объема, контракция сгустков крови сопровождается изменением формы эритроцитов с двояковогнутой на многогранную (полиэдроциты) и их компактизацией, а также перераспределением фибрина и тромбоцитарных агрегатов из толщи сгустка на поверхность. Роль перестройки цитоскелета в процессе сокращения немышечных клеток, включая тромбоциты, до конца не ясна. Цель работы – установить зависимость изменения состава и структуры контрактированных сгустков крови от воздействия ингибитора полимеризации актина латрункулина А. Цитратная кровь здоровых доноров, не принимающих про- или антикоагулянтов, свертывалась *in vitro* путем добавления 2 мМ кальция хлорида и 1 ЕД/мл тромбина (конечные концентрации) с последующей 60-минутной инкубацией для осуществления контракции. В части образцов той же крови сгустки формировались и их контракция происходила в присутствии латрункулина А, ингибитора полимеризации актина тромбоцитов. После фиксации глутаральдегидом из всех сгустков крови готовились гистологические препараты для сравнительного морфоскопического и морфометрического изучения структуры. Установлено, что состав и структура сгустков, подвергшихся действию латрункулина А, существенно отличается от контрольных сгустков. Главным отличием было отсутствие морфологических признаков сжатия сгустков после ингибировании полимеризации актина латрункулином А, т. е. отсутствие полиэдроцитов и скопления фибрина и тромбоцитов на периферии сгустков. Результаты указывают на критически важную роль полимеризации актина тромбоцитов в их сокращении, вызывающем контракцию, или ремоделирование, сгустков крови. Модулирование динамики цитоскелета тромбоцитов может рассматриваться как потенциальная мишень противотромботической терапии. *Работа выполнена по Программе повышения конкурентоспособности КФУ и гранта №19-015-00075 РФФИ.*

ЭФФЕКТЫ МОДУЛЯЦИИ АУТОФАГИИ В СЕТЧАТКЕ ПРИ РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ У КРЫС OXYS

О.С. Кожевникова, Д.В. Телегина, Н.Г. Колосова
ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Вклад ассоциированных со старением нарушений аутофагии в патогенез возрастной макулярной дегенерации (ВМД) не вызывает сомнений, однако данные о механизмах их участия в развитии и прогрессии заболевания ограничены и противоречивы. Оценку вклада изменений аутофагии в развитие ВМД исследовали на крысах OXYS, у которых развивается ретинопатия, по клиническим признакам аналогичная ВМД. Методами электронной микроскопии, иммуногистохимии и количественной ПЦР установлено, что при прогрессии признаков ВМД в сетчатке крыс OXYS снижается скорость аутофагического потока. Ответ на модуляцию аутофагии (блокирование/индукция) на транскрипционном уровне в сетчатке у крыс OXYS выражен слабее, чем у Вистар (контроль). Существенные межлинейные различия в изменении уровня мРНК генов Atg5, Atg7, Becn1, Nbr1, Map1lc3b, p62 и Gabarapl1 в ответ на голодание выявлены в сетчатке 16-месячных крыс. Также различались у крыс OXYS и Вистар изменения экспрессии генов в ответ на ингибирование аутофагии хлорохином. Нарушения реактивности системы аутофагии подтверждает пониженное количество аутофагосом в сетчатке крыс OXYS в условиях блокирования аутофагосомно-лизосомального слияния, свидетельствующее о сниженной скорости формирования аутофагосом. Более того, у крыс OXYS снижено соотношение количества LC3+ гранул у групп с хлорохином и без него, что указывает на снижение темпов их удаления. Исследована возможность влиять на развитие ретинопатии у крыс OXYS, модулируя активность аутофагии путем изменения уровня p62 – многомерного белка, регулирующего многие клеточные функции, включая аутофагию, воспаление и апоптоз. Показано, что введение плазмиды, кодирующей p62, замедляет развитие и прогрессию ретинопатии. При этом не выявлено её влияния на содержание в сетчатке маркеров аутофагии – белков Atg7, Atg12 и p62, но показано, что инъекции плазмиды подавляют воспаление: активацию и миграцию макрофагов и микроглии, глиоз клеток Мюллера, а также характерные для ВМД структурно-функциональные изменения РПЭ. Таким образом, развитие признаков ВМД у крыс OXYS происходит на фоне снижения способности к усилению аутофагического потока в ответ на стресс. Снижение реактивности аутофагии может быть важным звеном патогенеза ВМД. *Поддержано РНФ № 18-75-00031.*

ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ПОДДЕРЖАНИЕ ПУЛА НАИВНЫХ Т ЛИМФОЦИТОВ

Т.О. Наконечная[2], Д.Б. Староверов[1], Е.М. Мерзляк, М. Израельсон[1,2], С.А Касацкая[2,3], О.В Британова[2]
Институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; [3]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Разнообразие наивных Т-лимфоцитов обеспечивает эффективную защиту организма от патогенных агентов (вирусов, бактерий), а также протектирует от развития онкологических заболеваний. Одним из ключевых факторов, способствующих нарушению Т клеточного иммунитета в пожилом возрасте, является снижение разнообразия репертуара Т-клеточных рецепторов. Инволюция тимуса и сокращение числа поступающих в тимус клеток-предшественников с возрастом приводит к снижению продукции наивных Т лимфоцитов. Как следствие, снижается индивидуальное разнообразие репертуара Т-клеточных рецепторов. Целью данной работы было исследование возможности поддержания или увеличения разнообразия пула наивных Т лимфоцитов у старых мышей. Были поставлены следующие задачи: протестировать подход по периодическому введению в кровоток пулированной фракции наивных CD4 лимфоцитов, полученной из лимфатических узлов мышей (1–2 мес) группе мышей-реципиентов (13–14 мес), в качестве альтернативного подхода, другой группе животных в возрасте 11 и далее в 14 месяцев трансплантировать тимусы из молодых мышей (1–2мес). Проанализировать репертуары ТКР наивных Т лимфоцитов и процентное содержание наивных Т клеток. В результате было показано, что введение наивных CD4 Т-лимфоцитов молодых доноров в периферический кровоток старых реципиентов не приводит к стабильному увеличению пула наивных Т-клеток. Однако трансплантация тимусов от молодых доноров мышам в возрасте 14 месяцев позволяет увеличить долю наивных CD4 лимфоцитов в периферической крови реципиентов в возрасте 22 месяца по сравнению с контрольной группой. Свойства репертуара ТКР аутологичных одно-позитивных CD4 лимфоцитов реципиентов также качественно изменились. Сравнительный анализ репертуаров ТКР выявил ряд особенностей возрастных изменений у мыши, которые ранее не были описаны в том числе отличные от наблюдаемых в репертуаре человека. Была показаны относительная эффективность трансплантации тимусов молодых реципиентов, как подход направленного поддержания разнообразия пула наивных Т клеток. *Работа поддержана грантом РНФ №16-15-00149*

ПРЕБЕТА-АПОА-I В АПОВ-ИСТОЩЕННОЙ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ЯВЛЯЕТСЯ ОСНОВНЫМ АКЦЕПТОРОМ ХОЛЕСТЕРИНА, ТРАНСПОРТИРУЕМОГО ИЗ МАКРОФАГОВ RAW 264.7

А.Д. Дергунов[1], Е.В. Носова[2], Д.Ю. Литвинов[1], Л.В. Дергунова[2]
[1]Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины МЗ РФ; [2]Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Цель: оценить роль различающихся по заряду частиц липопротеинов высокой плотности (ЛВП) в эффлюксе холестерина (ХС) из клеток. Выборка из 29 мужчин без коронарного атеросклероза разделена на три группы со сниженным (0,78±0,12 мМ, n=7), нормальным (1,21±0,12 мМ, n=12) и увеличенным (1,67±0,27 мМ, n=10) содержанием ХС-ЛВП. Группы не различались по возрасту, индексу массы тела, содержанию ХС плазмы и ХС липопротеинов низкой плотности. Распределение апоА-I – основного апобелка ЛВП – между зонами с преβ-подвижностью и α-подвижностью измерено с помощью электрофореза цельной плазмы в геле агарозы с иммунодетекцией на матрице после электропереноса из геля. Базальный, цАМФ-стимулированный и ABCA1-опосредованный эффлюкс холестерина из линии макрофагов мыши RAW 264.7 измерены после загрузки клеток флуоресцентным зондом BODIPY-ХС и их последующей инкубации с апоB-истощенной плазмой пациентов как акцептор ХС.

Содержание апоА-I в preβ-зоне (25,6±10,6 мг/дл) плазмы пациентов с увеличенным содержанием ХС-ЛВП значимо превышало аналогичную величину (15,5±6,9 мг/дл) для пациентов со сниженным содержанием ХС-ЛВП. Содержание ХС-ЛВП (0,59–2,24 мМ) и триглицеридов (ТГ) плазмы (0,59–3,42 мМ) для всей выборки являлись предикторами вариабельности содержания преβ-апоА-I во множественной регрессии. Содержание только преβ-апоА-I являлось предиктором вариабельности базального и ABCA1-опосредованного эффлюкса, тогда как содержание преβ-апоА-I и ХС-ЛВП являлись предикторами вариабельности цАМФ-стимулированного эффлюкса.

Вклад апоА-I, связанного с липопротеинами очень низкой плотности, в содержание апобелка в преβ-зоне не превышает 1% от содержания апоА- I в плазме для содержания ТГ менее 3,5 мМ и содержание апобелка, свободного от липида и связанного с преβ-ЛВП, может быть количественно измерено с помощью описанного подхода. Частицы преβ-ЛВП с высоким сродством к транспортеру ABCA1 в нестимулированных макрофагах являются первичными акцепторами ХС, тогда как цАМФ-индуцированное появление дополнительных молекул транспортера приводит к вовлеченности в эффлюкс холестерина зрелых частиц α-ЛВП с низким сродством к ABCA1. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00217.*

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОКСИЛИПИНОВ СЛЁЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ЯТРОГЕННЫХ ПАТОЛОГИЯХ РОГОВИЦЫ

В.В. Тюлина[1,3], Д.В. Чистяков[1,2], Н.В. Азбукина[1], А.А. Астахова[1], С.В. Горяинов[2], В.В. Чистяков[2], О.С. Ганчарова[1], В.Е. Бакшеева[1], С.Ю. Зайцев[3], А.А. Замятнин мл.[1,4], П.П. Филиппов[1], М.Г. Сергеева[1], И.И. Сенин[1], Е.Ю. Зерний[1,4]
[1]НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Российский университет дружбы народов; [3]Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина; [4]Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Ткани глаза находятся в зоне риска развития ятрогенных заболеваний. Повреждения роговицы могут возникать под действием УФ-облучения при распространенных эксимерлазерных операциях для коррекции близорукости, или при вмешательствах, не связанных со зрительным анализатором, являясь осложнением общей анестезии. В обоих случаях патологический

процесс включает выраженное локальное воспаление. Несмотря на то, что неспецифическая противовоспалительная терапия является обязательной составляющей послеоперационного лечения, она имеет ряд побочных эффектов и ее эффективность зачастую довольно низка. Решением проблемы является установление ферментативного механизма, обуславливающего развитие воспаления в каждом конкретном случае, и подбор противовоспалительных препаратов, таргетирующих выявленный механизм. Задача может быть решена путем определения паттернов оксилипинов – воспалительных липидов, секретируемых в слезу, которая осуществляет питающие, регуляторные и защитные функции в отношении роговицы. В работе с использованием методики количественного масс-спектрометрического определения оксилипинов в слезе, а также моделей УФ-повреждения роговицы и периоперационного синдрома сухого глаза (ПССГ) в условиях общей анестезии показано, что механизмы, определяющие развитие воспалительных процессов при указанных заболеваниях, существенно различаются. В первом случае изменения содержания оксилипинов в слезе касаются, в основном, арахидоновой кислоты и ее метаболитов, включая простагландин E2 (снижение), простагландин D2 и его производное 15d-PGJ2 (увеличение), а также гидроксиэйкозатетраеновые кислоты 12-HETE (снижение) и 5-HETE (повышение). Во втором случае рост демонстрируют метаболиты линолевой (13-HODE и 9-HODE) и альфа-линоленовой (9-HOTrE и 13-HOTrE) кислот, в то время как содержание производных арахидоновой кислоты практически не меняется. Таким образом, при рассматриваемых ятрогенных заболеваниях задействуются разные метаболические пути, которые включают преимущественную активацию циклооксигеназ (УФ-повреждения роговицы) или липоксигеназ (ПССГ), что позволяет предположить высокий потенциал ингибиторов этих ферментов при разработке соответствующей селективной терапии. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 16-15-00255.*

СИЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ В ОТВЕТ НА АДФ ОБУСЛОВЛЕНА ОБРАЗОВАНИЕМ КРУПНЫХ АГРЕГАТОВ

А.А. Филькова[1,2], Д.А.К. Гарсон[1,2], Д.Ю. Нечипуренко[1,2,3], А.Н. Свешникова[1,2,3], М.А. Пантелеев[1,2,3]
[1]Физический факультет, МГУ им. Ломоносова, Москва; [2]Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии, РАН, Москва ;[3]Национальный исследовательский медицинский институт детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

Для остановки кровотечения необходимо образование устойчивого агрегата из клеток крови – тромбоцитов. Одним из физиологических активаторов тромбоцитов является АДФ. Он считается слабым активатором тромбоцитов, в ответ на АДФ в присутствии кальция в среде при проведении экспериментов in vitro наблюдается дезагрегация тромбоцитов, однако в цитратной крови без ионов кальция агрегаты остаются стабильными. Целью данного исследования было определить механизм агрегации тромбоцитов в ответ на АДФ. Кровь здоровых доноров забиралась на гирудин, цитрат натрия либо цитрат декстрозу (разрешение этического комитета ЦТП ФХФ РАН). Отмытые тромбоциты ресуспендировались в буфере Tyrode's в присутствии или отсутствии ионов кальция. Образование агрегатов тромбоцитов наблюдалось с помощью оптической трансмиссионной агрегометрии на агрегометре Biola. Измерение уровня ионов кальция в среде измерялось по флуоресценции тромбоцитов, загруженных краской внутриклеточного кальция FLUO-5N, на цитометре NovoCyte. Тромбоциты активировались АДФ в присутствии либо отсутствии аспирина и ионов кальция. Образование прокоагулянтных тромбоцитов детектировалось с помощью флуоресцентной микроскопии тромбоцитов в присутствии флуоресцентно меченного аннексина V. В результате работы показано, что в ответ на слабый активатор АДФ у тромбоцита повышается уровень связывания с фибриногеном в несколько раз. Также наблюдается опустошение кальциевых депо. Данный результат может быть объяснен сильной активацией тромбоцитов внутри агрегатов большого размера, что подтверждается наблюдением образования прокоагулянтных тромбоцитов внутри агрегатов на снимках с микроскопа. Сильная активация в ответ на слабый активатор АДФ может быть объяснена синтезом тромбоксана A2 в центре крупных агрегатов. В экспериментах без перемешивания суспензии тромбоцитов в ответ на АДФ не наблюдалось изменение уровня внутриклеточного кальция и увеличения связывания тромбоцита с фибриногеном. Модель в Python, учитывающая образование тромбоксана A2 при формировании агрегатов большого размера, оказалась способна описать экспериментальные данные. Можно предположить, что образование агрегатов большого размера необходимое условие сильной активации в ответ на АДФ. *Исследование поддержано грантом РФФИ 17-74-20045.*

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ЭФФЛЮКС СИСТЕМЫ MacAB-2 *SERRATIA MARCESCENS* SM6

Т.В. Ширшикова[1], М.Н. Аммар[1], Л.М. Богомольная[1,2]
[1]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия; [2]Центр здоровья Техасского университета A&M, Брайан, США

Функционирование эффлюкс систем является ведущим механизмом, обеспечивающим грамотрицательным бактериям устойчивость к антимикробным препаратам. Эффлюкс системы представляют собой комплекс мембранных белков, которые функционируют как молекулярный насос, защищая таким образом клетки от токсичного действия антибиотиков. Несмотря на то, что строение и функции эффлюкс систем похожи у разных видов, механизмы их регулирования значительно различаются [Sun et al., 2014]. Биоинформационный анализ геномной последовательности *Serratia marcescens* SM6 позволил идентифицировать гомолог эффлюкс системы MacAB в локусе генома EG355_23545-23550 (далее ген macAB-2), который до настоящего времени не был исследован у S. marcescens. Информация о регуляции экспрессии эффлюкс системы MacAB-2 в *S. marcescens* на данный момент также неизвестна. Для изучения экспрессии генов эффлюкс системы MacAB-2 на основе штамма *S. marcescens* SM6 нами была создана конструкция, в которой на векторе pNN387 гены β-галактозидазы находятся под контролем промотора гена macAB-2. По результатам измерения β-галактозидазной активности штамма обнаружено, что при выращивании в бульоне Луриа-Бертани промотор оперона macAB-2 достигает своего максимума на 3-й час роста, что соответствует поздней lag-фазе. По мере достижения культуры log-фазы активность промотора снижается и остается на низком уровне на протяжении всего периода роста бактерий (9 часов). В работах Богомольной Л.М. показано, что эффлюкс система MacAB *Salmonella typhimurium* индуцируется активными формами кислорода [Bogomolnaya et al., 2013]. Нами определена экспрессия

репортерного штамма в присутвии в среде 1 мМ перекиси водорода. Показано, что при таких условиях экспрессия эффлюкс системы MacAB-2 увеличивается со второго часа культивирования и продолжает расти на протяжении всего цикла роста бактерий. Таким образом, нами показано, что эффлюкс система MacAB-2 *S. marcescens* SM6 экспрессируется во время lag-фазы в бульоне Луриа-Бертани и её экспрессия положительно регулируется присутствием перекиси водорода. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта No 18-34- 00458; за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки КФУ в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых НОЦ.*

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕЦИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ РЕНАЛАЗЫ КЛЕТКАМИ HEK293T С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОТЕОТИПИЧЕСКОГО ПЕПТИДА, МЕЧЕННОГО СТАБИЛЬНЫМИ ТЯЖЕЛЫМИ ИЗОТОПАМИ

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

Реналаза (RNLS) – недавно открытый белок, которому свойственны различные функции внутри и снаружи клеток. Внутриклеточная RNLS функционирует как FAD-зависимая оксидоредуктаза (КФ 1.6.3.5), которой для связывания FAD необходим N-концевой (сигнальный) пептид. В процессе секреции во внеклеточное пространство этот пептид отщепляется и в таком виде RNLS проявляет различные защитные некаталитические функции. Соотношение внутриклеточной и внеклеточной RNLS до сих пор не исследовано. В данной работе с использованием синтетического протеотипического пептида (100–116 остатки аминокислотной последовательности RNLS), меченного стабильными тяжелыми изотопами, проведен количественный анализ рекомбинантной RNLS человека внутри клеток HEK293T и в культуральной жидкости. Ранее нами было установлено, что в этих клетках, трансфицированных «пустым» вектором pcDNA4 myc-His, RNLS не определяется (Fedchenko et al., (2016) Kidney Blood Pressure Research, 41:593-603). В клетках HEK293T, трансфицированных вектором pcDNA-hRenI несущим RNLS, уровень рекомбинантной RNLS составлял 4 пг/мг. В культуральной среде уровень внеклеточной RNLS был существенно выше: 13,9 пг/мг. Аналогичные результаты были получены при трансфекции клеток HEK293T, вектором pcDNA-hRenI(6xHis), содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерную RNLS с С-концевым гексагистидиновым пептидом. Соотношение внеклеточный: внутриклеточный белок 3,48 свидетельствует в пользу того, что существенная порция синтезированной RNLS экспортируется из клеток наружу и, очевидно, предназначена для внеклеточного назначения. *Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы и частично поддержана грантом РФФИ № 17–04–00484.*

БИОМАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ И РЕПАРАЦИИ НЕЙРОНОВ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ В КЛИНИКЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В.Г. Пинелис[1], Е.Г. Сорокина[1], Е.Н. Арсеньева[1], Ж.Б. Семенова[3], О.В. Карасева[3], Л.М. Рошаль[3], З.В. Бакаева[1], И.А. Красильникова[1], М.М. Гончаров[1], Д.П. Бояркин[1], А.М. Сурин[1,2]
[1]Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей МЗ РФ; [2]НИИ общей патологии и патофизиологии; [3]НИИ неотложной детской хирургии и травматологии, Москва, Россия

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) остается одной из основных причин возникновения неврологических расстройств, требующих длительного лечения и реабилитации. У больных, перенесших ЧМТ различной тяжести и исходов, выявляются в крови изменения содержания белков и пептидов, которые можно использовать в качестве биомаркеров (Strathmann F.G. et al, 2014). В экспериментальных моделях (нанесение царапины на первичную культуру нейронов и повреждении участка коры головного мозга крысы) обнаружена активация рецепторов глутамата (Glu) (Mukhin A. et al, 1998; Morrison B. et al, 2011) и изменение содержания десятков белков вокруг зоны поражения (Demyanenko, Uzdensky, 2017).

У детей определяли содержание в крови белков S100B, NSE, GFAP, BDNF и аутоантител (аАТ) к NR2-подтипу рецепторов Glu в различные сроки после перенесенной ЧМТ. В экспериментальной модели ЧМТ изучали изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi m$) в ответ на царапину, а также регенерацию нейрональной сети в зоне царапины при добавлении пептида Pro-Gly-Pro.

В крови детей выявлено увеличение содержания S100B, NSE в первые трое суток после ЧМТ независимо от ее тяжести. В случаях благоприятного исхода уровень этих белков снижалось до нормы (группа 5 по ШИГ). Максимальный уровень S100B и NSE отмечался у детей с летальным исходом, причем высокие значения наблюдались на протяжении всего посттравматического периода (группа 1 по ШИГ). Высокий уровень аАТ к S100B, а также рост GFAP в первые сутки после тяжелой ЧМТ (тЧМТ) указывают на срыв компенсаторно-приспособительных иммунных механизмов и высокую проницаемость ГЭБ. При тЧМТ с летальным исходом уровень BDNF в 1-й день после травмы оказался наиболее низким и в последующем продолжал снижаться. Легкая ЧМТ и тЧМТ с полным последующим восстановлением сопровождались более высокими значениями BDNF. Механическая травма культивируемых нейронов вызывала скачок $[Ca^{2+}]_i$ и резкое падение $\Delta\Psi m$, частично связанные с активацией Glu рецепторов NR-типа. Чувствительность клеток к Glu снижалась на 3 и 7 дни после царапины. Pro-Gly-Pro способствовал восстановлению $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi m$ и повышал выживаемость нейронов после прекращения действия Glu. *Работа поддержана грантами РНФ 17-15-01487 и РФФИ 17-00-00106.*

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС

И.М. Быков, К.А. Попов, И.Ю. Цымбалюк
Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

В работе представлено исследование изменений мембранного потенциала суспензии митохондрий ткани печени в зависимости от различной длительности ишемического и последующего реперфузионного периодов. В исследовании использовали

белых нелинейных крыс-самцов (n=70) массой 220-250 г. Моделирование ишемического повреждения печени осуществляли путем пережатия аналога печеночно-двенадцатиперстной связки сосудистым зажимом. После ишемического периода длительностью 10-25 минут (с интервалом 5 минут) забирали целую печень животного для исследований без снятия зажима или после выжидания 30-минутного реперфузионного периода. Определение мембранного потенциала в суспензии митохондрий, выделенных методом дифференциального центрифугирования, осуществляли флуоресцентным методом с использованием катионного красителя сафранин О. Полученные результаты показали поэтапное снижение мембранного потенциала митохондрий, выделенных из ткани печени крыс после ишемического периода различной продолжительности. Моделирование 10-минутной сосудистой изоляции печени сопровождалось снижением мембранного потенциала на 34,6% (117,8 мВ). У животных после 15-минутной сосудистой изоляции без реперфузионного периода значение мембранного потенциала митохондрий печени было снижено в 2,9 раза (61,5 мВ). Значение мембранного потенциала достигало практически нулевых значений после 25-минутного пережатия аналога печеночно-двенадцатиперстной связки. В то же время была отмечена тенденция к восстановлению нормальных значений митохондриального мембранного потенциала в реперфузионный период, наиболее характерная для ткани печени после 10-15-минутной длительности ишемии (на 30-60%, до 102-154 мВ). Однако после 25-минутной сосудистой изоляции печени крыс, значения мембранного потенциала митохондрий не отличались друг от друга вне зависимости от наличия или отсутствия периода восстановления кровотока. Таким образом, полученные данные отражают высокую лабильность функционального состояния митохондрий при ишемически-реперфузионном повреждении гепатоцитов и могут быть использованы для изучения особенностей течения различных гипоэнергетических состояний, а также для оценки эффективности митохондриальных цитопротекторов в экспериментальной коррекции широкого спектра патологических процессов.

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ 8-oxodG В СОСТАВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ NRF2 У ПАЦИЕНТОВ С ШИЗОФРЕНИЕЙ В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ И РЕМИССИИ

А.В. Артюшин[1], Е.С. Ершова[1], Г.В. Шмарина[1], Н.Н. Вейко[1], А.В. Мартынов[1], Д.А. Пухальская[1], О.Н. Агафонова[1], М.С. Конькова[1], О.А. Долгих[1], Н.В. Захарова[2], С.В. Костюк[1]
Медико-генетический научный центр; [2]Психиатрическая клиническая больница №1 им. Н.А. Алексеева, Москва, Россия

Шизофрения это социально значимое заболевание, приводящее к снижению продолжительности жизни, на данный момент не поддающееся полному излечению. Однако, комбинация препаратов при своевременном медикаментозном лечении позволяет добиваться ремиссии в большинстве случаев. С научной и медицинской точек зрения крайне важным является понимание процессов, инициирующих болезнь, а также изучение молекулярных звеньев её патогенеза. В исследовании участвовали 61 пациент с параноидальной формой шизофрении и 80 здоровых добровольцев соответствующего пола и возраста. Уровень окислительных модификаций (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; 8-oxodG) в составе внеклеточной ДНК (вкДНК) исследовали методом иммуноблоттинга. Содержание рибосомных и теломерных повторов в образцах ДНК – методом нерадиоактивной количественной гибридизации. Уровень экспрессии мастер-регулятора антиокислительного ответа транскрипционного фактора NRF2 в лимфоцитах периферической крови – методом проточной цитофлуориметрии. У больных шизофренией по сравнению со здоровым контролем было выявлено наличие статистически значимого ($p<0,01$) повышения концентрации окисленной вкДНК в плазме крови. Поскольку ГЦ-богатые последовательности в составе вкДНК наиболее устойчивы к нуклеазному гидролизу, происходит накопление ГЦ-богатых повторяющихся последовательностей генома в составе вкДНК – теломерного повтора ($p<0,001$), рибосомного повтора ($p<0,001$). У пациентов с шизофренией наблюдается статистически значимое увеличение теломерного и рибосомного повторов в составе вкДНК по сравнению со здоровыми донорами ($p<0,01$). Повышенный уровень ГЦ-богатых последовательностей может объяснить высокий уровень вкДНК с окислительной модификацией (8-oxodG). В выборке больных шизофренией при обострении было обнаружено снижение экспрессии NRF2. Через 1 месяц интенсивной терапии у пациентов, достигших ремиссии, уменьшился уровень окисленной вкДНК в плазме крови и возрос уровень экспрессии NRF2 в лимфоцитах периферической крови. *Работа поддержана грантом РФФИ 17-29-06017 офи_м*

ВЛИЯНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ЦИТОХАЛАЗИНОМ В МИКРОВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА РАЗВИТИЕ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

О.А. Неустроева, А.М. Аймалетдинов, С.К. Клетухина, С.В. Курбангалеева, А.А. Ризванов, М.О. Гомзикова
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Микровезикулы – это межклеточные медиаторы округлой структуры, которые состоят из цитоплазмы и окружающего её билипидного слоя. Естественные МВ мезенхимных стволовых клеток (МСК) обладают иммуномодулирующими свойствами: сдвигают баланс в сторону образования регуляторных Т-клеток, подавляют активность натуральных киллеров, снижают выработку антител В-клетками и ингибируют дифференцировку моноцитов в дендритные клетки. Данные свойства говорят о том, что как и МСК, МВ могут быть использованы при острой реакции «трансплантат против хозяина» для снижения иммунного конфликта между клетками донора и реципиента и при аутоиммунных заболеваниях для супрессивного воздействия на Т-лимфоциты. В отличие от стволовых клеток (СК), которые имеют риск закупорки сосудов, МВ являются наиболее безопасным и перспективным инструментом для лечения иммунных расстройств. Однако, на данный момент не существует способа получения терапевтически значимого количества естественных микровезикул в короткие сроки. В связи с актуальностью данного вопроса мы исследовали влияние внутривенной инъекции (в.в) аллогенных индуцированных цитохалазином В МВ (МВ-ЦВ) на развитие клеточного иммунного ответа. На первом этапе работы методом проточной цитофлуориметрии был подтвержден мезенхимный иммунофенотип клеток выделенных из жировой ткани мыши. По результатам иммуноокрашивания на МСК мыши были детектированы специфичные поверхностные маркеры стволовых клеток (Sca-1$^+$, CD49e$^+$, CD44$^+$) и не обнаружена экспрессия маркера, характерного для гематопоэтических СК (CD45$^-$). Далее, путем обработки МСК цитохалазином В получали МВ. Молекулярный состав МВ-ЦВ МСК и МСК, анализировали при помощи Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad, USA). Полученные данные подтвердили наличие схожих биоактивных молекул у МВ-ЦВ МСК и МСК. Далее, мы оценивали

влияние в.в инъекции аллогенных МСК или МВ-ЦВ МСК на активность нейтрофилов и макрофагов. Результаты показали, что инъекция МСК или МВ-ЦВ МСК не повлияла на активность нейтрофилов по сравнению с контрольными мышами. В случае с макрофагами была обнаружена тенденция к снижению фагоцитарной активности. Таким образом, мы установили, что МВ-ЦВ МСК обладают сходным с родительскими МСК иммунофенотипом, молекулярным составом, а также сдерживают развитие воспалительной реакции.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ AhR- И NF-kB-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ОТДЕЛАХ МОЗГА И СЕТЧАТКЕ ПРЕЖДЕВРЕМЕННО СТАРЕЮЩИХ КРЫС OXYS

М.Л. Перепечаева, Д.В. Телегина, А.Ю. Гришанова
[1]НИИ экспериментальной и клинической медицины, ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины;
[2]ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Преждевременно стареющие крысы OXYS – перспективная модель дегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера и возрастной макулярной дегенерации), патогенез которых связан с воспалением. Противовоспалительным потенциалом обладает β-нафтофлавон (BNF) – лиганд арилгидрокарбонового рецептора (AhR), транскрипционного фактора и ключевого участника сигнального пути. AhR участвует в биотрансформации ксенобиотиков, индуцируя цитохром P450 (CYP1A1), и в таких эндогенных процессах, как регуляция иммунных и воспалительных реакций и процессов развития. Сигнальный путь AhR взаимодействует с путем ядерного фактора NF-κB, который также регулирует процессы развития, иммунный и воспалительный ответ. Центральным в регуляции воспалительных реакций является классический путь NF-κB, с участием IκB-киназного комплекса, а один из альтернативных путей подразумевает функциональную связь субъединицы NF-κB RelB с AhR. В большинстве нейронов, созревающих астроцитах и сетчатке глаза локализуется трансформирующий фактор роста-альфа (TGF-α), играющий многофункциональную роль в центральной нервной системе, включая обеспечение нейротропных свойств и пролиферацию нейроэпителиальных клеток сетчатки. В данной работе было оценено влияние BNF на уровень экспрессии генов AhR- и NF-kB-зависимых сигнальных путей – AhR, NF-κB, RelB, CYP1A1, а также TGF-α методом цифровой капельной и реал-тайм ПЦР в сетчатке глаза, префронтальной коре (ПФК) и гиппокампе крыс Вистар и OXYS возрастом 5 мес. BNF вводили внутрибрюшинно ежедневно в течение 3 суток в дозе 40 мг/кг. Уровень мРНК CYP1A1 был повышен в 1,5-3 раза в группах крыс, получавших BNF, а уровень мРНК AhR, NF-κB и RelB не различался между группами. TGF-α был повышен в 1,5 раза в ПФК и сетчатке крыс OXYS, получавших BNF, по сравнению с контрольными крысами OXYS. Результаты показывают, что классический AhR-зависимый путь сигнальной трансдукции успешно функционирует в тканях мозга и сетчатке крыс, а альтернативный AhR/RelB путь активации NF-κB, по-видимому, в этих тканях не актуален. Данные об увеличении уровня мРНК TGF-α под действием BNF у крыс OXYS позволяют сделать заключение о фармакологическом потенциале лиганда AhR для демпирования дегенеративных процессов, связанных с возрастом *Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Протеомный анализ» НИИМББ ФИЦ ФТМ.*

МЕХАНИЗМЫ ПОТЕРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ПОЧКИ

Е.Ю. Плотников, Н.В. Андрианова, С.С. Янкаускас, И.Б. Певзнер, Л.Д. Зорова, В.А. Попков, Д.Н. Силачев, Д.Б. Зоров
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В, Ломоносова, Москва, Россия

Одной возраст-ассоциированных патологий является острое почечное повреждение (ОПП), с которым сталкивается около 20% госпитализированных больных. Выявлен ряд нефропротекторных воздействий, таких как ишемическое прекондиционирование (ИПК) и ограничение калорийности питания (ОКП), однако, их эффективность не проверена на старых животных, что затрудняет трансляцию этих подходов в клинику. Целью данной работы было исследование влияния старения на механизмы ишемической толерантности почки. Было исследовано нефропротекторное действие ОКП и ИПК у молодых и старых животных при ишемии/реперфузии (И/Р) почки. Почку подвергали 40-мин ишемии с предварительным ИПК (4 цикла по 15 с ишемии и 15 с реперфузии) или ОКП до 65% от нормы в течение месяца. Для оценки ОПП через у животных измеряли концентрацию креатинина и мочевины в крови, а также определяли уровень белка NGAL в моче. И/Р почки приводила к развитию ОПП у молодых и старых крыс (рост концентрации креатинина и мочевины крови, и уровня NGAL в моче). Оба типа нефропротекторного воздействия уменьшали выраженность ОПП у молодых животных, однако не оказывали защитного действия на старых крыс. Для анализа механизмов, которые могут быть ответственны за потерю эффективности нефропротекции, были исследованы процессы аутофагии и митофагии в почках молодых и старых животных в норме, при И/Р и после ИПК или ОКП. У молодых животных наблюдали активацию аутофагии после И/Р: росло количество лизосом, увеличивалось соотношение LC3I/LC3II. У старых крыс И/Р не приводила к таким изменениям. Базальная активность аутофагии при старении уменьшалась. Измерение соотношения LC3II/LC3I и окрашивание лизосомальным зондом показали, что у молодых животных после ОКП наблюдается более выраженная активация аутофагии. Интенсивность митофагии, которую определяли по уровню белка PINK-1, также была выше у молодых крыс. В клетках, выделенных из почек старых животных, наблюдался более низкий митохондриальный потенциал, высокий уровень окислительного стресса и большее количество гранул липофусцина. Таким образом, оба подхода вызывают индукцию ишемической толерантности почки у молодых, но не у старых крыс. Потеря эффективности нефропротекции может быть связана с нарушением механизмов аутофагии и митофагии. *Работа поддержана грантом РНФ #18-15-00058.*

ПРИЗНАКИ СИСТЕМНОГО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С РАССТРОЙСТВА АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Ю.М. Чудакова[1], Н.В. Шаронова[5], Г.В. Шмарина[1,3], С.А. Канонирова[1,5], Е.С. Ершова[1,4], Н.В. Симашкова[2], С.Г. Никитина[2], Л.Н. Пороховник[1], С.В. Костюк[1,4]

[1]Медико-генетический научный центр; [2]Научный центр психического здоровья; [3]НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора; [4]НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии; [5]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

Обострение психических и поведенческих расстройств (депрессия, тревожность, посттравматический синдром, шизофрения), как правило, сопровождается развитием системного оксидативного стресса. Цель данной работы состояла в исследовании маркеров оксидативного стресса и оценки уровня активности антиоксидантных механизмов у пациентов с расстройства аутистического спектра (РАС) различной степени тяжести. В исследовании принимали участие 132 пациента в возрасте 4-12 лет (90 мальчиков); у 62 детей заболевание протекало в легкой или умеренной форме (Группа 1), 70 пациентов страдали тяжелой формой РАС (Группа 2). Контрольная группа включала 27 здоровых детей соответствующего возраста. Уровень оксидативного стресса оценивали по содержанию 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина (8-oxodG) в составе внеклеточной (вк)ДНК, выделенной из образцов плазмы. Об активности антиоксидантных механизмов судили по уровню экспрессии белка NRF2 мононуклеарами периферической крови. У пациентов с тяжелой формой РАС было обнаружено существенное (на два порядка) повышение уровня 8-oxodG в составе вкДНК. Так, средний уровень 8-oxodG в составе вкДНК пациентов с тяжелой формой РАС был равен 638,3±522,4 отн.ед. vs 3,3±2,1 (Контроль; $p<0,0001$) и 4,8±2,4 отн.ед. (Группа 2; $p<0,0001$). На фоне системного оксидативного стресса у больных с тяжелой формой РАС было обнаружено статистически значимое повышение уровня экспрессии белка NRF2 мононуклеарами периферической крови. Средний уровень экспрессии NRF2 у этой группы пациентов был в 1,8-2 раза выше, чем соответствующие параметры у здоровых детей и у пациентов Группы 1. Таким образом, полученные результаты показывают, что у пациентов с тяжелой формой РАС развивается системный оксидативный стресс и активируются механизмы антиоксидантной защиты. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № № 17-04-01587 А, и в рамках государственного задания Минобрнауки России*.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У КРЫС С ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ КОРРЕКЦИИ

Х.П. Бербериди, И.М. Быков, И.Ю. Цымбалюк, К.А. Попов

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

В работе представлено исследование метаболических нарушений и митохондриальной дисфункции у крыс на фоне хронической алкогольной интоксикации. Проведенные исследования показали увеличение активности ЛДГ в 2,5 раза и АЛТ в 1,7 раза в плазме крови животных после 2-х месячной алкоголизации, что характеризует развитие цитолитического синдрома, прежде всего поражения печени. Оценка состояния некоторых показателей антиоксидантной системы крови показала снижение на 29% концентрации восстановленной формы глутатиона, снижение активности каталазы на 31% и увеличение активности ГПО на 50% у крыс группы сравнения, относительно контрольных цифр. Результаты исследования мембранного потенциала митохондрий, выделенных из печени крыс, показали развитие митохондриальной дисфункции при хронической алкогольной интоксикации средствами. Средний мембранный потенциал суспензии митохондрий выделенных из печени крыс 2-й группы был снижен на 37% относительно контрольных значений (180,2 (172,3/185,6) мВ). Сравнительное исследование эффективности различных серусодержащих средств на модели хронической алкогольной интоксикации показало преимущество парентерального введения адеметионина, оказывающего выраженное гепатопротекторное, антиоксидантное действие, выражающееся также поддержанием адекватного функционального состояния митохондрий. Введение животным незаменимой аминокислоты метионина, предшественника адеметионина, не оказывало в условиях проведения эксперимента цитопротекторного действия. Это может быть связано с введением метионина на фоне уже имеющихся выраженных нарушений функций печени, в том числе ее биоэнергетики, что подтверждается сниженным значением мембранного потенциала митохондрий. При этом, вероятно, нарушается образование его активной формы, требующее затраты АТФ. Последнее предположение косвенно подтверждается усугублением митохондриальной дисфункции на фоне введения крысам метионина в условиях 2-х месячной алкогольной интоксикации. Введение липоевой кислоты оказывало выраженное антиоксидантное действие, но цитопротекторные эффекты были слабо выражены. Вероятно, что ведущее значение для коррекции метаболических нарушений при хронической алкогольной интоксикации имеет поддержка детоксикационной и биосинтетической функции печени.

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА X ВИРУСА ГЕПАТИТА В НА МОРФОЛОГИЮ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ HepG2

И.И. Галкин[1], К.М. Березина[2], О.Ю. Плетюшкина[1], Р.А. Зиновкин[1], Б.В. Черняк[1]

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

Хроническая инфекция вирусом гепатита В является основной причиной развития гепатоцеллюлярной карциномы. Считается, что белок X этого вируса (HBx) играет ключевую роль в индукции окислительного стресса и в канцерогенезе. Есть данные о способности HBx изменять эпигенетическую регуляцию хозяйских генов за счёт гиперметилирования их промоторов. В этих процессах, возможно, участвуют активные формы кислорода (АФК): при гепатоклеточной карциноме окислительный стресс вызывает гиперметилирование в промоторах каталазы и Е-кадгерина, в результате чего снижается экспрессия этих белков. Для изучения механизмов регуляции экспрессии ключевых генов, участвующих в канцерогенезе мы сделали конструк-

цию с HBx на основе лентивирусного вектора. В качестве модельной культуры использовали клетки линии HepG2. Экспрессию оценивали с помощью ПЦР в реальном времени, в качестве контроля использовали конструкцию, с мутантным нефлуоресцирующим GFP. Клетки, экспрессирующие HBx отличались более вытянутой, фибробластоподобной формой, в то время, как контрольные клетки демонстрировали более округлую, эпителиоидную форму. HBx также вызывал в HepG2 окислительный стресс, повышая уровень АФК по сравнению как с диким типом (на 50%), так и с клетками, трансдуцированными контрольной конструкцией (на 20-30%). Экспрессия HBx не приводила к значительному изменению паттерна метилирования промоторов генов каталазы и Е-кадгерина; а также не уменьшала относительный уровень их мРНК. Экспрессия ряда других потенциальных генов-мишеней для белка HBx также менялась незначительно. В то же время, в наших образцах значительно менялся уровень экспрессии гена актина, и использование этого гена как референсного (что свойственно многим работам в данной области) позволило бы сделать ложный вывод о значительном снижении уровня экспрессии каталазы и Е-кадгерина в клетках, экспрессирующих HBx. Полученные данные подтверждают действие HBx как индуктора окислительного стресса, но вместе с тем опровергают данные о действии HBx на экспрессию и эпигенетическую модификацию генов Е-кадгерина в клетках HepG2. *Работа поддержана грантом РФФИ № 17-00-00088.*

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ НАРУШЕНИЯ НУТРИТИВНОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ

И.В. Горбачева, Ф.Н. Гильмиярова, Д.В. Печкуров
Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, Самара, Россия

Последние десятилетия в Российской Федерации, как и во всем мире, увеличивается количество детей с нарушениями нутритивного статуса. Одним из наиболее клинически важных таких нарушений является гипотрофия – хроническое расстройство питания с дефицитом массы тела относительно роста. К нему может привести как недостаточное поступление в организм питательных веществ, так и нарушение их ассимиляции и метаболизма. Наиболее значимо нарушение питания для детей раннего возраста в связи с высокими темпами роста и активностью обменных процессов, требующих достаточного нутритивного обеспечения энергии. Цель нашего исследования- дать оценку показателей углеводно-липидного обмена у детей первого года жизни. Материал и методы исследования. Обследовано 52 ребенка первых трех лет жизни с гипотрофией, госпитализированных в СОКБ им. В.Д. Середавина и составившие основную группу, группу сравнения составили 30 детей с нормальным физическим развитием без острых и обострения хронических заболеваний. При сопоставлении данных у детей с гипотрофией с группой сравнения, выявлено напряжение в системе анаэробного метаболизма и формирования резервных макроэргических субстратов. В частности, увеличена активность лактатдегидрогеназы, восстанавливающей пируват в лактат и окисляющей лактат в пируват. Высокая активность лактатдегидрогеназы, восстанавливающей пируват в лактат, приводит к нарастанию уровня молочной кислоты в крови. Наблюдаемый лактатацидоз в таких пределах не истощает, возможно, щелочные резервы, является компенсированным. Характерно, что содержание ацилглицеринов у детей с гипотрофией существенно ниже, чем в группе сравнения, следовательно, при этом состоянии отмечается недостаточное обеспечение организма такими энергоемкими субстратами, как нейтральные жиры. Таким образом, необходимо отметить, что при гипотрофии существенно снижается уровень пирувата, лактата, активность ЛДГ в реакции лактат-пируват, в меньшей степени активность ЛДГ в реакции пируват-лактат. Есть основание полагать, что при гипотрофии низкая активность завершающего этапа гликолиза и неадекватная перестройка липидного обмена. Полученные в ходе работы данные закладывают основу для дифференцированного применения метаболических средств в комплексном лечении гипотрофии.

АНАЛИЗ ИДИОТИПИЧЕСКИХ И АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ БЕНЗО[А]ПИРЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

И.С. Гребенщиков, А.Е. Студенников, А.Н. Глушков, В.А. Устинов
ФИЦ угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия

Бензо[а]пирен (Бп) является представителем полициклических ароматических углеводородов. При попадании в организм человека Бп образует аддукты, которые могут выступать в качестве триггеров онкогенных заболеваний. В нашей работе, при помощи прямого полуколичественного иммуноферментного анализа (ИФА), мы проанализировали идиотипические (Ат1) и антиидеотипические (Ат2) антитела против Бп в сыворотках крови здоровых людей (227 человек) и пациентов больных раком легкого (557 человек). Так же в исследовании участвовала группа людей с повышенным фактором риска онкозаболеваний – работники угольной промышленности (52 человек). Для определения Ат1 и Ат2 в лунках иммунологического планшета были иммобилизованы конъюгат Бп-БСА и идиотипическое одноцепочечное мышиное антитело против Бп. По результатами ИФА все доноры были распределены в группы по признакам: пол, возраст и курение. При помощи построенной математической модели логистичекой регрессии были проанализированы случайные выборки здоровых людей и пациентов с раком легкого, а также группа работников угольного предприятия. Анализ с высокой вероятностью подтвердил состояние здоровья людей, а группа шахтеров, как группа риска, оказалась в промежуточном положении. Статистический анализ полученных результатов позволил сделать следующие выводы: 1) Наиболее эффективным для прогнозирования рака лёгкого выступил параметр соотношения Ат2Ат1. 2) Уровни Ат1 и Ат2 у мужчин и женщин различались: при прогнозировании рака легкого для мужчин значительное отличее между здоровыми и больными было по Ат2, у женщин – по Ат1. 3) Возраст испытуемых влиял на прогнозирование рака легкого моделью логистической регрессии наравне с предикторами: Ат1, Ат2 и полом. 4) Фактор курения влиял на уровни Ат1 и Ат2 и прогнозирование рака легкого только во взаимосвязи с полом и возрастом. Разработка количественного анализа Ат1 и Ат2 против Бп в сыворотке крови людей стала следующим шагом нашей работы. Для этого были использованы одноцепочечные человеческие Ат1 и Ат2. При помощи мультиплексных технологий был проведен конкурентный анализ. Метод анализа продемонстрировал низкий коэффициент вариабельности для каждой анализируемой сыворотки и высокий уровень специфичности. *Работа поддержана грантом РНФ №16-15-00034.*

ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ПОДДЕРЖАНИЕ ПУЛА НАИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Т.О. Наконечная[2], Д.Б. Староверов[1], Е.М. Мерзляк, М. Израельсон[1,2], С.А Касацкая[2,3], О.В Британова[2]
Институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [3]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Разнообразие наивных Т-лимфоцитов обеспечивает эффективную защиту организма от патогенных агентов (вирусов, бактерий), а также протектирует от развития онкологических заболеваний. Одним из ключевых факторов, способствующих нарушению Т-клеточного иммунитета в пожилом возрасте, является снижение разнообразия репертуара Т-клеточных рецепторов. Инволюция тимуса и сокращение числа поступающих в тимус клеток-предшественников с возрастом приводит к снижению продукции наивных Т лимфоцитов. Как следствие, снижается индивидуальное разнообразие репертуара Т-клеточных рецепторов. Целью данной работы было исследование возможности поддержания или увеличения разнообразия пула наивных Т лимфоцитов у старых мышей. Были поставлены следующие задачи: протестировать подход по периодическому введению в кровоток пулированной фракции наивных CD4 лимфоцитов, полученной из лимфатических узлов мышей (1–2 мес) группе мышей-реципиентов (13–14 мес), в качестве альтернативного подхода, другой группе животных в возрасте 11 и далее в 14 месяцев трансплантировать тимусы из молодых мышей (1–2 мес). Проанализировать репертуары ТКР наивных Т лимфоцитов и процентное содержание наивных Т клеток. В результате было показано, что введение наивных CD4 Т-лимфоцитов молодых доноров в периферический кровоток старых реципиентов не приводит к стабильному увеличению пула наивных Т-клеток. Однако трансплантация тимусов от молодых доноров мышам в возрасте 14 месяцев позволяет увеличить долю наивных CD4 лимфоцитов в периферической крови реципиентов в возрасте 22 месяца по сравнению с контрольной группой. Свойства репертуара ТКР аутологичных одно-позитивных CD4 лимфоцитов реципиентов также качественно изменились. Сравнительный анализ репертуаров ТКР выявил ряд особенностей возрастных изменений у мыши, которые ранее не были описаны в том числе отличные от наблюдаемых в репертуаре человека. Была показаны относительная эффективность трансплантации тимусов молодых реципиентов, как подход направленного поддержания разнообразия пула наивных Т клеток. *Работа поддержана грантом РНФ №16-15-00149*

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЛИНИИ P19 ПРИ ДОБАВЛЕНИИ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Д.С. Орлов, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая
Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Томск, РФ

Опухолевый рост характеризуется изменением редокс-статуса клеток с последующим дисбалансом антиоксидантной системы на фоне нарушения регуляции клеточной гибели при гипоксии. Глутатион принимает участие в поддержании окислительно-восстановительного баланса и обеспечивает выживание опухолевых клеток в условиях окислительного стресса. Цель – оценить состояние системы глутатиона в опухолевых клетках линии P19 при добавлении N-ацетилцистеина в условиях гипоксии. Материал и методы. Объектом исследования служила опухолевая клеточная линия P19 (тератокарциномы мыши), полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Россия). Опухолевые клетки культивировали адгезивным методом в стандартной питательной среде. Для достижения поставленной цели использовали предшественник синтеза глутатиона *de novo* – N-ацетилцистеин (NAC) в конечной концентрации 5 мМ. Гипоксию моделировали в специальной камере «Hypoxia incubator chamber». Группа 1 – опухолевые клетки, культивированные в условиях гипоксии без дополнительного добавления NAC; группа 2 – опухолевые клетки, культивированные в условиях гипоксии при добавлении NAC. Методом проточной цитофлуориметрии определяли содержание АФК. Концентрацию тиоловых групп белков, восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона измеряли спектрофотометрически. Величину соотношения GSH/GSSG рассчитывали как показатель редокс статуса клеток. Результаты. Добавление NAC в среду культивирования опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии сопровождалось достоверно значимым увеличением содержания тиоловых групп белков в 1,2 раза ($p<0,05$), снижением концентрации АФК в 1,1 раза ($p<0,05$), на фоне сопоставимых значений содержания восстановленного и окисленного глутатиона, величины соотношения GSH/GSSG по сравнению с соответствующими показателями в группе 1. Таким образом, система глутатиона является важным регулятором редокс статуса опухолевых клеток линии P19 при гипоксии.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ ГИДРОЛИЗУЮЩИХ ОСНОВНОЙ БЕЛОК МИЕЛИНА: БИОХИМИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Д.А. Паршукова[1], Л.П. Смирнова[1], В.Н. Бунева[2], Е.Г. Корнетова [1,3], С.А. Иванова[1]
[1]НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН, Томск, [2]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [3]Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Томск, Россия

Шизофрения является мультифакториальным заболеванием, в основе патогенеза которого по современным представлениям лежит нарушение нейротрансмиттерных процессов в ЦНС, тем не менее биохимические и иммунологические изменения так же остаются предметом многочисленных исследований. В исследование было включено 65 пациента с шизофренией, 31 пациент в ремиссии и 24 человека в качестве группы контроля. Выделение IgG из сыворотки крови проходило методом аффинной хроматографии на колонке с Protein-G Sepharose. Принадлежность изучаемой активности непосредственно IgG была подтверждена электрофоретической гомогенностью; высокоэффективной гель–фильтрацией при pH 2,6; определением активности *in situ*. Протеолитическая активность АТ оценивалась в реакции гидролиза ОБМ методом электрофореза в ПААГ, для олигопептидов – методом ТСХ. Глубину гидролиза оценивали по убыли субстрата в опыте по сравнению с контролем и выражали в единицах удельной активности (мг ОБМ/мг IgG/ ч). В результате исследования показано, что IgG пациентов с

шизофренией гидролизуют основной белок миелина (ОБМ) и его пептиды ОП-21, ОП-25. Степень гидролиза ОБМ АТ больных шизофренией – 0,747 [0,00;1,76] мг ОБМ/мг IgG/ч в 5 раз превосходящую таковую у здоровых лиц – 0,00 [0,00;0,37] мг ОБМ/мг IgG/ч, и достоверно снижается в период ремиссии 0,656 [0,279;0,873] мг ОБМ/мг IgG/ ч. По данным ингибиторного анализа АТ представлены смесью протеаз серинового типа и маталлопротеаз, являются кальций-зависимыми протазами (эффективные ингибиторы ЭДТА и PMSF). Увеличение уровня активности IgG согласуется с повышением уровня АТ к ОБМ. Уровень содержания АТ к ОБМ у пациентов с шизофренией 0,08±0,039 ед. А450 в 2 раза превышал уровень АТ у здоровых лиц 0,04±0,017 ед. А450 (p=0,0014). Максимальный уровень активности был выявлен при непрерывном типе течения шизофрении (1,810 мг ОБМ / мг IgG / 1 час). С увеличением продолжительности болезни наблюдалось повышение УА ОБМ-гидролизующих IgG (p=0,037). Максимальная протеолитическая активность была представлена в группе с длительностью шизофрении более 13 лет (1,53 [1,0;4,35] мг ОБМ/ мгIgG/ч). *Работа поддержана грантом РНФ №18-15-00053 «Поиск периферических маркёров, ассоциированных с нарушением миелинизации головного мозга и патогенезом заболевания при шизофрении»2018-2020 гг.*

РОЛЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ В ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ

К.А. Попов, И.М. Быков, И.Ю. Цымбалюк, О.В. Дьяков
Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

Ключевые нарушения при ишемически-реперфузионном синдроме связаны с переходом на анаэробное энергообеспечение клетки и усиленной генерацией свободных радикалов. Эти процессы непосредственно связаны с метаболическими изменениями, происходящими в матриксе и на внутренней мембране митохондрий. Одним из основных показателей функционального состояния митохондрий является мембранный потенциал, который обеспечивает сопряжение окисления и фосфорилирования. Нарушения функционального состояния митохондрий уже на ранних этапах проявляются снижением способности генерировать мембранный потенциал, что может быть связано как с нарушением цепи переноса электронов, так и с нарушением целостности внутренней мембраны, действием разобщителей и другими причинами. Исследование изменений мембранного потенциала митохондрий печени показало снижение на 40% данного показателя уже при 10-минутной васкулярной эксклюзии, которая воспроизводилась пережатием аналога печеночно-двенадцатиперстной связки у крыс. Увеличение длительности васкулярной эксклюзии печени сопровождалось прогрессирующим снижением рассматриваемого показателя, а при 25-минутной длительности ишемического периода значение митохондриального мембранного потенциала снижалось практически до нуля. Восстановление кровотока в соответствии с классическими представлениями сопровождается интенсификацией свободнорадикальных процессов, что должно усугублять митохондриальную дисфункцию. При этом исследование митохондрий гепатоцитов, подвергшихся васкулярной эксклюзии, после 10-минутного периода восстановления кровотока не сопровождалось существенными изменениями мембранного потенциала, относительно значений, полученных сразу после завершения ишемического периода. После 30-минутного реперфузионного периода было зафиксировано восстановление анализируемого показателя при длительности ишемического периода 10-15 минут. 20-25-минутная длительность васкулярной эксклюзии не сопровождались статистически значимыми изменениями мембранного потенциала митохондрий после 10-, 30- или 50-минутной реперфузии. Представленные данные могут быть использованы для изучения особенностей течения различных гипоэнергетических состояний и для оценки эффективности цитопротекторов в экспериментальной коррекции митохондриальной дисфункции.

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

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

Пролиферация клеток – сложно регулируемый процесс, требующий своевременной наработки и деградации ряда белковых молекул, основная роль среди которых принадлежит циклинам и циклинзависимым протеинкиназам. Моделирование окислительного стресса (ОС), сопровождающего различные социально-значимые патологии, может быть использовано для установления роли карбонильных производных белков в регуляции пролиферации клеток эпителия молочной железы. Цель исследования: оценить участие карбонильных производных белков в распределении клеток HBL-100 по фазам клеточного цикла при индуцированном ОС. Эксперименты выполнены на клетках эпителия молочной железы человека (HBL-100). Развитие ОС, индуцированного H2O2 (0,3 мМ), в клетках HBL-100 оценивали по содержанию активных форм кислорода (АФК) и величине отношения восстановленного глутатиона к окисленному, отражающей редокс-статус клеток. В интактных клетках и при действии H2O2 оценивали концентрацию карбонильных производных белков и распределение клеток по фазам клеточного цикла. Нами было установлено, что H2O2 вызывает развитие ОС в клетках HBL-100, сопровождающегося увеличением в 2,8 раза (p<0,01) концентрации АФК и снижением в 1,7 раза (p<0,01) редокс-статуса по сравнению с интактной культурой. На фоне индукции ОС в клетках HBL-100 выявлено увеличение в 4,4 раза (p<0,01) содержания карбонильных производных белков по сравнению с интактными. Развитие ОС под действием H2O2 в клетках HBL-100 приводило к увеличению в 1,2 раза (p<0,01) количества клеток, находящихся в S фазе клеточного цикла и снижению в 1,5 раза (p<0,01) – в G2/M фазах, по сравнению с интактной культурой. На фоне ОС генерированные активные формы кислорода могут приводить к повреждению макромолекул, в том числе белков-регуляторов пролиферации: циклинов и циклинзависимых протеинкиназ. Карбонилирование белков, в том числе регуляторов пролиферации, приводит к изменению их пространственной конфигурации, нарушению способности взаимодействовать друг с другом, что способствует их деградации и в конечном итоге снижению пролиферативной активности

клеток. Полученные данные позволят использовать предложенную модель для установления молекулярных механизмов нарушений пролиферации клеток в условиях свободнорадикального окисления при социально-значимых патологиях различного генеза.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ЭФФЛЮКС СИСТЕМЫ MacAB-2 *SERRATIA MARCESCENS* SM6

Т.В. Ширшикова[1], М.Н. Аммар[1], Л.М. Богомольная[1,2]
[1]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия; [2]Центр здоровья Техасского университета A&M, Брайан, США

Функционирование эффлюкс систем является ведущим механизмом, обеспечивающим грамотрицательным бактериям устойчивость к антимикробным препаратам. Эффлюкс системы представляют собой комплекс мембранных белков, которые функционируют как молекулярный насос, защищая таким образом клетки от токсичного действия антибиотиков. Не смотря на то, что строение и функции эффлюкс систем похожи у разных видов, механизмы их регулирования значительно различаются [Sun et al., 2014]. Биоинформационный анализ геномной последовательности *Serratia marcescens* SM6 позволил идентифицировать гомолог эффлюкс системы MacAB в локусе генома EG355_23545-23550 (далее ген macAB-2), который до настоящего времени не был исследован у S. marcescens. Информация о регуляции экспрессии эффлюкс системы MacAB-2 в *S. marcescens* на данный момент также неизвестна. Для изучения экспрессии генов эффлюкс системы MacAB-2 на основе штамма *S. marcescens* SM6 нами была создана конструкция, в которой на векторе pNN387 гены β-галактозидазы находятся под контролем промотора гена macAB-2. По результатам измерения β-галактозидазной активности штамма обнаружено, что при выращивании в бульоне Луриа-Бертани промотор оперона macAB-2 достигает своего максимума на 3-й час роста, что соответствует поздней lag-фазе. По мере достижения культуры log-фазы активность промотора снижается и остается на низком уровне на протяжении всего периода роста бактерий (9 часов). В работах Богомольной Л.М. показано, что эффлюкс система MacAB *Salmonella Typhimurium* индуцируется активными формами кислорода [Bogomolnaya et al., 2013]. Нами определена экспрессия репортерного штамма в присутствии в среде 1 мМ перекиси водорода. Показано, что при таких условиях экспрессия эффлюкс системы MacAB-2 увеличивается со второго часа культивирования и продолжает расти на протяжении всего цикла роста бактерий. Таким образом, нами показано, что эффлюкс система MacAB-2 *S. marcescens* SM6 экспрессируется во время lag-фазы в бульоне Луриа–Бертани и её экспрессия положительно регулируется присутствием перекиси водорода. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта No 18-34- 00458; за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки КФУ в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых НОЦ.*

КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

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

Целью исследования было изучение фармакологической коррекции метаболических и иммунных нарушений при экспериментальной хронической алкогольной интоксикации. Исследования проведены на крысах-самцах Вистар согласно правилам лабораторной практики РФ (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003). Хроническую алкогольную интоксикацию вызывали принудительным внутрижелудочным введением 20% раствора этанола в дозе 3 мл/кг через 24 часа в течение 60 дней (ХАИ-60). Экспериментальных животных делили на 3 группы по 14–15 особей: 1-я группа – контрольная; 2-я группа – ХАИ-60; 3-я группа – ХАИ-60 с введением гепона, гипоксена и фосфоглива. Для оценки функционального состояния гепатоцитов в плазме крови определяли активность ферментов – аспартат– и аланинаминотрансфераз, щелочной фосфатазы, гаммаглутаминтранспептидазы, содержание билирубина, фибриногена, протромбиновый индекс (ПТИ). Перекисное окисление липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию в плазме крови ацилгидроперекисей и малонового диальдегида. Для оценки состояния антиоксидантной системы определяли общую антиокислительную активность сыворотки крови (ОАА), активность супероксиддисмутазы и каталазы. Статистическую обработку результатов проводили путем вычисления медианы (Me) и 25 и 75 процентилей с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel, 2010. Существенность различий оценивали по U-критерию Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$. Установлено, что при ХАИ-60, развитие основных биохимических синдромов поражения печени: цитолитического, внутрипеченочного, внутриклеточного холестаза, токсического поражения печени по некротическому типу, недостаточности синтетических процессов и воспалительного. Установлено развитие оксидантного стресса и активация ПОЛ. Применение сочетания гепона, гипоксена и фосфоглива нормализовало ПТИ, корригировало в сторону здоровых животных, но не до их уровня, активность исследованных ферментов, концентрацию билирубина и фибриногена, снижало интенсивность ПОЛ, корригировало в сторону показателей здоровых животных ОАА, активность антиоксидантных ферментов. Полученные результаты позволяют утверждать, что сочетание иммуномодулятор, антиоксидант и гепатопротектор перспективны для коррекции метаболических нарушений при хронической алкогольной интоксикации.

СОСТОЯНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

А.В. Сорокин, А.И. Конопля, А.А. Шульгинова, Д.О. Машошина, О.А. Суняйкина
Курский государственный медицинский университет МЗ РФ, Курск, Россия

Цель – выявление изменений внутриэритроцитарного метаболизма эритроцитов периферической крови у пациентов с хронической ишемией головного мозга (ХИМ). Обследовано 64 пациента неврологического отделения БМУ «Курская областная клиническая больница» с верифицированным диагнозом ХИМ I и II стадии на фоне гипертонической болезни II стадии и 20 практически здоровых людей (контрольная группа). Возраст всех обследованных составлял 55±5 лет. До начала лечения пе-

рекисное окисление липидов (ПОЛ) в эритроцитах оценивали по содержанию ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА). Для оценки состояния антиоксидантной системы определяли общую антиокислительную активность (ОАА), активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Кроме этого, определяли содержание стабильных метаболитов оксида азота (CMON), сорбционную емкость гликокаликса (СЕГ) и сорбционную способность эритроцитов (ССЭ). Статистическую обработку результатов проводили путем вычисления медианы (Me) и 25 и 75 процентилей с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel, 2010. Существенность различий оценивали по U-критерию Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$. У больных с ХИМ I стадии в эритроцитах установлена активация ПОЛ (повышение концентрации МДА и АГП), снижение факторов антиоксидантной защиты (ОАА, активности СОД и каталазы). Кроме этого, выявлено повышение уровня CMON и показателей сорбционных свойств эритроцитов. У пациентов со II стадией ХИМ выявлены сходные по направленности лабораторные метаболические изменения в эритроцитах по сравнению с I стадией, но более выраженные в количественном отношении. С учетом данных литературы известно, что уже при I стадии ХИМ выявляется иммунное воспаление, оксидантный стресс, эндотелиальная дисфункция, активации ПОЛ, взаимосвязанные и взаимообусловленные между собой, что приводит к нарушению проходимости сосудов различного калибра и возникновению ХИМ, при которой главным патобиохимическим компонентом синдрома клеточной, тканевой и органной ишемии становится энергодефицит. Изменения внутриэритроцитарного метаболизма несомненно усиливают данные патофизиологические нарушения.

ЛИПОФОРИН НАСЕКОМЫХ КАК МОДЕЛЬНАЯ МОЛЕКУЛА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОДИФИКАЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

К.А. Ефетов, Е.В. Паршкова, В.М. Киселев
Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

Липофорин – наиболее изученный белок гемолимфы насекомых. Являясь липогликохромопротеином, липофорин обладает способностью взаимодействовать с полярными и неполярными веществами, поэтому может быть использован в качестве модельной молекулы в различных биомедицинских исследованиях. Липидный компонент позволяет анализировать гидрофобные взаимодействия. Присутствие в составе липофорина углеводов даёт возможность изучать этот белок с помощью лектинов. Благодаря жёлтой окраске липофорин идентифицируется визуально или с помощью спектрофотометрического анализа. Антигенные детерминанты белковой части липофорина позволяют получать к нему специфические моноклональные антитела (МКА). Большое филогенетическое расстояние между Insecta и Mammalia снижает вероятность перекрёстной реакции этих антител с человеческими антигенами. Разработка тест-системы на основе липофорина Zygaenidae для исследования человеческих иммуноглобулинов G (IgG) стала возможной после создания в нашей лаборатории гибридом, продуцирующих МКА к липофорину *Adscita geryon* (Hbn.). Неспецифическое взаимодействие липофорина с человеческими IgG было подтверждено методом твёрдофазного иммуноферментного анализа с применением МКА против липофорина и МКА против человеческих IgG. Мы сравнили, как реагируют липофорин и IgG из сыворотки крови здоровых людей и пациентов с различными злокачественными опухолями. Было установлено, что большинство изученных IgG из сыворотки крови пациентов с онкопатологией взаимодействуют с липофорином достоверно сильнее, чем IgG здоровых людей. Причиной модификации IgG при патологии может быть неспецифическая адсорбция на них амфифильных веществ (таких как фосфолипиды, пептиды и т. д.), образующихся при деградации опухолевой ткани.

МЕТОД КОНТРОЛЯ УРОВНЯ ПРОДУКЦИИ ПАРАПРОТЕИНОВ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

К.А. Ефетов, Е.В. Паршкова, В.М. Киселев
Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

При множественной миеломе и других парапротеинемических гемобластозах (ППГ) в крови больных могут появляться патологические белки – парапротеины (ПП), представляющие собой моноклональные иммуноглобулины (цельные молекулы, их фрагменты или цепи), синтезируемые опухолевыми клетками. Метод иммунофиксации позволяет выявлять ПП (М-градиент) в сыворотке крови, определять их класс и концентрацию, однако требует использования дорогого оборудования и антисывороток. Поэтому при необходимости отслеживать изменение количества ПП в процессе лечения экономически гораздо эффективнее использовать простой электрофорез белков сыворотки крови с последующим сканированием электрофореграммы и определением (предложенным нами методом) «индекса М-градиента» (ИМ). Как показано нами ранее, ИМ зависит от количества ПП в биологической жидкости. Оценка динамики содержания ПП в процессе терапии позволяет отслеживать изменение количества синтезирующих их опухолевых клеток и судить об эффективности лечения. С 1999 по 2019 год нами были исследованы сыворотки крови 1330 человек из разных населенных пунктов Республики Крым. У 348 (26,2%) из них был обнаружен М-градиент. Нам удалось проследить изменения количества ПП в процессе лечения на протяжении от нескольких месяцев до нескольких лет (3 и более проб) у 61-го больного (17,5%) с ППГ. Среди больных, обследованных в динамике, мужчин – 27 (44,3%), женщин – 34 (55,7%). Средний возраст мужчин на момент обнаружения М-градиента – 57,6 лет, женщин – 59,1 лет. У большинства больных уменьшение ИМ после каждого из курсов химиотерапии позволило констатировать эффективность лечебных мероприятий. При возникновении рецидива у таких больных нами отмечался рост ИМ. В случаях отсутствия изменений ИМ, а также при увеличении ИМ на фоне терапии, нами делался вывод об отсутствии ответа опухоли на применяемые препараты. Мы рекомендовали врачам-гематологам смену схемы лечения. Таким образом, величина ИМ позволяет контролировать уровень продукции ПП у больных множественной миеломой и другими ППГ с целью своевременной коррекции терапии, а его оценка эффективна при диагностике рецидивов.

ОКИСЛЕННАЯ ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ИНДУЦИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК И АКТИВАЦИЮ ТРАНСКРИПЦИИ АНТИАПОПТОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ АСТРОЦИТОМЫ

А.Ш. Назаретян[1,3], А.Д. Филев[1,2], М.С. Конькова[1], Л.В. Каменева[1], Е.С. Ершова [1,2] Г.В. Шмарина [1], Е.А. Кожина[1], Е.М. Малиновская[1], В.М. Писарев[3], Н.Н. Вейко[1], С.В. Костюк [1,2]
[1]Медико-генетический научный центр, [2]НИИобщей реаниматологии им. В.А. Неговского, ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии; [3]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Глиомы являются основной распространенной первичной опухолью головного мозга у взрослого населения. Наиболее злокачественной глиомой является астроцитома. Для лечения глиомы используют химио- и радиотерапию, хотя эффективность терапии глиом до сих пор показывает противоречивые результаты. Одним из факторов, лежащих в основе этих противоречивых результатов, является повышенная резистентность клеток опухоли к проводимой терапии. Понимание механизмов развития толерантности клеток глиомы позволит разработать новые терапевтические протоколы для лечения глиом головного мозга. В результате терапевтического воздействия на клетки глиомы часть опухолевых клеток погибает, в межклеточном пространстве появляются фрагменты ДНК погибших клеток. Окислительный стресс сопровождает развитие глиомы. В результате действия свободных радикалов ДНК погибших клеток окисляется, окисленная внеклеточная ДНК (вкДНК) может действовать на клетки глиомы. Мы исследовали действие окисленной вкДНК на клетки астроцитомы человека. Окисленную вкДНК в концентрации 50–100 нг/мл добавляли к культивируемым клеткам астроцитомы человека *in vitro*. Уровень экспрессии белка NRF2, окислительных повреждений и двунитевых разрывов в клетках определяли методом проточной цитофлуориметрии (по уровню 8-oxodG и H2AX), уровень экспрессии генов анализировали методом реал-тайм ПЦР. Обнаружили, что окисленная вкДНК в концентрации 50–100 нг/мл через 15–180 минут вызывает окислительную модификацию ядер клеток астроцитомы – уровень 8-oxodG возрастает в 2–3 раза ($p<0,01$). Через 3 часа на 40–50% ($p<0,01$) возрастает число клеток, имеющих множественные двунитевые разрывы ядер. Уровень экспрессии антиапоптотических генов BCL2, BCL2A1, BIRC2, BIRC2 возрастает ($p<0,01$), при этом не наблюдается активации гена и белка транскрипционного фактора NRF2, ответственного за антиокислительный ответ. Отсутствие антиокислительного ответа в клетках глиомы при действии на клетки опухоли окисленной внеклеточной ДНК может провоцировать повышенную выживаемость клеток с окислительными повреждениями и разрывами ДНК, что снижает эффективность проводимой терапии и является предпосылкой для возрастания в опухолевых клетках количества перестроек.

АНАЛИЗ ВОВЛЕЧЕННОСТИ МАСТЕР-ГЕНА PDX1 В МИГРАЦИЮ РАКОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛИ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ ЭМБРИОНА *DANIO RERIO*

Д.Р. Сафина[1], Л.Г. Кондратьева[2], М.П. Рощина[1], Е.П. Копанцев[2], И.П. Чернов[2], С.В. Костров[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Проведены работы по анализу вовлеченности мастер-гена PDX1, участвующего в регуляции эмбрио- и канцерогенеза поджелудочной железы человека, в контроль миграции опухолевых клеток на модели *Danio rerio* (зебрафиш). Суспензию клеток трансплантировали в желточный мешок развивающегося эмбриона *D. rerio* через 48 часов после оплодотворения. В качестве трансплантатов использовали линию раковых клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека PANC-1 и ее модифицированный вариант – PANC-1/PDX1. Клетки этой линии содержат дополнительный экспрессирующийся ген PDX1 под контролем промотора PCNA. Также линии PANC-1 и PANC-1/PDX1 стабильно экспрессируют маркерный ген GFP. Было определено время персистенции трансплантированных клеток линий PANC-1 и PANC-1/PDX1 после их инъекции в тело развивающегося эмбриона D. rerio. Проведено количественное сравнение миграционного потенциала анализируемых опухолевых линий. Для этого оценивали число эмбрионов, у которых выявлялась миграция трансплантированных клеток. Показано, что клетки линии PANC-1 обладают способностью мигрировать в теле эмбриона из места инъекции. Пик миграции приходится на 2 сутки после трансплантации. Количество эмбрионов, у которых наблюдали миграцию трансплантированных клеток, составляло около 50%. В то же время клетки линии PANC-1/PDX1 демонстрирует снижение миграционной активности примерно в 5 раз. Полученные данные дают основание полагать, что ген PDX1 может быть вовлечен в контроль эффективности миграции опухолевых клеток поджелудочной железы человека. *Работа поддержана грантами РФФИ: №№ 17-00-00189 и 18-04-00318; Программами Президиума РАН №18 «Биомедицинские технологии: инновационные разработки» и «Молекулярная и клеточная биология и пост-геномные технологии».*

ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ОПУХОЛЕЙ НА ОСНОВЕ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННОГО ВАРИАНТА ЦИТОКИНА TRAIL

А.В. Яголович[1], А.А. Артыков[1], Д.А. Долгих[1], Т.А., Кармакова[2], М.С. Воронцова[2], М.Э. Гаспарян[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Национальный медицинский исследовательский центр радиологии МЗ РФ, Москва, Россия

Цитокин TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) индуцирует апоптоз в трансформированных клеточных линиях, не оказывая воздействия на здоровые клетки. Способность лиганда TRAIL индуцировать апоптоз главным образом опухолевых клеток, оказывая незначительное воздействие на здоровые клетки, делает его потенциально ценным кандидатом для применения в противораковой терапии. Однако, несмотря на то, что рекомбинантный препарат TRAIL продемонстрировал высокую противоопухолевую активность в ряде доклинических исследований, его терапевтический эффект в клинических испытаниях ограничивался частичными ответами или стабилизацией заболевания. Ранее мы получили уникальный рецептор-специфичный вариант TRAIL DR5-B с шестью заменами аминокислотных остатков белке TRAIL, который селективно связывается лишь с

одним из пяти рецепторов TRAIL, рецептором смерти DR5, не проявляя аффинность к рецептору смерти DR4, а также к рецепторам ловушкам DcR1 и DcR2. Исследования на линиях опухолевых клеток показали, что мутантный вариант DR5-B значительно эффективнее индуцирует апоптоз по сравнению с TRAIL дикого типа как отдельно, так и в комбинации с химиопрепаратами на опухолевых клетках различного происхождения. Рекомбинантный препарат DR5-B проявил противоопухолевую активность на модели ксенографта рака толстой кишки человека HCT116 у иммунодефицитных мышей линии nu/nu. При применении препарата DR5-B в режиме 10-кратного ежедневного введение в виде двух курсов по 5 дней с перерывом в один день статистически достоверное ингибирование роста опухоли наблюдалось в разовой дозе 10 мг/кг. Величина ТРО (торможение роста опухоли) в период от 8-х до 20-х суток после начала воздействия, по сравнению с группой животных, получавших в том же режиме инъекции физиологического раствора, в среднем составляла 41–48%. При этом выживаемость мышей, получивших препарат DR5-B выросла на 13–16 дней по сравнению с контрольной группой животных. В аналогических условиях препарат TRAIL ингибировал рост опухолей всего на 9–12%. Таким образом, препарат DR5-B можно рассмотреть, как эффективное противоопухолевое средство для терапии неопластических заболеваний.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСЛОВИЙ СЕЛЕКТИВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

О. Коваль[1,2], Е. Голубицкая[1,2], О. Троицкая[1], Е. Елак[3], С. Вагапов[4], Д. Семенов[1], В. Рихтер[1], И. Швейгерт[4], Д. Закревский[3,5]

[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Новосибирский государственный университет; [3]Новосибирский государственный технический университет; [4]Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН;, [5]Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск, Россия

Разработка новых биофизических подходов к терапии злокачественных опухолей относится к приоритетным направлениям исследований. Уже было показано, что обработка поверхности кожи низкотемпературной плазмой оказывает стерилизующее и ранозаживляющее действие, а ее воздействие на опухолевые клетки находится на стадии испытаний *in vitro* и *in vivo*. Холодная плазменная струя (ХПС) представляет собой последовательность стримеров, генерируемых в инертных газах в диэлектрическом канале плазменного устройства и распространяющихся по струе газа в окружающем воздухе при атмосферном давлении. Достижение селективности в воздействии на опухолевые клетки позволит применять этот метод в клинический практике. Для опосредованного воздействия ХПС в качестве моделей в работе использовали клетки плоскоклеточной карциномы кожи A431 и клетки почки эмбриона человека HEK-293. Культуральную среду подвергали облучению ХПС, генерируемой в аргоне в течение 2-8 мин при напряжении 3.6–4.9 кВ и добавляли к клеткам. Пролиферацию обработанных клеток тестировали в режиме реального времени на приборе iCelligence в течение 54 ч. Через 24 ч после обработки методом проточной цитометрии в клетках определяли уровень активных форм кислорода с применением флуоресцентного индикатора DCFDA, активацию каспаз -3 и -7, а также долю апоптотических и некротических клеток. Определены селективные условия обработки ХПС, приводящие к гибели опухолевых клеток A431, но не здоровых клеток HEK-293. На основании полученных данных о динамике изменения исследуемых маркеров и биоинформатическом анализе данных полнотранскриптомного исследования модельных клеточных линий предложен механизм, определяющий специфическое действие ХПС в отношении опухолевых клеток. *Работа поддержана грантом РНФ № 19-19-00255.*

УЧАСТИЕ ABC-ТРАНСПОРТЕРОВ В ВОЗНИКНОВЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ К БОРТЕЗОМИБУ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Н.И. Моисеева, Д.А. Климова, Л.А. Лалетина

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия

Протеасомный ингибитор бортезомиб уже около 5 лет входит в первую линию лечения множественной миеломы, однако к нему также формируется устойчивость с течением времени. Классическим механизмом приобретения устойчивости к ксенобиотикам является активация различных транспортеров с широкой субстратной специфичностью, отвечающих за выброс веществ из клеток. В нашей работе мы исследовали роль ABC-транспортеров и одного из них факторов транскрипции белка YB-1 в формировании лекарственной устойчивости к ингибитору протеасом бортезомибу при множественной миеломе (ММ**)**. Культуры клеток ММ RPMI8226 и NCI-H929 и их устойчивый к бортезомибу сублинии RPMI8226/btz-6 и H929/btz-6. Чувствительность клеток к препаратам оценивалась в МТТ тесте. Экспрессию ABC-транспортёров и белка YB-1 оценивали с помощью ПЦР в реальном времени, вестерн-блоита и проточной цитометрии. Локализацию YB-1 определяли иммуноцитохимическим методом. После длительного культивирования в присутствии бортезомиба получены сублинии RPMI8226/btz-6 и H929/btz-6, которые были в 2,5 и 1,5 раза устойчивее к препарату по сравнению с родительскими, а также обладали перекрестной резистентностью к доксорубицину. При этом экспрессия генов MDR1 и MRP1 в устойчивых сублиниях снижалась, а на уровне белка не детектировалась. Экспрессия же гена MVP повышалась в устойчивом варианте RPMI8226/btz-6, но не в H929/btz-6. Только экспрессия гена BCRP увеличивалась в обоих резистентных сублиниях. Белок YB-1, переход которого из цитоплазмы в ядро часто ассоциирован с активацией лекарственной устойчивости, в RPMI8226 и NCI-H929 был локализован в цитоплазме клеток, однако в RPMI8226/btz-6 в 20% клеток наблюдалась диффузная окраска, что свидетельствует о частичной транслокации белка YB-1. Мы показали, что два основных белка ABC-транспортера – P-гликопротеин и MRP1 не участвуют в возникновении устойчивости к бортезомибу, более того, данный препарат способствует снижению их экспрессии. Повышение экспрессии BCRP объясняет возникновение устойчивости к доксорубицину, но не к бортезомибу, так как последний не является субстратом BCRP. *Работа поддержана грантом РФФИ, проект №18-315-00075*

ИНГИБИТОР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ Hsp70 И КАСПАЗЫ-3 УСИЛИВАЕТ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ЭТОПОЗИДА *IN VITRO*

Д.В. Сверчинский, А.Д. Никотина, Е.Ю. Комарова, Б.А. Маргулис, И.В. Гужова
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Молекулярный шаперон Hsp70, поддерживающий белки в нативной конформации, лежит в основе мощной цитопротекторной системы, защищающей клетку от стрессовых факторов воздействия. В нормальных клетках уровень Hsp70 невелик, однако в опухолевых клетках показана повышенная экспрессия этого белка, что может приводить к значительному снижению эффективности противоопухолевой терапии. Одним из молекулярных механизмов, защищающих опухолевую клетку от гибели, является взаимодействие Hsp70 с белками, участвующими в апоптотическом сигналинге, и ингибирование их функций. Важным элементом такого защитного механизма является способность Hsp70 подавлять функции эффекторных каспаз, в том числе каспазы-3, путем прямого взаимодействия с ней, тем самым запуская процессы, связанные с избеганием клеточной гибели и выполнением программы выживания. Мы предположили, что разобщение Hsp70 и каспазы-3 может увеличивать чувствительность опухолевых клеток к апоптоз-индуцирующей терапии. Используя программное обеспечение PASS для скрининга ингибиторов активности Hsp70 и дальнейший лабораторный скрининг отобранных соединений, мы выбрали производное бензодиоксола (BT-44) как вещество, предположительно способное разобщать Hsp70 и каспазу-3. В ходе исследования мы показали способность BT-44 связываться с Hsp70, ингибируя его субстратсвязывающую и шаперонную активность, а также способность данного соединения проникать внутрь опухолевых клеток без потери Hsp70-ингибирующей активности. Кроме того, в экспериментах in vitro на опухолевых клетках с повышенным уровнем Hsp70 мы продемонстрировали дозозависмый, сенсибилизирующий опухолевые клетки эффект BT-44 по отношению к апоптоз-индуцирующему химиотерапевтическому агенту этопозиду, сопровождающийся увеличением уровня активной каспазы-3 в этих клетках. Наконец, с помощью разработанного нами конкурентного теста мы продемонстрировали, что BT-44 вызывает диссоциацию комплекса Hsp70 и каспазы-3 в клетках, тем самым увеличивая противоопухолевую активность этопозида и демонстрируя потенциальную роль разобщителей Hsp70 и каспазы-3 в противоопухолевой терапии.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА КОНТРОЛИРУЮТ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ГЕПАТОКАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Л.В. Домнина, О.Ю. Иванова, Г.С. Шагиева, В.Б. Дугина, Б.В. Черняк
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Текст тезисов Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) характерен для ранних стадий развития, процессов регенерации и для роста опухолей, где ЭМП во многом определяет инвазивность и метастазирование. Продукция активных форм кислорода (АФК) в митохондриях регулирует различные сигнальные пути, связанные с развитием опухолей. С помощью митохондриально-направленных антиоксидантов мы исследовали участие митохондриальных АФК (митоАФК) в регуляции ЭМП. Показано, что культивация клеток гепатом Huh7 и HepG2 в присутствии митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 (40нМ) вызывает восстановление эпителиальной морфологии, элементов цитоскелета и межклеточных контактов. В клетках Huh7 под действием SkQ1 повышалась экспрессия белка межклеточных контактов Е-кадгерина и снижалась экспрессия мезенхимального маркера N-кадгерина. На клетках карциномы шейки матки SkQ1 вызывал обращение ЭМП, благодаря торможению киназы Erk1/2. Однако в клетках Huh 7 этот эффект был выражен слабо. Дальнейшие эксперименты должны показать, насколько сходны механизмы участия митоАФК в ЭМП различных типов опухолей. Важную роль в индукции ЭМП играет взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом. Культивация клеток HepG2 на коллагеновой подложке вызывала усиление окислительного стресса и признаков ЭМП. SkQ1 или традиционные антиоксиданты (в значительно более высоких концентрациях) предотвращали развитие ЭМП. Среда, полученная при культивации клеток HepG2 на коллагеновой подложке, содержала факторы, способствующие развитию ЭМП в отсутствие коллагена. При культивации в присутствии SkQ1 таких факторов не вырабатывалось. Полученные данные свидетельствуют о том, что активация интегринов (рецепторов коллагена) на поверхности клетке стимулирует продукцию митоАФК, которые играют важную роль в выработке растворимых медиаторов (предположительно цитокинов) участвующих в развитии ЭМП. Известно, что стеллатные клетки печени вырабатывают коллаген и это может способствовать ЭМП гепатоцитов и гепатоканцерогенезу. Можно предполагать, что митохондриально-направленные антиоксиданты будут препятствовать развитию гепатоцеллюларных карцином, вызванных различными факторами, включая инфекцию вирусом гепатита В. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-00-00088.*

СОДЕРЖАНИЕ АЦЕТИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИАМИНОВ В КРОВИ КОШЕК ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.И. Акинина[1], М.Ю. Вакуленко[1,2], Н.М. Добаева[1]
[1]Ростовский государственный медицинский университет; [2]Донской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, Россия

Активация спермидин/ сперминацетилтрансферазы (SSAT) в опухолевой ткане вызывает образование в высоких концентрациях нескольких ацетильных производных полиаминов: 1N-ацетилспермидина, 8 N-ацетилспермидина, 12 N-ацетилспермидина,, ацетил-спермина и др.. Формирование ацетильных производных полиаминов связано со снижением положительного заряда молекула и приводит к ослаблению их взаимосвязи с сайтами связывания с ДНК и РНК, что патогенетически связано с прогрессированием патологического процесса. В настоящее время определение содержания ацетильных производных полиаминов в слюне, плазме крови и моче предполагается использовать в качестве маркера онкологии кишечника, легких и др. Целью данного исследования явилась оценка клинической значимости определения содержания ацетильных производных по-

лиаминов при сравнительном изучении в крови кошек с злокачественными новообразованиями молочной железы. Обследовано 30 больных животных с злокачественными негормонозависимыми новообразованиями молочной железы в возрасте от1 до 10 лет. В исследуемую группу были включены животные с 1 и 2 стадией рака классификация по TNM. Контрольную группу составили 10 здоровых кошек той же возрастной группы. Содержание полиаминов и их ацетильных производных определяли в эритроцитах венозной крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Нами обнаружено, что в ткане опухоли (инвазивной неспецифической карциноме) содержание 1N-ацетилспермидина, 8 N-ацетилспермидина и ацетилспермина в 30 ($p \leq 0{,}001$), 35 ($p \leq 0{,}001$) и 10($p \leq 0{,}01$) раз выше чем в контроле. Одновременно при данной форме злокачественных новообразованиях молочной железы в эритроцитах обнаружено присутствие в высокой концентрации только одного производного – 8N-ацетилспермидина, превышающей контроль в 50 раз ($p \leq 0{,}001$). Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о возможности использования определения содержания ацетилспермидина в эритроцитах крови кошек как маркера онкологии молочной железы. Применение данного маркера целесообразно в целях повышения точности диагностики и эффективности лечения рака молочной железы у кошек. Однако высокий уровень ацетилспермидина, показанный при различных патологических состояниях, определяет неспецифичность данного показателя.

АНАЛИЗ ГЕНА BASP1 ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЕГО РОЛИ В РАЗВИТИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.А. Баглык[1], В.В. Захаров[2,3], Ф.М. Захарова[1,4]
[1]Санкт-Петербургский государственный университет; [2]НИЦ "Курчатовский институт" – ПИЯФ, Гатчина; [3]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; [4]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний женщин. Особенностью данного типа рака является относительно высокий процент наследственных случаев заболевания. Однако только для 50% случаев наследственного РМЖ обнаружены мутации и полиморфизмы, определяющие начала развития данного заболевания. Поэтому в настоящее время активно ведутся поиски генов-кандидатов, нарушения в работе которых могут быть связаны с наследственной формой РМЖ. В качестве одного из возможных генов-кандидатов нами рассматривается ген *BASP1*, для которого уже была показана связь с канцерогенезом. Однако ген *BASP1* имеет определённые структурные особенности, которые требуют подбора специальных условий для его анализа. Целью данной работы является анализ структуры гена *BASP1* и оптимизация условий для его амплификации и секвенирования у пациентов с наследственной формой РМЖ. К настоящему моменту проведено выделение ДНК из крови пациентов с РМЖ и подобраны праймеры для амплификации функционально-значимых участков гена *BASP1* (промоторов и трех экзонов). Анализ структуры гена показал, что его последовательность является GC-богатой (до 100% GC на некоторых участках длиной до 20 нуклеотидов) вследствие наличия четырех CpG-островков и требует подбора специальных условий для проведения ПЦР. Нами было показано, что бетаин (в конечной концентрации 1М) может быть использован в качестве энхансера для эффективной амплификации выбранных участков гена. Высокий GC-состав ампликонов также приводит к низкому качеству прочтения последовательности при секвенировании. Изменение температурного режима и добавление бетаина или ДМСО не привело к улучшению качества секвенирования. В качестве альтернативного подхода нами также исследовано использование нуклеотида 7-деаза-дГТФ вместо дГТФ при проведении ПЦР. Этот подход позволил получить специфические продукты ПЦР для исследуемых ампликонов даже без добавления энхансеров. В настоящее время исследуется эффективность секвенирования ПЦР-продуктов, содержащих 7-деаза-дГТФ. Последующая работа будет направлена на выявление мутаций и полиморфизмов в гене BASP1 и их анализ. *Работа поддержана грантом РФФИ № 18-04-01357.*

ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ СУПЕРКОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ В ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА

М.В. Балева, М.И. Чуденкова, Д.Ю. Петров, С.А. Левицкий, И.В. Чичерин, П.А. Каменский
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Митохондрии являются многофункциональными органеллами, ответственными за энергетический обмен посредством окислительного фосфорилирования. Этот процесс осуществляется белковыми комплексами, присутствующими во внутренней мембране митохондрий. Недавно было обнаружено, что эти комплексы могут быть связаны вместе с образованием суперкомплексов (СК). Хотя точная функция этих структур остается неизвестной, есть данные, что нарушения в составе и сборке СК могут оказывать влиять на онкогенез. Тем не менее, из-за отсутствия исследований, проведенных на образцах биопсии пациентов, имеется мало точных данных о структуре и формировании СК в ходе развития онкозаболеваний. Настоящее исследование было выполнено с использованием биопсийных материалов пациентов, страдающих раком желудка и колоректального рака, полученных совместно с хирургами – онкологами. Основная идея данного исследования заключалась в изучении изменений в компонентах суперкомплексов и активности отдельных комплексов в митохондриях, выделенных из опухолевых тканей человека. Нам удалось показать, что в опухолевых тканях аденокарциномы желудка, в сравнении со здоровой тканью, отсутствуют высокомолекулярные суперкомплексы, а также снижено количество СК в целом. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными ранее на клеточных линиях человека. Помимо этого, нам удалось продемонстрировать общее снижение активности CI и, напротив, увеличение активности CIV в опухолевых тканях по сравнению со здоровой тканью желудка. Эти изменения в активности двух комплексов дыхательной цепи согласуются с предыдущими исследованиями этих комплексов, выполненными на биопсийных материалах у пациентов с раком желудка. Также мы обнаружили перераспределение активности НАДН дегидрогеназы из респирасом в здоровых тканях в суперкомплексы, состоящие из CI и димера CIII в опухолевых тканях.

РАЗРАБОТКА 3D ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ CAR-T ТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

А.Х. Валиуллина[1], Р.М. Саярова[1], М.О. Гомзикова[1], М.Н. Журавлева[1], А.В. Петухов[1,3], Э.Р. Булатов[1,2], А.А. Ризванов[1]

[1]Казанский федеральный университет, Казань; [2]Институт биоорганической биохимии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [3]НМИЦ им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Иммунотерапия – одно из наиболее перспективных направлений в современной фундаментальной и клинической онкологии. CAR-T клетка представляет собой Т-лимфоцит, в геном которого *ex vivo* встроен ген химерного антигенного рецептора (CAR). Внеклеточный домен данного рецептора обеспечивает распознавание мишени (напр. CD19), а внутриклеточный – активирует сигнальный каскад, приводящий к разрушению клеток-мишеней посредством механизмов цитотоксичности Т-клеток. Однако, несмотря на успех CAR-T терапии в онкогематологии, возможное применение данного подхода против солидных опухолей (карцинома, нейробластома и др.) остается малоизученным. Достижение высокой эффективности CAR Т-терапии при терапии солидных опухолей является актуальной научной задачей. Это связано с несколькими причинами, такими как высокая гетерогенность клеточного состава солидных опухолей, необходимость направленной миграции и проникновения клеток CAR-T против градиента давления в строме опухоли, локальная гипоксия и недостаток питательных веществ внутри опухоли, агрессивное микроокружение опухоли. В данном исследовании мы оценили эффективность анти-CD19 CAR-T клеток против монослоя (2D) и многослойных структур (3D) опухолевых клеток, созданных с помощью биопринтера Inkredible (CELLINK) на основе композиции полисахаридного гидрогеля, состоящего из нановолокон целлюлозы и альгината. Для сборки соответствующих лентивирусов нами была использована конструкция с анти-CD19 CAR 2-го поколения, а также рекомбинантный вектор, содержащий ген CD19. Т клетки были выделены из крови здорового человека, затем активированы и трансдуцированы лентивирусом, кодирующим CAR. $CD19^+$ клетки были получены путем трансдукции клеток аденокарциномы легкого H522 рекомбинантным лентивирусным вектором. Затем анти-CD19 CAR-T клетки наносили на монослой и многослойные опухолеподобные структуры $CD19^+$ клеток H522. Эффективность анти-CD19 CAR-T клеток против CD19+ опухолевых клеток оценивали при помощи флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Согласно полученным результатам, анти-CD19 CAR-T клетки продемонстрировали существенную эффективность против 2D и 3D моделей CD19+ опухолевых клеток. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-74-20026.*

КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ ИНДУЦИРУЕМОЙ ХРОМОСОМНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ AML1-ETO

В.С. Вьюшков[1,2], Н.А. Ломов[1,2], М.А. Рубцов[1,2,3]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [2]LIA LFR20 (LIA French-Russian Cancer Research Laboratory) Villejuif, France, Moscow, Russia; [3]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Применение химиотерапевтических подходов для лечения злокачественных опухолей может являться причиной развития вторичного острого миелоидного лейкоза. У 12% пациентов с данным заболеванием наблюдается транслокация, приводящая к образованию слитого гена AML1-ETO. Развитие хромосомных транслокаций с участием гена AML1 (RUNX1), регулирующего гемопоэз, связывают с использованием в качестве противоопухолевых препаратов ингибиторов топоизомераз. Удобным способом изучения механизмов, ведущих к появлению транслокаций, является создание модельной клеточной линии, где в значительной доле клеток будут наблюдаться описанные перестройки. Индукция транслокации в такой линии будет обуславливаться процессами негомологичной репарации двухцепочечных разрывов, внесенных системой CRISPR/Cas9. Для создания клеточной линии была собрана плазмида, включающая гены РНК-гидов, подобранных к генам AML1 и ETO, и ген Cas9 с системой индукции транскрипции Тет-ON. Полученная плазмида использовалась для трансфекции клеток лимфобластоидной культуры LCL (RPMI 8866). Индукция хромосомной транслокации AML1-ETO обуславливалась активацией доксициклином гена Cas9, усиление экспрессии которого подтверждается данными количественной ПЦР с обратной транскрипцией. После активации экспрессии была подсчитана частота возникновения хромосомной транслокации AML1-ETO методом количественной ПЦР, а также оценена кинетика ее формирования во времени. На основе трансформированной культуры получена моноклональная линия. Данная клеточная модель использовалась для анализа влияния ингибитора белка репарации MRE11 (Mirin) на предмет снижения частоты возникновения транслокаций методом количественной ПЦР. Было показано, что данный ингибитор не влияет на частоту формирования транслокации. В результате была получена клеточная линия LCL_iAML/ETO, в которой возможно воспроизведение лейкозогенных транслокаций между генами AML1 и ETO путем активации доксициклином системы CRISPR/Cas9. В дальнейшем такая линия может быть использована для скрининга химических препаратов, способных снижать вероятность хромосомных перестроек.

ХАРАКТЕРИСТИКА SLC34A2 И RAD50 В КАЧЕСТВЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ТРИЖДЫ-НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

К. Гавриш[1], Г.З. Мухаметшина[2], С.В. Петров[3], Р.Г. Киямова[1]

[1]Казанский федеральный университет; [2]Республиканский клинический онкологический диспансер; [3]Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Трижды-негативный подтип рака молочной железы (ТНРМЖ) характеризуется агрессивностью, плохим прогнозом и высокой частотой рецидивов. Это связано, в том числе, с отсутствием чувствительных диагностических и прогностических маркеров, а также мишеней для тагретной терапии. Целью нашего исследования является изучение новых потенциальных прогностических маркеров ТНРМЖ. В работе изучали связь экспрессии фосфатного транспортера NaPi2b и белка репарации RAD50 с общей выживаемостью пациентов с ТНРМЖ. Оба белка были идентифицированы нами ранее с помощью метода

SEREX (serological analysis of cDNA expression libraries) и охарактеризованы как потенциальные маркеры РМЖ. Уровень экспрессии изучали как на уровне РНК, так и на уровне белка с использованием заключенных в парафине архивных опухолевых тканей пациентов с ТНРМЖ с известными данными общей 5-летней выживаемости (ОВ) (n = 39). Опухоли пациентов были предоставлены Республиканским Клиническим Онкологическим Диспансером (г. Казань) в соответствии с решением локального этического комитета. Для анализа профиля экспрессии SLC34A2 и RAD50 на уровне РНК использовали количественный ПЦР в режиме реального времени, на уровне белка экспрессию изучали путем иммуногистохимического окрашивания тканевых матриц (Tissue Micro Arrays, TMA). Экспрессию NaPi2b оценивали как выраженную, если окрашивалось более 10% клеток с интенсивностью «++» и более, а экспрессию RAD50 считали выраженной, если окрашивалось более 90% клеток с интенсивностью «++» и более. Статистическую обработку данных проводили с помощью анализа выживаемости Каплана-Мейера, Логранкового теста и критерия Манна-Уитни. Все расчеты проводились в RStudio. Было показано, что выраженная экспрессия на уровне белка гена транспортера NaPi2b ассоциирована с более высокой ОВ больных ТНРМЖ (p-значение = 0,034). Интересно отметить, что на уровне гена такой закономерности выявлено не было. Для гена RAD50, как на уровне белка, так и на уровне РНК, не было выявлено связи с ОВ больных ТНРМЖ. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

ИЗУЧЕНИЕ ВКЛАДА IL-6, ПРОИЗВОДИМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ, В РАЗВИТИЕ AOM-DSS-ИНДУЦИРОВАННОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА МЫШИ

Е.О. Губернаторова[1,2], Е.А. Горшкова[1,2], О.А. Намаканова[1,2], А.И. Полинова[1], М.С.Друцкая[1,2], С.А. Недоспасов[1,2]
[1]Биологический факультета МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Колоректальный рак широко распространен в развитых странах и, как правило, ассоциирован с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника. Повторяющиеся циклы повреждения кишечного эпителия в контексте воспалительного микроокружения приводят к перерождению ткани и развитию опухоли. Одним из ключевых регуляторов данного процесса является провоспалительный цитокин интерлейкин-6 (IL-6). Так, в моделях колоректального рака у мышей было показано, что дефицит IL-6 во всех клетках организма приводит к снижению числа возникающих в кишечнике опухолей, однако вклад конкретных клеточных источников IL-6 в патогенез рака остается не понятен. Целью настоящей работы было изучение роли IL-6, продуцируемого миелоидными клетками, в мышиной модели рака кишки. Для индукции колоректального рака мышам однократно вводили 12 мкг/кг азоксиметана (AOM), обладающего генотоксическими свойствами. Далее, в течение 7–8 недель для поддержания хронического колита мыши получали с питьевой водой раствор декстрана сульфата натрия (DSS) курсами по 5 дней с перерывами на 14 дней. В каждый эксперимент были взяты 4 группы мышей: с полным нокаутом по IL-6 (IL-6 KO), с дефицитом IL-6 в макрофагах (Mlys-IL-6 KO) и в дендритных клетках (CD11c-IL-6 KO), а также мыши дикого типа (WT). Мышей ежедневно взвешивали для оценки тяжести колита. В конце эксперимента определяли количество и размер опухолей, длину толстой и слепой кишки, а также измеряли относительную экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины, в тканях кишечника. Было показано, что IL-6 KO и CD11c-IL-6 KO мыши более чувствительны к DSS-индуцированному воспалению, чем Mlys-IL-6 KO и WT мыши. При этом опухолевая нагрузка снижалась как у мышей с полным, так и с тканеспецифическими нокаутами IL-6, по сравнению с мышами дикого типа. В кишечнике у всех групп с дефицитом IL-6 показано подавление экспрессии генов Il22 и Il17a, кодирующих цитокины, необходимые для патогенеза как колоректального рака, так и колита. Полученные результаты свидетельствуют о том, что IL-6, продуцируемый миелоидными клетками, важен для развития колоректального рака у мышей в модели AOM-DSS, причем IL-6 из макрофагов и дендритных клеток обладает разным эффектом в контексте этой экспериментальной модели. *Работа поддержана грантом РНФ № 19-75-30032*

CNA-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЛАНДШАФТ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СЛУЧАЯХ ФЕНОМЕНА ГЕНЕТИЧЕСКОГО «ЗАМИРАНИЯ» В ПРОЦЕССЕ ПРОВЕДЕНИЯ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

И.В. Дерюшева[1], А.М. Певзнер[1], М.М. Цыганов[1], М.К. Ибрагимова[1,2], Н.В. Литвяков[1,2]
[1]НИИ онкологии Томского НИМЦ, [2]Биологический институт Национального исследовательского Томского государственного университета, Томск, Россия

При изучении изменений CNA(Copy Number Aberration)-генетического ландшафта в опухоли молочной железы при проведении неоадъювантной химиотерапии (НАХТ), было установлено, что у части пациентов не происходит никаких генетических изменений опухоли, несмотря на широкий спектр изменения объема опухоли под действием НАХТ. Мы назвали данный феномен – феноменом генетического «замирания». Установлено, что у части пациентов с феноменом «замирания» метастазы развиваются и «замирание» оказывается неустойчивым, у части больных «замирание» устойчивое и метастазы не развиваются, как минимум в течении 5 лет. Целью нашей работы было изучить особенности CNA-генетического ландшафта у больных с феноменом устойчивого и неустойчивого генетического «замирания» опухоли. Материалы и методы. В исследование были включены 42 больных РМЖ IIA–IIIB стадии, получавшие 4–8 курсов НХТ и послеоперационное лечение. Для оценки CNA-генетического ландшафта проведен микроматричный анализ опухоли до лечения и после НХТ на ДНК-чипах Affymetrix CytoScanTM HD Array. Результаты. Из 42 больных у 8 (19%) больных было отмечено образование новых клонов с амплификациями и делециями и высокая частота метастазирования (75%). У 18/42 больных (43%) отмечается снижение частоты делеций и амплификаций в опухоли под действием НХТ и частота метастазирования 1/18 (5,6%). Феномен генетического «замирания» наблюдался у 16/42 пациентов (38%). У 5 из этих пациентов (31%) развились метастазы, т.е. феномен «замирания» оказался неустойчивым. В целом CNA-генетический ландшафт опухоли у пациентов с феноменом «замирания» характеризуется низкой частотой амплификаций и делеций, по сравнению со всеми остальными пациентами. Больные с неустойчивым

феноменом «замирания» характеризуются наличием в опухоли амплификаций регионов 5q31.1-34, 19q13.41, и делеций 12p13.33-12p11.22. В обоих случаях у больных отмечается амплификация генов компонентов WNT-сигналинга и делеции ингибиторов взаимодействия WNT с рецептором FZD. Заключение. Для больных с феноменом «замирания» характерна низкая частота CNA в опухоли. По-видимому, амплификация компонентов WNT-сигналинга и одновременная делеция его ингибиторов, обеспечила двум пациентам с феноменом «замирания» выход из этого состояния. *Работа поддержана грантом РФФИ 18-29-09131.*

ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ В ПРОГРЕССИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.К. Ибрагимова[1,2], М.М. Цыганов[1,2], И.В. Дерюшева[1], Е.М.Слонимская[1,3], Н.В. Литвяков[1,2]
[1]НИИ онкологии Томского НИМЦ, [2]Томский государственный университет; [3]Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Томск, Россия

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности НХТ и безметастатической выживаемости больных РМЖ на основе изучения наличия амплификационных клонов в первичной опухоли больных и оценке экспрессии генов стволовости. В исследование включены 62 больных с диагнозом РМЖ IIA – IIIB ($T_{1-4}N_{0-3}M_0$), возраст 26–68 лет (средний возраст 47,43±0,78 лет). Материалом для исследования служили парные образцы биопсийного материала до лечения для каждого из пациентов. Была выделена ДНК и РНК из исследуемого материала при помощи наборов QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany) и RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany), соответственно. Наличие амплификаций определялось в вышеуказанных регионах с использованием микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, USA). Экспрессию генов стволовости оценивали при помощи метода обратно-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (qPCR) с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan. Была показана гиперэкспрессия в резидуальной опухоли после НХТ генов стволовости (TERT; OCT3; SMO; MYC; SNAI2; MOB3B; TGFBR1; KLF4; BMI1; VIM; FLT3; LAT; SMAD2; LMNB2; KLF1; TGFb) у больных с развившимися впоследствии метастазами. Установлено, что у больных без метастазов до лечения гиперэкспрессированны 5 генов – OCT3; BMI1; LMNB2; TGFb1 и FLT3, у больных с метастазами до лечения гиперэкспрессированы 7 генов – OCT3; BMI1; LMNB2; TGFb1; TERT; SNAI2; TGFbR1. После проведения НХТ в остаточной резидуальной опухоли больных без гематогенных метастазов частота гиперэкспрессированных генов не меняется. У больных с метастазами после НХТ в остаточной резидуальной опухоли гиперэкспрессированы 14 изученных генов – кроме KLF1 и SMAD2. При этом, было показано, что при гиперэкспрессии в остаточной резидуальной опухоли генов OCT3, LAT и LMNB2 у 69% больных (11/16) зарегистрировано возникновение гематогенных метастазов. При гипоэкспрессии хотя бы одного из этих генов 5-летняя безметастатическая выживаемость составляет 94% (34/36). Получена модель прогнозирования возникновения гематогенного метастазирования на основе анализа экспрессии 16 генов стволовости. Чувствительность прогноза метастазирования составляет 69%, специфичность 94%, диагностическая точность 82%. В докладе будут также представлены данные об экспрессии изученных генов сомато-стволового перехода в первичной культуре опухолевых клеток. *Благодарность. Работа поддержана грантом РНФ 17-15-01203.*

КЛЮЧЕВОЙ ФАКТОР ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ PDX1 СНИЖАЕТ МЕТАСТАТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *IN VITRO*

Л.Г. Кондратьева[1], И.П. Чернов[1], Е.Д. Свердлов[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Одним из наиболее трудно поддающихся лечению видов злокачественных новообразований является протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПЖ). Основной причиной смертности у больных раком ПЖ является метастазирование. Проблема терапии рака ПЖ чрезвычайно актуальна на сегодняшний день. Недавно внимание исследователей в качестве мишени для терапии привлек ключевой регулятор развития поджелудочной железы PDX1. Полученные данные свидетельствуют, что PDX1 является контекстно-зависимым медиатором инициирования и прогрессирования рака ПЖ. Целью нашей работы стала оценка влияния этого гена на подвижность и миграцию клеток рака ПЖ. Нами были получены флуоресцентно меченые GFP клетки линии рака ПЖ PANC1, экспрессирующие ген PDX1 под контролем промотора гена PCNA человека (PANC1-PDX1+), и контрольные клетки. Методами вестерн блоттинга и ОТ-ПЦР в реальном времени была обнаружена продукция белка и увеличение относительного уровня мРНК в клетках PANC1-PDX1+ по сравнению с контрольными клетками. В полученных клетках методом ОТ-ПЦР в реальном времени оценивали уровень экспрессии проэпителиальных и промезенхимальных генов. Было показано, что содержание мРНК эпителиальных генов MUC1, KRT8 и CDH1, было повышено в клетках PANC1-PDX1+, а уровень экспрессии гена мезенхимального регулятора ZEB1 был снижен. Влияние фактора PDX1 на подвижность клеток, оценивали на модели механического повреждения монослойных культур (Scratch-тест). По сравнению с контрольными клетками заполнение клетками PANC1-PDX1+ области царапины было замедлено. Кроме того, результаты анализа миграции через Transwell показали, что число мигрировавших клеток, экспрессирующих PDX1, было в 1,5 раза меньше, чем контрольных клеток. Полученные нами *in vitro* результаты свидетельствуют о возможной роли гена PDX1 как супрессора миграции клеток рака поджелудочной железы. Результаты проведенных нами экспериментов *in vitro* согласуются с данными, полученными нашими коллегами из Института молекулярной генетики РАН в *экспериментах in vivo*: на организменной модели 2х-дневных эмбрионов *D. rerio* было показано, что экспрессия гена PDX1 значительно подавляет распространение клеток рака поджелудочной железы внутри организма рыбы. *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 19-15-00317).*

ВЛИЯНИЕ ГАФД НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК К ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

М.А. Микеладзе, Б.А. Маргулис, И.В. Гужова, В.Ф. Лазарев
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Гипоксия является неизменным спутником развития злокачественных солидных опухолей. Вследствие быстрого увеличения клеточной массы раковой опухоли кровеносная система не успевает снабжать злокачественные ткани кислородом. Гипоксия, как стрессовый фактор, может по-разному влиять на прогрессию неоплазмы. С одной стороны, в гипоксических условиях раковая клетка начинает синтезировать ряд белков, таких как HIF-1, способствующих повышению пролиферации и инвазии, и росту злокачественного новообразования. С другой стороны, гипоксия вызывает нарушение обмена активных форм кислорода (АФК), денатурацию и даже агрегацию некоторых белков. Длительная и тяжелая гипоксия приводит к активации апоптоза и клеточной гибели. Одним из белков, склонных к формированию агрегатов при нарушение гомеостаза АФК в клетке, является ключевой фермент гликолитического цикла глицеральдегид-3-фосфатдегидрогиназа (ГАФД). В условиях дефицита кислорода происходит интенсификация гликолиза, поэтому поддержание ГАФД в нативной конформации критически важно для выживания раковых клеток. Контроль за фолдингом белков и поддержание их нативной конформации обеспечивает шаперонная система клетки, в том числе белки семейства Hsp70. Ингибирование шаперонной системы в настоящее время рассматривается как важный элемент противоопухолевой терапии. Целью нашей работы была усиление денатурации и агрегации ГАФД в условиях гипоксии, вызванное лекарственным ингибированием шаперонной функции Hsp70. В качестве ингибитора шаперонной активности Hsp70 использовали препарат AEAC. Мы установили, что AEAC блокирует взаимодействие Hsp70 с денатурированным ГАФД, стимулируя агрегацию последнего. Мы доказали, что AEAC подавляет пролиферативную активность клеток глиомы крысы C6 в условиях гипоксии. Потенциал препарата AEAC как противоопухолевого агента был подтвержден нами на модели *in vivo* на крысах. Мы продемонстрировали, что разобщение ГАФД с Hsp70 с помощью AEAC в условиях гипоксии приводит к агрегации гликолитического фермента и значительному увеличению продолжительности жизни животных. Вызванная гипоксией агрегация ГАФД снижает жизнеспособность опухолевых клеток, а индукция агрегации ГАФД может быть важной частью стратегии противоопухолевой терапии. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №18-74-10087.*

РОЛЬ HSP70 В ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОМ ПЕРЕХОДЕ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА DLD1, ВЫЗВАННОГО ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ГЛЮКОЗЫ В СРЕДЕ

А.Д. Никотина[1], Д.А. Алексеев[2], Б.А. Маргулис[1], И.В. Гужова[1]
[1]Институт цитологии РАН; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Колоректальный рак является высоко метастазирующим, и у четверти пациентов с опухолями этого типа на момент диагноза выявляются метастазы в печени. Следует учитывать, что риск развития и агрессивность данного заболевания существенно увеличивается при диабете. Известно, что молекулярной основой метастазирования является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). Давно было показано, что раковые клетки характеризуются повышенным количеством белков теплового шока, и HSP70 в частности. Белки этого семейства выполняют защитные функции, в том числе подавляют апоптоз, препятствуют старению, усиливают пролиферацию. Однако в настоящее время нет исследований, которые бы прояснили функцию HSP70 в эпителиально-мезенхимальном переходе опухолевых клеток. Таким образом, целью нашего исследования было изучить роль HSP70 в процессе ЭМП в клетках колоректального рака с использованием модели основанной на высоком содержании глюкозы в ростовой среде. В первую очередь нам необходимо было разработать адекватную модель ЭМП. Для этого клетки на протяжении 7 дней содержали в условиях гипергликемии с конечной концентрацией глюкозы в среде 80 мМ. В качестве исследуемых параметров мы выбрали анализ пролиферационных и миграционных свойств клеток, а также уровень Е-кадгерина. С помощью прибора xCelligence мы показали снижение пролиферативного и увеличение миграционного потенциала клеток, что косвенно подтверждает прохождение клетками ЭМП. Уровень Е-кадгерина в опытных образцах снижался, что также свидетельствует о приобретении клетками мезенхимального фенотипа. В дальнейшем, с помощью лентивирусной трансдукции, мы получили клеточную линию с пониженным уровнем HSP70 и исследовали вышеописанные параметры. Мы показали, что обработка высокой концентрацией глюкозы не влияет на пролиферацию и миграцию клеток DLD1 shHSP70 в тестах, проведенных с помощью прибора xCelligence, а исследование биохимических маркеров показало снижение уровня мезенхимальных маркеров в клетках с пониженным содержанием HSP70 введенных в ЭМП. Таким образом, можно утверждать, что HSP70 способен оказывать стимулирующее действие в процессах ЭМП.

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ПРОЯВЛЯЮТ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НА МОДЕЛИ ХИМЕРНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ

А.Р. Рахматуллина, Р.Н. Мингалеева, Ю.В. Филина, Е.Е. Гаранина, А.А. Ризванов, Р.Р. Мифтахова
Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Прогрессия опухоли происходит путем взаимодействия опухолевых и стромальных клеток микроокружения. Мезенхимальные стволовые клетки – ключевые компоненты микроокружения опухоли, способные модулировать ангиогенез, влиять на структуру внеклеточного матрикса и профиль про- и противовосполительных цитокинов. Ранее в нашей лаборатории были получены химерные сфероиды, образованные при ко-культивировании клеток карциномы предстательной железы PC3 и иммортализованных мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Ко-культивирование опухолевых и стромальных клеток в трехмерных структурах позволяет исследовать межклеточное взаимодействие в условиях *in vitro*. Цель работы – оценить влияние

МСК и секретируемых ими паракринных факторов на чувствительность клеток карциномы предстательной железы к химиотерапевтическим препаратам. В ходе работы был определен уровень 40 цитокинов и хемокинов в супернатанте химерных и опухолевых сфероидов, рост которых производился в присутствии препаратов доцетаксел, топотекан и 5-фторурацил. Сфероиды, состоящие из опухолевых клеток PC3 и химерные сфероиды PC3-МСК показали различную чувствительность к доцетакселу (ингибирование образования сфероидов 29±2,8% и 11,2±1,1% соответственно), топотекану (52±1,7% и 24,1±5,3%) и 5-фторурацилу (40,2±2,1% и 25,4±3,1%). При действии препарата 5-фторурацил в супернатанте химерных сфероидов наблюдался высокий уровень CCl27, HGF по сравнению с супернатантом опухолевых сфероидов. Уровни аналитов M-CSF, HGF были выше в химерных сфероидах при действии препарата топотекан, а уровень фактора роста SCGF-b при воздействии препарата доцетаксел. Данные молекулы приводят к выживанию и пролиферации клеток путем активации сигнальных путей PI3K/Akt, Wnt. Таким образом, ко-культивирование опухолевых и мезенхимальных стволовых клеток приводит к активации сигнальных путей, отвечающих за пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, что является потенциальным механизмом, способствующим развитию опухоли и терапевтической резистентности опухолевых клеток.

PHYSCION СНИЖАЕТ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЛЕГКОГО К ЦИСПЛАТИНУ ЧЕРЕЗ АФК ОПОСРЕДОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ

Д.В. Савенкова, К.В. Гавриш, В.С. Скрипова, А.К. Нургалиева, Л.Ф. Минигулова, Р.Г. Киямова
Опенлаб «Биомаркёр», Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Снижение чувствительности клеток рака легкого и поджелудочной железы к химиотерапии является распространенной проблемой онкологии, приводящей к рецидиву и прогрессированию заболевания. Многообещающим подходом для преодоления лекарственной резистентности является комбинированная терапия. Поэтому целью работы стало исследование чувствительности клеточных линий поджелудочной железы (AsPC-1) и рака легкого (H1299) к цисплатину в сочетании с ингибитором 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6PGD) Physcion. Активация 6PGD пентозофосфатного метаболического пути (ПФП) важна для роста многих видов опухолевых клеток [Lin, 2015]. Согласно биоинформатическому анализу PGD участвует в развитии резистентности опухолевых клеток к действию цисплатина [Гапонова, 2017]. Также известно, что метаболизм опухолевых клеток значительно смещается в сторону ПФП для обеспечения клеток дополнительными молекулами никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH), которые являются важнейшими антиоксидантами, блокирующими активные формы кислорода (АФК), быстро синтезируемые при пролиферации опухолевых клеток [Lin, 2015]. Клеточные линии AsPC-1 и H1299 инкубировали с цисплатином (1–128 мкм) в сочетании с Physcion (25, 50 и 150 мкм) для изучения жизнеспособности клеток, а также с цисплатином (1–16 мкм) в сочетании с Physcion (150 мкм) для определения уровня АФК. Установлено, что Physcion приводил к повышению чувствительности клеточной линии AsPC-1 к цисплатину в 1,6 раза, а клеточной линии H1299-в 2,2 раза. В клеточных линиях AsPC-1 и H1299 также наблюдалось повышение уровня АФК в 1,7 и 2,5 раза соответственно. Результаты свидетельствуют о том, что Physcion повышает чувствительность опухолевых клеточных линий AsPC-1 и H1299 к цисплатину, вероятно, за счет повышения уровня АФК. Молекулярный механизм может заключаться в том, что Physcion ингибирует третью реакцию ПФП, которая является источником дополнительного NADPH опухолевых клеток, тем самым лишая клетку дополнительных антиоксидантов. Полученные данные важны для понимания механизмов чувствительности/устойчивости опухолей к терапии цисплатином терапии и могут найти применение в клинической практике в будущем. Работа выполнена при поддержке государственной программы развития конкурентоспособности Казанского федерального университета.

ДЕЛЕЦИИ ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ И СУПРЕССОРОВ МОГУТ ВЫЗЫВАТЬ ВОЗНИКНОВЕНИЯ КЛОНОВ С АМПЛИФИКАЦИЯМИ РЕГИОНОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СПОСОБНОСТЬ К МЕТАСТАЗИРОВАНИЮ

М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, И.В. Дерюшева, П.В. Казанцева, Е.Ю. Гарбуков, А.М. Певзнер, Е.М. Слонимская, Н.В. Литвяков
НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия

Предыдущие наши исследования клональной эволюции опухоли молочной железы в процессе неоадъювантной химиотерапии показали появление в процессе лечения после химиотерапии опухолевых клонов, несущих амплификации в двух и более регионах: 3p, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 13q, 16p, 18chr, 19p, 19q, что было сопряжено с гематогенным метастазированием. Учитывая современную теорию происхождение основной массы опухолевых клеток от опухолевых стволовых клеток, метастатический клон с амплификациями формирует потомки опухолевых стволовых клеток, в которых была индуцирована геномная нестабильность. По нашему мнению, образование двух и более амплификаций в данных регионах является ключевым событием канцерогенеза, которое обеспечивает опухоль способностью к диссеминации. Целью настоящей работы явилась изучение связи наличия амплификаций в исследуемых регионах с нарушениями в основных генах, отвечающих за поддержание целостности генома в опухоли молочной железы. В исследование было включено 143 больных РМЖ IIA–IIIB стадии. В качестве исследуемого материала, были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм^3), взятые до лечения. Выделяли ДНК из образцов до лечения. Для анализа аберраций числа копий проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах. В качестве основных генов, отвечающих за поддержание целостности генома, были изучены: CDKN1A, CDKN2A, CDKN1B, CDKN2B, ATM, TP53, PTEN, RB1, BRCA1. В результате проведенного исследования было установлено, что наличие амплификаций в исследуемых регионах связано с делециями исследуемых генов. В частности, для гена TP53 показано, что у больных с отсутствием амплификаций хромосомных регионов частота делеции TP53 составляет 28%, у больных с одной амплификацией 58% и у больных с 2 и более 71% (Fisher test, p=0,001). Аналогичный результат был показан для генов ATM (увеличение частоты делеций до 76%, p=0,001), RB1 (увеличение частоты делеций до 65%, p=0,0003), BRCA1 (увеличение частоты делеций до 58%, p=0,001). *Работа поддержана грантом РНФ № 17-15-01203.*

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕАСОМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

Т.М. Астахова[1], Г.В. Родоман[2], И.Р. Сумеди[2], А.С. Плеханова[2], Н.В. Свириденко[2], М.М. Мелоян[2], Н.П. Шарова[1]
[1]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия; [2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

Клеточный пул протеасом представлен множественными формами, различающимися структурой и спецификой гидролиза белков. Понимание особенностей функционирования протеасом в тех или иных злокачественных клетках может быть важным для разработки новых подходов к диагностике и терапии онкологических заболеваний. Цель данной работы – исследовать пулы протеасом различных злокачественных новообразований млекопитающих и человека и выявить характеристики протеасом, перспективные для применения в медицинской практике. В работе использовали рак щитовидной железы и рак прямой кишки пациентов, асцитную карциному Krebs-II мыши, гепатоклеточную карциному мыши, индуцированную дипином, а также карциносаркому Walker 256, привитую крысам Brattleboro с дефектом синтеза аргинин-вазопрессина. Примечательно, что опухоль Walker 256 после короткого периода роста у этих крыс регрессирует до полного исчезновения. Показано, что практически все исследованные растущие опухоли характеризуются увеличенной экспрессией общего пула и активатора PA700 протеасом и повышенной химотрипсинподобной активностью протеасом (ХТПА) в сравнении с контрольной тканью. В процессе регрессии карциносаркомы Walker 256 ХТПА и уровень активатора PA700 в ней резко уменьшаются. Полученные результаты указывают на перспективность использования ХТПА и активатора PA700 в качестве мишеней для терапии широкого спектра онкологических заболеваний. Интересно, что в увеличенном пуле протеасом опухоли Krebs-II содержание иммунных форм существенно ниже, чем в контроле. В остальных трех растущих опухолях, напротив, экспрессия иммунных протеасом, особенно протеасом с субъединицей LMP2, значительно выше контроля, что, на первый взгляд, свидетельствует о перспективности применения ингибиторов субъединицы LMP2 для терапии некоторых типов рака. Вместе с тем, следует учитывать, что подобные ингибиторы могут нарушить не только функции иммунной системы пациентов, но и ряд других процессов, протекающих с участием субъединицы LMP2, к числу которых относится передача сигналов между нейронами. На наш взгляд, более актуально использовать показатель экспрессии субъединицы LMP2, наряду с ХТПА, для разработки метода диагностики трудноразличимых типов рака щитовидной железы. *Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 18-04-00017).*

ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ PARP-1 ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА

Д.О. Кошкина[1], Н.В. Малюченко[1], А.В. Любителев[1], А.В. Феофанов [1,2], В.М. Студитский[1,3]
Биологического факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; Москва, Россия; [3]Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, США

Поиск новых ингибиторов PARP-1 представляет актуальную задачу таргетной терапии опухолевых заболеваний. Известные ингибиторы PARP-1, являющиеся НАД+- миметиками и направленные на связывание с каталитическим доменом, демонстрируют неблагоприятные фармакологические показатели, вызванные высокой цитотоксичностью из-за интерференции с НАД+-зависимыми клеточными процессами. Перспективным направлением для разработки новых менее токсичных ингибиторов PARP-1 может стать поиск молекулярных поверхностей-мишеней в функциональных доменах PARP-1 отличных от каталитического. В настоящей работе представлены данные по молекулярному моделированию взаимодействий BRCT домена PARP-1 с нуклеосомой. Известно, что домен BRCT обеспечивает коммуникацию PARP-1 с различными белками-партнерами, включая Sox2, XRCC1, hUbc9, oct-1 и YY1, что может определять участие PAPR-1 в большом разнообразии клеточных процессов. Перспективность использования BRCT в качестве мишени подтверждают недавние работы (Na et al. ,2015; Liu et al., 2017), в которых было показано, что ингибирование или удаление этого фрагмента предотвращает взаимодействия PARP-1 с партнерами. Для молекулярного докинга в качестве подвижной молекулы был выбран BRCT-домен человеческого PARP1). Модель нуклеосомы была построена на основании структуры кор-нуклеосомы высокого разрешения (к которой симметрично были добавлены 30 п.н. линкерной ДНК. Методом докинга был выявлен уникальный сайт посадки BRCT на нуклеосомную ДНК среди 30 стартовых ориентаций движущейся молекулы. Существенный вклад в такое взаимодействие вносят электростатические силы, поскольку практически вся поверхность BRCT-домена положительно заряжена. Выявленный сайт посадки BRCT находится в области изгиба ДНК вблизи ее входа в нуклеосому. Также было обнаружено взаимодействие между BRCT доменом и «кислотным лоскутом» («acidic patch») – небольшим участком, сформированным отрицательно заряженными аминокислотными остатками (а.о.) гистонов H2A/H2B. Выявлена важность а.о. K438 и K441, мутации которых способны изменить функциональную активность PARP-1. Выявленные молекулярные поверхности BRCT-домена могут быть использованы для поиска и разработки новых ингибиторов PARP-1. *Работа поддержана проектом РФФИ ОНКО_а No17-54-33045.*

ПЕРСОНИФИЦИРОВАННАЯ АДОПТИВНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ ЛЕЙКЕМИИ И ЛИМФОМЫ Т-КЛЕТКАМИ, ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ХИМЕРНЫМИ АНТИГЕННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

А.В. Степанов, Р.С. Калинин, А.Г. Габибов
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

За последнее десятилетие область клеточной терапии с помощью Т-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR), совершила значительный скачок от оптимизации структуры химерных рецепторов и экспериментов на модельных животных до успешного клинического применения. Изначальный вектор развития CAR был направлен в сторону увеличения активации, цитотоксичности и персистенции модифицированных Т-клеток. Однако, первые же попытки клеточной терапии больных продемонстрировали необходимость создания более безопасных CAR Т-клеток. Основным недостатком

существующих CAR является низкая селективность и повреждение здоровых тканей и органов. Поэтому поиск более специфических маркеров патологических лимфоцитов для направленной терапии представляется крайне актуальной задачей. Для лимфопролиферативных опухолевых заболеваний, таких как лимфомы и лейкозы, характерной особенностью является моноклональная экспансия патологического лимфоцита. Каждый опухолевый клон несет на своей поверхности В или Т клеточный рецептор, который отличает его от всех остальных клеток организма. Для создания персонифицированной адоптивной иммунотерапии у пациентов с диагнозами лейкемия и лимфома были изолированы опухолевые клетки. После определения нуклеотидных последовательностей, кодирующих гены вариабельных доменов иммуноглобулинов, с помощью методов фагового дисплея или аутокринной селекции репортерных клеток были идентифицированы специфических лиганды злокачественных Т- и В- клеток. На основе идентифицированных опухоль-специфических лигандов были получены химерные антигенные рецепторы. Т клетки, модифицированные данными персонифицированными CAR, эффективно элиминировали раковые клетки *in vitro, ex vivo и in vivo*. Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 17-74-30019).

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ И СПЕЦИФИЧНАЯ ДЕТЕКЦИЯ РНК-МАРКЕРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КНИ-БИОСЕНСОРА

Е.В. Дмитриенко[1,3], О.В. Наумова[2], Б.И. Фомин[2], А.В. Порываева[1], М.С. Купрюшкин[1], А.А. Ломзов[1,3], И.А. Пышная[1], Д.В. Пышный[1]
[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; [2]Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН; [3]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Детекция и количественное определение РНК – важный и перспективный инструмент диагностики различных заболеваний. Стратегия использования диагностических маркеров на основе РНК является одной из самых успешных, так как именно данный класс соединений первыми попадают в кровь в ответ на возникновение отклонений и патологий. С каждым годом литературные данные пополняются всё большим количеством маркеров, имеющих РНК природу, которые сигнализируют о раковых опухолях, отклонениях у плода, вирусах и т.д. Одним из лидирующих направлений диагностики на данный момент являются биосенсоры на основе КНИ-транзистора (Кремний На Изоляторе). Он представляет собой массив нанопроволок, длина которых от сотен до единиц нанометров, на подложке из оксида кремния. В основе принципа действия КНИ-биосенсора лежит модуляция проводимости в ответ на изменение окружения проволоки, а именно общего заряда и его экранирования. Для обеспечения эффективной и высокочувствительной детекции РНК-маркеров КНИ-биосенсором перспективно использование незаряженных аналогов нуклеиновых кислот – фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов. В рамках данной работы разработана система для выявления с помощью КНИ-биосенсора онкомаркерных последовательностей РНК, ассоциированных с немелкоклеточным раком легкого, и органоспецифичных мРНК, на примере мРНК белка тропонина, который выбрасывается в кровь в случае разрыва сердечной мышцы. Сконструированы модельные системы, состоящие из пула нативных и модифицированных олигонуклеотидных зондов, комплементарных различным участкам, соответствующих матричных органоспецифичных РНК и РНК, ассоциированных с немелкоклеточным раком легкого, а также модельных фрагментов соответствующих РНК, несущих флуоресцентную метку. Исследованы физико-химические свойства полученных олигонуклеотидов и определены параметры формирования гибридизационных комплексов. Осуществлен поиск и оптимизация состояния поверхности для выявления РНК-маркеров. Разработаны протоколы иммобилизации зондов и гетерофазного выявления модельных матриц (индивидуальных и в составе смесей), ассоциированных с развитием заболеваний человека. С использованием КНИ-биосенсора продемонстрирована возможность выявления РНК-маркеров с чувствительностью до 10–15 М. *Работа выполнена при поддержке 0309-2016-0004 и 0309-2018-0017.*

РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В СЕЗОНЕ 2017–2018 гг.

К.И. Лебедев, М.А. Плотникова, Е.А. Елпаева, С.А. Клотченко
НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Острые респираторные заболевания занимают ведущее место в структуре инфекционных болезней человека. Они обуславливают 20–50% временных потерь трудоспособности и являются ведущими причинами госпитализации. Экономический ущерб от ОРЗ можно сравнить лишь с затратами на профилактику и лечение длительно текущих сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Целью исследования было определение доминирующих возбудителей респираторных заболеваний в Санкт-Петербурге, а также попытка найти клинико-лабораторные корреляции между типом патогена и состоянием пациента.

Для этого методом ПЦР было проведено исследование назофарингеального отделяемого у 300 пациентов с диагнозом ОРЗ в период 2017–2018 гг. По нашим данным в структуре заболеваемости данной группы пациентов основная роль принадлежала гриппу (суммарно 37%: (H1N1)pdm09 4%, H3N2 16%, грипп В 17%). Пневмококковые моноинфекции, микст-инфекции и негриппозные ОРВИ встречались примерно с одинаковой частотой и составляли 7% каждая от общего числа. Среди выявленных бактериальных респираторных инфекций доминировали пневмококковые инфекции. Микст-инфекции также были практически тотально представлены ассоциацией пневмокков и вирусов гриппа (с одинаковой частотой (H1N1)pdm09, H3N2, грипп В).

Среди ОРВИ негриппозной этиологии было больше случаев риновирусной (50%) и РС-инфекции (22%), доля других инфекций была меньше (парагрипп 5%, аденовирус 6%, метапневмовирус 11%, коронавирус 6%). При сопоставлении полученных нами данных с данными предыдущих лет оказалось, что в структуре заболеваемости населения гриппом и ОРВИ основная роль также принадлежала гриппу, а среди ОРВИ негриппозной этиологии также было больше случаев риновирусной и РС-инфекции. Кроме того, были определены корреляции между видом патогена и клинической картиной. У 89% пациентов с выявленным штаммом гриппа (H1N1)pdm09 отмечалось более тяжёлое течение инфекции, характеризовавшееся более выраженными симптомами общей интоксикации. Ринорея и заложенность носа были отмечены лишь у 22% пациентов с

(H1N1)pdm09. В то время как у пациентов, инфицированных другими штаммами вируса гриппа и ОРВИ негриппозной этиологии, данные симптомы были определены в 100% случаев. *Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, Соглашение № 14.604.21.0180, УИН RFMEFI60417X0180.*

ПОИСК Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-го ТИПА

И.А. Шагина[1], М.В. Погорелый[2], А.А. Миневрина[2], И.З. Мамедов[2], В.Л. Загайнов[3], К.Г. Корнева[3], М. Израельсон[1,2], О.В. Британова[1,2], Д.М. Чудаков[1,2]
[1]Отдел молекулярных технологий, Институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва; [2]Отдел геномики адаптивного иммунитета, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва; [3]Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

Диабет 1 типа (T1D) представляет сложное генетически обусловленное заболевание, риск развития которого в 40-50% случаев ассоциирован с наследованием некоторых аллельных вариантов генов локуса MHCII, относящихся к HLA-DR и HLA-DQ. Значительная часть данных о патогенезе T1D была получена на экспериментальной модели спонтанно развивающегося диабета у мышей (NOD). Причиной развития данного заболевания является разрушение инсулин-продуцирующих бета-клеток поджелудочной железы (ПЖ) аутореактивными CD4 и CD8 лимфоцитами. На начальной стадии развития T1D наблюдается повышенная инфильтрация ПЖ дендритными клетками, макрофагами, Т- и В-лимфоцитами. Далее, на этапе деструкции бета-клеток включаются аутореактивные CD4 и CD8 Т клоны, специфически узнающие ряд аутоантигенов, относящихся к инсулину, глутаматдекарбоксилазе (GAD65) и др. Одним из наиболее перспективных направлений в лечение T1D может быть направленная иммунотерапия, позволяющая удалить аутореактивные Т- и В-лимфоциты. Проведение такой терапии на ранней стадии заболевания позволит сохранить оставшиеся на момент появления первых симптомов заболевания 10-20% бета-клеток, продуцирующих инсулин. Наше исследование направлено на поиск Т-клеточных рецепторов, ассоциированных с T1D у человека, и последующим получением деплецирующих моноклональных антител к этим рецепторам. В данном исследовании приняли участие 250 человек в возрасте от 5 до 20 лет (больные с T1D и их здоровые сибсы). Типирование HLA-гаплотипа с высоким разрешением проводили с помощью NGS секвенирования. Получали библиотеки кДНК ТКР из образцов периферической крови по протоколу, разработанному ранее в лаборатории, и последующим секвенированием на платформе HiSeq. Обработка данных проводилась с помощью пакета программ MiGEC, MiXCR. Для поиска последовательностей ТКР, потенциально ассоциированных с T1D, был использован статистический подход ALICE. Показана статистически значимая корреляция T1D с аллельными вариантами DQA*03:01, DQB*03:02локуса MHCII в исследуемой когорте. Наиболее многочисленной в когорте оказалась группа носителей гаплотипа DR3/DR4, связанной с высоким риском развития T1D. На текущей стадии анализа репертуаров ТКР выявлено несколько кластерных последовательностей TRBV5, с высокой вероятностью ассоциированных с патогенезом T1D

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ RT-PCR ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА ПАНЛЕЙКОПЕНИИ КОШЕК И ПАРВОВИРУСА СОБАК

М.Ф. Тимина, А.В. Панченко, Л.Е. Павлова, А.А. Агумава
НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия

Вирус панлейкопении кошек имеет генетическое родство с возбудителем парвовирусного энтерита собак, оба относятся к группе парвовирусов и поражают эпителий тонкого кишечника, лимфатическую систему, клетки костного мозга и другие ткани. Вакцинация снижает риск развития заболевания, но универсального метода лечения парвовирусной инфекции не существует. Диагноз ставится на основании лабораторных исследований крови и фекалий методом ПЦР. Существует коммерческая тест-система, но она имеет не высокую чувствительность к некоторым штаммам парвовируса. Цель работы: разработка экспериментальной ПЦР тест-системы реального времени (RT-ПЦР) для детекции вируса панлейкопении кошек и парвовируса собак. В базе GenBank провели поиск полногеномных нуклеотидных последовательностей парвовирусов собак и кошек. Путем множественного выравнивания 100 полногеномных сиквенсов была получена консенсусная последовательность ДНК вирусных штаммов и выявлен высокий процент их гомологии (98%). Интерактивно с помощью программы Primer3 к консенсусной последовательности подобрали прямой, обратный праймеры и зонд с температурами отжига выше 60С. Для исключения ложного отжига провели проверку на специфичность с помощью BLAST, которая показала 100% гомологию исключительно к штаммам парвовирусов собак и кошек. RT-ПЦР проводили с TaqMan пробами. мечеными красителем ROX на 5' конце и гасителем RTQ2 на 3' конце. ПЦР-смесь в объеме 30 мкл и включала: 67 мМ Tris-HCl (pH 8,3); 17 мМ (NH4)2SO4; 2,5 мМ MgCl2; 0,1% Tween 20; 0,12 мг/мл БСА; 8% глицерол; 0,2 мМ каждого дНТФ; 0,1мкл каждого праймера (100 пкмоль/мкл), 0,03 мкл зонда (100 пкмоль/мкл); 2,5 Ед Syn-Taq полимеразы (с технологией горячего старта). Исследовали 162 образца ДНК, выделенной из крови 119 собак и 43 кошек с помощью коммерческой ПЦР тест-системы фирмы «Вектор-Бест» и собственной, экспериментальной. Результаты с использованием 2-х тест систем совпали на 100%. Для подтверждения положительных результатов провели прямое и обратное секвенирование ампликонов, показавшее гомологию с вирусами панлейкопении кошек и парвовирусам собак более, чем на 95%. Соотношение уровня сигнал/шум в разработанной тест-системе не уступало коммерческой.

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕТА-ЛАКТАМОВ, ТЕТРАЦИКЛИНОВ И АМФЕНИКОЛОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

А.В. Бартош, А.Н. Берлин, А.В Жердев, Б.Б. Дзантиев
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Эффективность антибиотикотерапии заболеваний с бактериальным генезисом зависит от выбранного препарата, его дозирования, индивидуальных особенностей пациента, чувствительности либо резистентности патогена к данному антибиотику. Широкое использование антибактериальных препаратов в медицине и ветеринарии привело к распространению антибиотикорезистентности у патогенных штаммов микроорганизмов, следствием которой становится переход заболевания в хроническую форму и неэффективность дальнейшего приема выбранного препарата. В связи с этим в современной медицине крайне востребован персонализированный подход к лечению, применительно к антибиотикотерапии предусматривающий мониторинг изменений уровня вводимого антибиотика в организме и своевременную корректировку дозирования. Для обеспечения массового быстрого и производительного мониторинга нами разработаны тест-системы, основанные на принципе иммунохроматографии и обеспечивающие детекцию антибиотиков разных групп – бета-лактамов, тетрациклинов и амфениколов – в сыворотке крови человека. Для снижения предела обнаружения в тест-системах реализован принцип непрямого мечения иммунных комплексов, то есть сочетания свободных специфических антител и аффинных к ним конъюгатов наночастиц золота. Сопоставлены варианты тест-систем и способы проведения анализа, позволяющие варьировать предел обнаружения. Так, для тетрациклина предел визуальной детекции составил от 0,1 до 10 нг/мл, в зависимости от схемы анализа. Охарактеризованы возможности количественной оценки содержания антибиотиков на основании фотометрической регистрации меченных наночастицами золота иммунных комплексов. Достигнутые аналитические параметры позволяют проводить мониторинг уровня антибиотиков в крови после применения в терапевтических дозах. Тест-системы адаптированы к характеристике сывороток крови без дополнительной пробоподготовки. Продолжительность анализа – 10 минут. Разработанные тест-системы позволяют оценивать фармакодинамику препаратов и корректировать их дозировку для достижения наибольшей эффективности лечения и сокращения рисков побочных эффектов. *Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 14.613.21.0061 от 17.07.2017, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61317X0061.*

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТУБАСТАТИН А, ИНГИБИТОРА ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ HDAC6, В ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У МЫШЕЙ

С.В. Демьяненко, В.А. Дзреян, В.В. Гузенко, В.В. Никул, М.А. Негинская
Лаборатория «Молекулярная нейробиология», Академия биологии и биотехнологии, Южный федеральный университет, Ростов-нв-Дону, Россия

На моделях инсульта и нейродегенерации у животных показано защитное действие неселективных ингибиторов гистондеацетилаз (HDACs), но их длительное использование связано со значительными побочными эффектами, поскольку разные изоформы HDACs могут способствовать гибели клеток мозга или оказывать защитное действие. Мы изучили возможное нейропротекторное действие тубастатина А, высокоселективного ингибитора HDAC6, на клетки пенумбры после фототромботического инсульта (ФТИ) в восстановительный период через 1, 3 7 или 14 дней после воздействия. ФТИ – модель ишемического инсульта, при котором фокальная окклюзия мозговых сосудов создается при локальном лазерном облучении коры мозга после введения фотосенсибилизатора бенгальского розового. TUNEL-окрашивание показало значительное увеличение процента апоптотических клеток в области, прилегающей к ядру инфаркта, через 4 и 7 дней после ФТИ. Иммунофлуоресцентное исследование выявило признаки апоптоза в ядрах HDAC6-позитивных клеток пенумбры. Это свидетельствует о связи ФТИ-индуцированного апоптоза в коре мозга мышей со сверхэкспрессией HDAC6. Введение тубастатина А в дозе 25 мг/кг в течение 3-х суток после ФТИ снижало процент апоптотических клеток в пенумбре через 1 и 3 дня после последнего введения препарата (через 4 и 7 дней после ФТИ) по сравнению с контрольной группой. При этом средний объем повреждения коры мозга мышей снижался почти в два раза с 22 до 13 мм3 на 4 сутки после ФТИ и с 14 до 7 мм3 на 7 сутки. Таким образом, HDAC6 участвует в развитии апоптоза в пенумбре в постишемический период и его избирательное ингибирование может являться многообещающей стратегией для лечения ишемического инсульта. *Работа поддержана грантом РНФ №18-15-00110.*

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ДЕФИЦИТА АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В МЕХАНИЗМЕ ТОКСИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ

Е.В. Тетерина, В.В. Голоборщева, Р.К. Овчинников, А.Ю. Роман, В.Л. Бухман
Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия

Для болезни Паркинсона характерно избирательное поражение дофаминергических нейронов черной субстанции и формирование телец Леви, важным компонентом которых является агрегированный белок альфа-синуклеин. Альфа-синуклеин вовлечен в регуляцию оборота дофамина в синапсах, а мутации в кодирующем его гене (SNCA) ассоциированы с наследственными формами болезни Паркинсона. Для изучения роли альфа-синуклеина в механизме паркинсонического синдрома, индуцированного нейротоксином МФТП, использованы две линии мышей нокаутных по Snca гену. В геноме классической линии Sncatm1Rosl/J помимо делеции экзонов Snca присутствуют регуляторные последовательности, способные оказывать эффект на транскрипцию окружающих генов. Вторая, созданная нами линия Sncatm1.2Vlb/J имеет минимальные модификации Snca локуса и не содержит посторонних последовательностей, за исключением единственного loxP сайта.

Группы нокаутных самцов линий Sncatm1Rosl/J и Sncatm1.2Vlb/J и мышей дикого типа (WT) были сформированы из общих пометов от скрещивания гетерозиготных производителей. В возрасте 3 месяцев внутрибрюшинно вводили МФТП (30 мг/кг в сутки) в течение 5 дней. Через 21 день исследовали изменения двигательной функции в установке для анализа походки CatWalk (Noldus). По окончании тестирования, определяли уровни дофамина и его метаболитов в полосатом теле с помощью

высокоэффективной жидкостной хроматографии. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью Т-теста и критерия Манна–Уитни.

У нокаутных мышей линий Sncatm1Rosl/J и Sncatm1.2Vlb/J выявлены изменения показателей двигательной функции, вызванные нейротоксическим эффектом МФТП, и они отличны от таковых у животных дикого типа. Статистически значимое снижение уровней дофамина и его метаболитов в полосатом теле было показано у всех животных, получавших МФТП, однако у мышей линии Sncatm1Rosl/J оно было менее выраженным.

Сравнительный анализ двух линий мышей, нокаутных по гену Snca, показал, что нарушение функции альфа-синуклеина изменяет эффект МФТП на моторное поведение мышей, но не на обмен дофамина в нигростриатной системе. *Работа поддержана грантом РНФ (№ 19-14-00064), содержание животных программой (ФАНО № 0090-2017-0016).*

МЕТОД ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОГРЕССИИ FUS-ПРОТЕИНОПАТИИ НА ПРЕСИМПТОМАТИЧЕСКОЙ СТАДИИ У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

К.Д. Чапров, В.В. Сорокин, Т.А. Иванова
Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия

Нарушение метаболизма и функции белка FUS, участвующего в транспорте и процессинге РНК, является важной составляющей патогенеза ряда форм бокового амиотрофического склероза (БАС) и фронтотемпоральной лобарной дегенерации (ФТЛД). Прогрессия FUS-протеинопатии определяет переход пресимптоматической стадии заболевания в симптоматическую и коррелирует с выраженностью клинической манифестации симптомов. В нервной системе трансгенных мышей FUS[1-359] экспрессируется укороченная форма белка FUS человека и воспроизводится прогрессирующая FUS-протеинопатия с фенотипом БАС. Эта линия мышей была использована в представленном исследовании для изучения поздней пресимптоматической стадии, которая представляет особый интерес для практической медицины и разработки методов ранней диагностики БАС. Исследование двигательной функции мышей проводили на установке CatWalk (Noldus, Нидерланды), позволяющей регистрировать изменения в распределении давления и веса тела животного на каждую из четырех конечностей. Для отработки алгоритма тестирования ежедневно регистрировали 187 детектируемых установкой CatWalk параметров походки у трансгенных и контрольных самцов дикого типа из общих пометов начиная с возраста 70 дней. Математический анализ выявил ряд статистически достоверных изменений в параметрах походки у трансгенных мышей на пресимптоматической стадии модельного заболевания за 20 дней до перехода в симптоматическую стадию. Разработанные протокол и алгоритм анализа были затем применены для исследования эффективности действия нейропротекторного соединения DF-402 на поздней пресимптоматической стадии FUS-протеинопатии. Было показано, что DF-402 увеличивает продолжительность пресимптоматической стадии и позволяет отсрочить дебют клинической манифестации модельного заболевания у FUS[1-359] мышей. Разработанный алгоритм анализа походки у FUS[1-359] мышей может быть использован для направленного отбора новых соединений, способных модулировать прогрессию пресимптоматической стадии FUS-протеинопатии. *Исследование поддержано грантом РНФ (№ 18-15-00357), соединения для тестирования получены в работах, обеспеченных Государственным заданием ИФАВ РАН (тема по ГЗ № 0090-2017-0019).*

МУТАЦИЯ В ГЕНЕ HTT КРИТИЧЕСКИ ВЛИЯЕТ НА ОРГАНИЗАЦИЮ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ СТРУКТУР И ПОДВИЖНОСТЬ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГЕНТИНГТОНА

А.С. Таран[1], О.А. Зубкова[2], А.Е. Харитонов[2], О.С. Лебедева[2], М.А. Лагарькова[2], И.Б. Алиева[3]
[1]МГУ им. Ломоносова, биологический факультет; [2]ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; [3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Болезнь Гентингтона (БГ) – тяжелое неизлечимое наследственное аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, вызванное экспансией CAG-повторов в гене белка хантингтина (HTT). Клиническая картина БГ включает комплекс двигательных, эмоционально-волевых и когнитивных расстройств, приводящих к тяжелой физической и психической инвалидизации и смерти пациентов. На морфологическом уровне БГ проявляется прогрессирующей гибелью срединных шипиковых нейронов стриатума. HTT экспрессируется во всех клетках и тканях млекопитающих, наибольшее влияние эта мутация оказывает на нервные клетки. Функция HTT у человека не ясна, не описаны нарушения, происходящие у больных на клеточном и субклеточном уровне. В настоящей работе исследовали морфофункциональные нарушения, происходящие в клетках первичных культур фибробластов, полученных из биоптатов кожи пациентов с БГ, с разным количеством CAG-повторов в гене HTT (42, 44 и 76). Контролем послужили фибробласты из биоптатов кожи здоровых доноров, соответствующих больным по полу и возрасту. Было показано, что в фибробластах, полученных от пациентов с БГ, структура сети микротрубочек критически не изменяется, однако нарушается взаимное расположение γ-актиновых структур и микротрубочек. В клетках больных нарушается процесс формирования первичных ресничек: количество ресничек ниже, а их средняя длина меньше, чем в фибробластах здоровых доноров. Фибробласты пациентов с БГ имеют более короткую стадию распластывания, способны к поляризации до достижения полного распластывания и начинают двигаться до завершения стадии поляризации. На стадии поляризации мутантные фибробласты не формируют выраженный ведущий край и «хвост», их ламелла образует многочисленные тонкие выросты на переднем крае. При выползании в экспериментальную рану фибробласты пациентов двигались быстрее, чем контрольные клетки, однако их движение было менее упорядоченным и более хаотичным, они часто меняли направление движения. Полученные результаты впервые демонстрируют, что при БГ морфологические нарушения, вызванные мутацией в гене HTT, затрагивают структуры, составляющие цитоскелет клеток, что приводит к функциональным нарушениям – изменению характеристик распластывания и клеточной подвижности. *Поддержано РНФ (грант №19-15-00425) и Программой развития МГУ (PNR 5.13).*

ИНДУЦИРОВАННЫЕ МИКРОВЕЗИКУЛЫ ПРОЯВЛЯЮТ ИММУНОФЕНОТИП И АНГИОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ РОДИТЕЛЬСКИХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

М.О. Гомзикова, С.К. Клетухина, О.А. Неустроева, С.В. Курбангалеева, А.А. Ризванов
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

В связи с высоким риском возникновения нежелательных эффектов в применении стволовых клеток (СК), была разработана концепция бесклеточной терапии, в которой вместо СК используются внеклеточные везикулы (ВВ), полученные из СК. ВВ содержат биологически активные молекулы родительских клеток и опосредуют межклеточную связь, а также могут быть использованы в качестве средства доставки, поскольку сохраняют поверхностные белки родительских клеток, а наличие цитоплазматической мембраны у ВВ защищает содержимое от деградации. Предполагается, что мембранные везикулы, индуцированные цитохалазином В (МВ-ЦВ), будут использоваться в качестве носителя для доставки терапевтических средств. Однако ангиогенная активность и терапевтический потенциал МВ-ЦВ, полученных из мезенхимальных СК (МСК), остаются неизвестными.

МВ-ЦВ получали из МСК человека согласно ранее описанному протоколу. Морфологию МВ-ЦВ МСК анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Протеомный анализ, мультиплексный анализ и иммуноокрашивание использовали для характеристики молекулярного состава МВ-ЦВ МСК. Перенос поверхностных белков от клетки-донора к клетке-реципиенту посредством МВ-ЦВ МСК, был продемонстрирован с использованием иммуноокрашивания и конфокальной микроскопии. Ангиогенный потенциал МВ-ЦВ МСК оценивали с использованием подкожной имплантации МВ-ЦВ МСК *in vivo* в смеси с матриксом Matrigel**.**

МВ-ЦВ МСК человека сохраняют содержимое родительских МСК, такие как факторы роста, цитокины, хемокины. Мы обнаружили, что МВ-ЦВ МСК имеют сходный иммунофенотип с родительскими МСК и экспрессируют те же поверхностные рецепторы ($CD90^+$, $CD29^+$, $CD44^+$, $CD73^+$). Кроме того, МВ-ЦВ МСК способны переносить мембранные рецепторы на поверхность клеток-мишеней *in vitro*. Наконец, МВ-ЦВ МСК индуцируют ангиогенез *in vivo* после подкожной инъекции взрослым крысам.

МВ-ЦВ МСК человека имеют сходные с родительскими МСК содержимое, иммунофенотип и ангиогенную активность. МВ-ЦВ МСК способны переносить мембранные рецепторы на поверхность клеток-мишеней. В этой связи мы считаем, что человеческие МВ-ЦВ МСК могут быть использованы в качестве бесклеточной терапии дегенеративных заболеваний.

АПРОБАЦИЯ ПРОИЗВОДНОГО ГИДРОКОРТИЗОНА В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ РЕАБИЛИТАЦИОННОЙ ТЕРАПИИ ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ НА КРЫСИНОЙ МОДЕЛИ

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

Повреждения, вызываемые черепно-мозговой травмой (ЧМТ), инициируют целый комплекс патологических нарушений в функционировании нервных клеток, обуславливающие их гибель спустя длительное время после травмирования. Так, возникающий вследствие ЧМТ окислительный стресс может индуцировать образование цитотоксических белковых агрегатов. Одним из таких белков может быть глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), которая при окислении образует цитотоксичные фибриллы. Доказано, что ГАФД участвует в образовании ко-агрегатов с такими патогенными белками, как β-амилоид, атаксин-1, мутантный хантингтин и др. При стрессовых условиях агрегаты ГАФД обнаруживаются во внеклеточной среде и в физиологических жидкостях в виде токсичных для окружающих клеток агрегатов. Ранее в нашей лаборатории была продемонстрирована значительная роль ГАФД в формировании и токсичности экзогенных ко-агрегатов с полиглутамином. При этом блокирование ГАФД в межклеточном пространстве при помощи производного гидрокортизона RX624, способного конкурентно связываться с ГАФД, уменьшает цитотоксичность комплекса ГАФД-полиглутамин. В результате исследования влияния экзогенной ГАФД на клетки нейробластомы человека SH-SY5Y, было выяснено, что фермент способен в короткое время проникать в нервные клетки с образованием агрегатов и инициировать клеточную гибель. Применение RX624 приводит к блокированию взаимодействия экзогенной ГАФД с нейронами и уменьшению клеточной гибели. Эффективность использования RX624 для уменьшения ГАФД-опосредованной посттравматической гибели нейронов была продемонстрирована на модели ЧМТ крыс. Положительный результат лечения заключается в ингибировании цитотоксического воздействия спинномозговой жидкости травмированных животных, коррелирующим с уменьшением количества агрегатов ГАФД в ней, а также купировании развития двигательного дефицита у травмированных животных. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №18-74-10087.*

ВАРИАЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ РИБОСОМНОГО ПОВТОРА В ГЕНОМАХ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ, ИМЕЮЩИХ В АНАМНЕЗЕ ДИАГНОЗ ГИПОКСИИ

М.С. Конькова[1], Е.С. Ершова[1], Г.В. Шмарина[1], А.В. Мартынов[1], А.В. Артюшин[1], О.Н. Агафонова[1], Д.А. Пухальская[1], Н.В. Захарова[3], Г.П. Костюк[3], В.Е. Голимбет[2], Т.В. Лежейко[2], С.В. Костюк[1]
[1]Медико-генетический научный центр; Научный центр психического здоровья; [3]Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева Москва, Россия

Геном человека содержит несколько сотен копий рибосомного повтора (рДНК), которые локализованы на пяти акроцентрических хромосомах в виде тандемных повторов. Ранее показано, что геномы больных шизофренией (SZ) содержат увеличенное число копий рДНК по сравнению с здоровыми донорами (ЗД). В возникновении SZ задействованы два фактора: генетический и негативные воздействия внешней среды. Предполагается, что одной из внешних причин возникновения SZ является перенесенная гипоксия организма. Если генетический и внешний факторы действуют независимо, то можно предположить, что геномы больных SZ, перенесших внутриутробную гипоксию, не отличаются от геномов ЗД по содержанию рДНК.

Выборка ЗД включала 238 человек без наследственной патологии в возрасте от 17 до 65 лет. Выборки больных SZ, с наличием (SZ-H) или отсутствием (SZ-NE) гипоксии в анамнезе включали по 144 человека того же возраста и пола, что и ЗД. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов крови. Применили метод нерадиоактивной количественной гибридизации (NQH).

Содержание рДНК в геномах SZ-H (533±103 копии) было немного ниже (p=0,002), чем в геномах SZ-NE (565±120). Однако обе выборки больных SZ с высокой вероятностью (p<10-30) содержали больше рДНК, чем ЗД (406±116).

Независимо от наличия в анамнезе внешнего фактора (гипоксии) шизофрения, как правило, развивается на фоне высокого содержания рибосомного повтора в геноме. *Работа поддержана грантом РНФ № 18-15-00437.*

ХАРАКТЕРИСТИКА КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G ПРИ ШИЗОФРЕНИИ И РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

Н.М. Кротенко[1,2], Л.П. Смирнова[2], И.А. Меднова[2], П.А. Лемешко[1], Д.А. Паршукова[2], Н.В. Кротенко[1], А.В. Семке[2], С.А. Иванова[2]
[1]Сибирский государственный медицинский университет; [2]НИИ психического здоровья Томский НИМЦ, Томск, Россия

Способность иммуноглобулинов катализировать биохимические реакции и изучение их ферментативной функции является одной из перспективных направлений современной биохимии. Шизофрения (Ш) и рассеянный склероз (РС) относятся к заболеваниям с высоким уровнем окислительного стресса (ОС) в организме больных. Модифицированные под действием АФК белки приобретают антигенные свойства и способствуют увеличению аутоиммуногенности в патогенезе болезни.

В обследование включено 60 человек, страдающих Ш, 56 человек с верифицированным диагнозом РС, подтверждённым МРТ, и 30 здоровых лиц. IgG выделяли с помощью аффинной хроматографии на колонках с протеин G-сефарозой. Каталазную (КТ) активность IgG определяли по скорости утилизации H_2O_2 спектрофотометрически. Кинетические параметры КТ оценивали с помощью метода нелинейной регрессии по программе Origin Pro v.8.6 и в обратных координатах Лайнуивера-Берка.

Показано, что КТ IgG при Ш и РС достоверно выше, чем у здоровых лиц (p<0,05) и составляет 1,60 mM/mg Pt/min при Ш, у больных РС – 5,86 mM/mg Pt/min) и у здоровых лиц – 0,71 mM/mg Pt/min. Из анализа сродства к аффинному субстрату, гомогенности выделенных антител и их гель-фильтрации в условиях pH-шока доказано, что активность КТ IgG являются их собственным свойством. Специфический ингибитор фермента каталазы 3-амино-1,2,4-триазол ингибирует КТ активность IgG как у пациентов, так и в контроле. Константы Михаэлиса КТ активности IgG пациентов с Ш – 38,5 mM; с РС – 36,6 mM, свидетельствуют о высоком сродстве абзимов к субстрату. В итоге образуется более прочный фермент-субстратный комплекс, на диссоциацию которого тратится много времени, поэтому IgG обладают меньшей скоростью катализа, чем фермент.

Полагаем, что КТ активность IgG является одним из компенсаторных механизмов, позволяющим снизить уровень ОС в организме пациентов. Полученные данные могут быть положены в основу разработок персонализированной антиоксидантной терапии заболеваний, вызываемых ОС. *Работа поддержана грантом РНФ № 18-15-00053.*

РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ФЕРМЕНТА ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПЕРЕНОСЕ ПОЛИГЛУТАМИНОВЫХ ПАТОЛОГИЙ

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

Большинство нейродегенеративных заболеваний связано с появлением цитотоксических олигомеров и агрегатов мутантных белков, вызывающих дисфункцию и гибель клеток мозга. Болезнь Хантингтона обязана наличию мутации в гене белка хантингтина, что приводит к появлению аномально длинной полиглутаминовой последовательности и агрегации. В наших предыдущих работах мы показали, что клеточный фермент ГАФДГ (глицеро-фосфат-3 гидрогеназа) значительно усиливает процесс агрегации мутатного хантингтина. Целью нашей работы было установить роль ГАФДГ в межклеточном переносе мутантного хантингтина. В модельных клетках нейробластомы крысы PC-12HttQ103, несущих индуцибельную генетическую конструкцию, включающую ген 1го экзона хантингтина и зеленого флуоресцентного белка, экспрессию патогенного белка вызывали добавлением в среду Ponasterone A (PA). В этих клетках наблюдали рост агрегатов мутантного хантингтина. Анализ кондиционированной среды с помощью метода ультрафильтрации показал, что агрегаты, оказавшиеся в среде, содержат мутантный хантингтин и ГАФДГ. С помощью метода конфокальной микроскопии мы показали, что в клетках SK-N-SH, трансфецированных геном, кодирующим короткий, непатогенный фрагмент хантингтина Q25, при инкубации с Q58 в комплексе с ГАДФГ происходило образование агрегатов, в то время как при инкубации с чистым Q58 агрегация в период наблюдения не происходила. Чтобы понять, какую роль может играть ГАФДГ в способности Q58 проникать в клетки мы использовали метод Cell ELISA и убедились, что ГАФДГ многократно усиливает способность патогена проникать в клетки. С помощью ингибиторного анализа с применением ингибиторов внутриклеточного транспорта, мы показали, что ГАФДГ, как сам, так и в комплексе с Q58, проникает в клетки-акцепторы с помощью кватрин-зависимого эндоцитоза, в то время как вхождение Q58 было лишь незначительно подавлено при применении хлорпромазина, ингибитора рецептор-зависисимого эндоцитоза. Полученные данные позволяют предположить, что фермент гликолиза ГАФДГ, транспортирует мутантный хантингтин в клетки и способствует прионизированию нормальных клеточных белков клетки-акцептора.

ПОЛУЧЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ КОЖНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МОНОЗИГОТНЫХ БЛИЗНЕЦОВ ДИСКОРДАНТНЫХ ПО БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Е.В. Новосадова, Е.Л. Арсеньева, Ю.Н. Ванюшина, Т.В. Малова, А.Х. Алиева, М.И. Шадрина, П.А Сломинский, И.А. Гривенников
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) – одно из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний. Развитие БП напрямую связано с нарушением функционирования базальных ганглиев, что в свою очередь является следствием дегенерации и гибели дофаминергических нейронов в черной субстанции. Несмотря на длительное и интенсивное исследование БП этиопатогенез заболевания до конца не изучен. БП может быть как наследственной, обусловленной генетическими факторами, так и спорадической. В настоящее время проводятся масштабные транскриптомные, метиломные и протеомные исследования на посмертных тканях мозга пациентов с БП, с целью выявления новых генов ассоциированных с БП, а также построения метаболических путей. Однако данные полученные в результате таких исследований будут не точными. Все пациенты проходят длительную медикаментозную терапию, и их анамнез отягощен сопутствующими заболеваниями. В настоящее время альтернативной моделью для изучения БП служат индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) полученные от пациентов с данной патологией. В большинстве работ исследование проводится на ИПСК полученных от пациентов с генетической формой заболевания, при этом разница в профилях экспрессии генов между пациентами существенно варьируется ввиду различий общей структуры генома. В наше исследование мы включили три пары монозиготных близнецов дискордантных по спорадической форме БП. После информированного согласия у доноров были взяты кожные экспланты, из которых затем были получены первичные фибробласты и охарактеризованы. Методом ПЦР в реальном времени в этих клетках было показано изменение профилей экспрессии отдельных генов у пациентов с БП по сравнению с их здоровыми родственниками. Так у всех пациентов была снижена экспрессия гена быстрого ответа jun-b, который вовлечен в широкий спектр биологических ответов клетки. Также у всех пациентов оказалась снижена экспрессия нейротрофического фактора NT3, тогда как экспрессия двух других NGF и BDNF была одинаковой у больных и здоровых близнецов. С помощью векторов на основе вируса Сендай, содержащих ряд транскрипционных факторов необходимых для репрограммирования, из всех фибробластов были получены линии ИПСК. *Работа поддержана грантом РФФИ № 18-315-20009.*

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДИСТАНТНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГИППОКАМПА ПОСЛЕ ФОКАЛЬНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА В НЕОКОРТЕКСЕ

М.В. Онуфриев, О.А. Левченко, М.Ю. Степаничев, Ю.В. Моисеева, Н.А. Лазарева, Н.В. Гуляева
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

Причиной большинства ишемических инсультов является окклюзия средней мозговой артерии, в результате которой развивается очаговое поражение мозга, распространяющееся на различные области коры больших полушарий. Вторичные повреждения затрагивают регионы мозга, которые располагаются вне области инфаркта, в том числе и гиппокамп, с повреждением которого связано развитие когнитивных нарушений и постинсультной депрессии. Активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО) является одним из первых физиологических ответов на церебральную ишемию и повышенная секреция глюкокортикоидов может приводить к нарушению функций гиппокампа, изменению уровня нейротрофинов и к формированию предрасположенности к постинсульной депрессии. Модуляция активности ГГНО отчасти осуществляется гиппокампом, в том числе и за счет минерало- и глюкокортикоидных рецепторов. Гиппокамп является морфологически и функционально неоднородной структурой и для него характерен септо-темпоральный (дорсовентральный) градиент. В работе исследовали динамику развития кортикостероидного и нейровоспалительного ответов в дорсальной (ДГ) и вентральной (ВГ) частях гиппокампа крыс после окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА). Активация ГГНО на ранних сроках после ОСМА влечет за собой повышение уровня кортикостерона в крови аккумуляцию кортикостерона в ВГ как ишемического, так и контралатерального полушарий, но не в ДГ. Тем не менее, существенных изменений уровня обшего BDNF в крови после ОСМА не наблюдалось. Индуцированное ОСМА развитие нейровоспаления по уровню провоспалительного цитокина ИЛ-1β совпадает с повышенным уровнем кортикостерона на ранних и отдаленных сроках реперфузии и также затрагивает преимущественно ВГ обеих полушарий. Таким образом, ВГ является более чувствительным к ОСМА, чем ДГ, и развитие кортикостероидного ответа и нейровоспаления идет в ВГ ни только ишемического, но и контралатерального полушарий. *Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-015-00519а.*

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА SWISS CHEESE *DROSOPHILA MELANOGASTER* ВЫЗЫВАЕТ НАРУШЕНИЕ БИОГЕНЕЗА ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЮ

Н.В. Сурина, Е.В. Рябова, Д.Р. Жмуйдина, С.В. Саранцева
Санкт-Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Санкт-Петербург, Россия

Липидные капли (ЛК) – это динамичные клеточные органеллы, важнейший резервуар нейтральных липидов. Однако разнообразие их свойств не ограничивается поддержанием энергетического гомеостаза. В ЛК модифицируются и хранятся такие молекулы, как сигнальные предшественники и гидрофобные витамины; ЛК реагируют на различные типы стресса, в т. ч. и окислительный; участие в процессах созревания и хранения некоторых вирусных и клеточных полипептидов. Особый интерес представляет собой роль ЛК в нервной системе. В некоторых работах было показано присутствие липидных капель в нейронах и глиальных клетках при определенных заболеваниях нервной системы. Предполагается, что динамическое изменение количества и размера липидных капель может играть роль в процессах нейродегенерации. Наследственные спастические параплегии (НСП) – это наследственные заболевания, характеризующиеся дегенерацией аксонов моторных и сенсорных нейронов,

слабостью нижних конечностей и спастичностью. Мутации в более чем 50 локусах могут вызывать НСП, а клеточные функции соответствующих мутантных белков имеют удивительно широкий диапазон. Одну из форм НСП вызывают мутации в гене, кодирующем NTE (нейротоксичную эстеразу). Также открыты синдромы Boucher-Neuhaüser, Gordon Holmes, Oliver-McFarlane и Laurence-Moon, которые вызваны мутациями в данном гене. У *Drosophila melanogaster* найден ортолог NTE – ген swiss-cheese. SWS выполняет функции эстеразы, у *Drosophila melanogaster* активным центром является Ser985. Данный белок расщепляет фосфатидилхолин на мембранах клетки и ЭПС. Поэтому логично предположить, что SWS является активным участником липидного обмена. Кроме того, его участие в жизнедеятельности глиальных клеток и нейронов, а также то, что мутации и нокдаун sws приводят к нейродегенерации, показаны в некоторых работах [Ryabova E., et al., 2018; Kretzschmar D. et al., 1997]. В данной работе были использованы линии *Drosophila melanogaster* с измененной экспрессией гена sws в нейронах и определенных типах глиальных клеток. Липидные капли в мозге *Drosophila melanogaster* были идентифицированы с помощью специфичного к нейтральным липидам красителя – BODIPY493/503. Максимальные изменения в биогенезе липидных капель наблюдаются у линии с нокдауном sws в нейронах.

ВЛИЯНИЕ СОРБЕНТОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА ПРИ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Н.А. Терехина[1], Г.А. Терехин[2], Е.В. Жидко[1], А.Г. Орбиданс[2]
[1]Пермский государственный медицинский университет им Е.А. Вагнера;[2]Пермская государственная фармацевтическая академия МЗ РФ Пермь, Россия

Цель работы – оценить влияние сорбентов на показатели минерального обмена при острой алкогольной интоксикации. В плазме крови 35 людей и 78 белых крыс с острой алкогольной интоксикацией определяли содержание меди, железа, цинка, магния, церулоплазмина и трансферрина. Животные были разделены на 3 группы. Первую группу (контрольную) составили 20 интактных крыс. Животным второй и третьей группы ежедневно в течение месяца внутрижелудочно вводили 40% раствор этанола в дозе 1/3 LD50. На 30 день эксперимента вызывали острую алкогольную интоксикацию введением 40% раствора этанола в дозе 0,5 LD50. Крысам третьей группы с 15 дня исследования через 30 минут после введения этанола внутрижелудочно вводили один из сорбентов (полисорб, литовит, или сапропель) в дозе 3000 мг/кг.

При острой алкогольной интоксикации в плазме крови крыс содержание меди, железа, цинка и трансферрина снижается, содержание магния не изменяется, а содержание белка антиоксиданта церулоплазмина увеличивается почти в 1,5 раза. Лечебное введение любого из трех сорбентов приводит к нормализации содержания церулоплазмина в плазме крови крыс при острой алкогольной интоксикации. Нормализация содержания меди, цинка и железа при острой алкогольной интоксикации наблюдается при введении литовита либо сапропеля. Введение энтеросорбента полисорба при острой алкогольной интоксикации не повлияло на содержание микроэлементов в плазме крови крыс. Экспериментально обосновано использование сорбентов при острой алкогольной интоксикации. Установлено нормализующее влияние литовита и сапропеля на содержание меди, железа, цинка в плазме крови при острой алкогольной интоксикации. Выявлены свойства энтеродоноросорбента у сапропеля. В плазме крови больных людей при острой алкогольной интоксикации снижается содержание меди, железа, церулоплазмина и трансферрина. Включение полисорба-МП в состав комплексной терапии при острой алкогольной интоксикации способствует сокращению длительности комы, более выраженной динамике восстановления функций сердечно-сосудистой системы, снижению продолжительности стационарного лечения больных.

МЕТИЛИРОВАНИЕ И АЦЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНА Н3 В НЕЙРОНАХ И АСТРОЦИТАХ ПЕНУМБРЫ ПОСЛЕ ФОТОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

С.В. Демьяненко, В.А. Дзреян, В.В. Гузенко, М.А. Негинская, А.Б. Узденский
Академия биологии и биотехнологии, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

При ишемическом инсульте вокруг очага инфаркта образуется переходная зона, пенумбра, в которой возможно спасение клеток. Для изучения роли эпигенетических процессов в повреждении клеток пенумбры мы изучили модификации гистона Н3, включая метилирование лизинов 4 и 9 и ацетилирование лизина 9, которые регулируют транскрипцию генов, в первые сутки после локального инфаркта коры мозга крысы. В качестве экспериментальной модели ишемического инсульта был использован фототромботический инсульт, в котором окклюзия сосудов коры мозга создавалась путем лазерного облучения после инъекции бенгальского розового (БР). БР не проникает в клетки и остается в сосудистом русле. Лазерное облучение вызывает агрегацию тромбоцитов, закупорку сосудов и локальный инфаркт. Методы исследования – вестерн блот, иммунофлуоресцентная микроскопия. Через 4 и 24 часа в нейронах и астроцитах пенумбры повышался уровень метилирования лизина 4 в гистоне Н3 (H3K4me) по сравнению с контралатеральной корой тех же или ложнооперированных крыс. Это свидетельствует об активации белкового синтеза в клетках. Колокализация H3K4me-позитивных и апоптотических клеток свидетельствует о связи H3K4me с апоптозом клеток пенумбры. Известно, что диметилирование лизина 9 в гистоне Н3 (H3K9diMe) подавляет транскрипцию и синтез белков. Но мы не наблюдали изменений уровня H3K9diMe и его локализация в ядрах нейронов и астроцитов пенумбры, а отсутствие колокализации H3K9diM и TUNEL свидетельствует о неучастии этого белка в апоптозе клеток пенумбры. Иммунофлуоресцентная микроскопия и иммуноблоттинг показали снижение ацетилирования лизина 9 в гистоне Н3 (H3K9Ac) в пенумбре через 4 и 24 часа после ФТИ. При этом снижался коэффициент колокализации H3K9Ac с маркером нейронов NSE, но повышалась колокализация с маркером астроцитов GFAP. Это указывает на деацетилирование гистона Н3 в глиальных клетках, что может приводить к подавлению белкового синтеза. Так как деацетилирование гистона Н3 выполняется гистондеацетилазами, то их ингибиторы или активаторы гистонацетилтрансфераз могут стимулировать транскрипцию генов и служить нейропротекторами после ишемического инсульта. *Работа поддержана грантом РНФ №18-15-00110. А.Б. Узденский поддержан грантом Минобразования РФ №6.4951.2017/6.7.*

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ T56-LIMKI, ИНГИБИТОРА LIM КИНАЗЫ И АКТИВАТОРА КОФИЛИНА, В ИШЕМИЧЕСКОЙ ПЕНУМБРЕ ПОСЛЕ ФОТОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

С.В. Демьяненко, В.А. Дзреян, В.В. Гузенко, Е.В. Бережная, А.Б. Узденский
Академия биологии и биотехнологии, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

При ишемическом инсульте повреждение распространяется из очага инфаркта и образуется переходная зона, пенумбра, которую потенциально можно спасти. Но эффективный нейропротектор пока не найден. Для разработки новых способов защиты мы изучили роль белка кофилина, который деполимеризует актин, участвует в перестройке цитоскелета и в изменениях формы и движении клеток, в сохранности ткани пенумбры после фототромботического инсульта (ФТИ, модель ишемического инсульта). При ФТИ после инъекции фотосенсибилизатора бенгальского розового (БР), который не проникает в клетки и остается в сосудистом русле, лазерное облучение вызывает агрегацию тромбоцитов, закупорку сосудов и локальный инфаркт в коре мозга. С помощью иммунофлуоресцентного анализа и протеомных микрочипов мы показали значительное повышение экспрессии кофилина через 4 и 24 часа после ФТИ. Это могло вызывать разрушение актинового цитоскелета в клетках коры мозга крысы. LIM киназа фосфорилирует и тем самым ингибирует кофилин. Ее ингибирование реактивирует кофилин и стимулирует деполимеризацию актина, необходимую для изменений формы и подвижности клеток. Для изучения роли LIM киназы и кофилина в дегенеративных процессах в пенумбре мы использовали ингибитор LIM киназы T56-LIMKi. Суспензию T56-LIMKi вводили перорально мышам в дозе 30 мг/кг в 0,2 мл 0,5% раствора карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) 1 раз в сутки в течение 5 суток после ФТИ. Контрольная группа мышей получала суспензию КМЦ. Введение T56-LIMKi уменьшало объем ФТИ-индуцированного инфаркта в мозге мышей в 2,1 и 3,4 раза на 7-й и 14-й после ФТИ. Ингибитор увеличивал процент нормохромных нейроцитов и уменьшал процент пикнотических, гипо- и гиперхромных нейронов. T56-LIMKi снижал плотность глиального рубца и стимулировал образование новых капилляров на его периферии. У животных, получавших T56-LIMKi, отмечалась меньшая разреженность нейропиля в области пенумбры и более сформированная зона деструкции. Таким образом, T56-LIMKi может быть перспективным нейропротектором. *Работа поддержана грантом РНФ №18-15-00110.*

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА МИЕЛИНОВЫХ ОБОЛОЧЕК МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫМ АНТИОКСИДАНТОМ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Е.К. Фетисова, М.С. Мунтян, Б.В. Черняк
МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия

Рассеянный склероз (РС) является демиелинизирующим заболеванием центральной нервной системы. Как и в случае других демиелинизирующих заболеваний типичным признаком РС является повреждение олигодендроцитов, ответственных за синтез миелина. С развитием этой патологии все чаще связывают окислительный стресс и дисфункцию митохондрий. Лечение митохондриально-направленными антиоксидантами считается перспективным направлением в борьбе против окислительного стресса и митохондриальной дисфункции. Для тестирования этого подхода нами использована культуральная модель РС на основе эксплантатной культуры мозжечка крысят. Для получения культуры эксплантаты мозжечка помещали на покровное стекло. Через 10-14 дней на стекле получали монослой первичной культуры олигодендроцитов, мигрировавших из эксплантата. Моделирование РС проводили путем обработки культуры бактериальным токсином – липополисахаридом (ЛПС). ЛПС добавляли с первого дня культивирования до последнего. Модель ЛПС считается одной из лучших моделей заболевания РС. Известно, что токсическое действие ЛПС опосредуется через клетки микроглии, в которых запускается каскад реакций, ведущих к окислительному стрессу. В использованной нами культуре клетки микроглии располагаются в эксплантатах. Особенностью использованного нами варианта культуральной модели на основе эксплантатной культуры мозжечка является наличие общего слоя питательной среды, омывающего эксплантат и монослой мигрировавших из него клеток. Это позволяет всем клеткам такой культуры обмениваться стрессовыми факторами. Токсическое воздействие ЛПС проявлялось в резком снижении миелина в олигодендроцитах, что было проверено окрашиванием антителами к основному белку миелина. Добавление соединения SkQ1, митохондриально-направленного антиоксиданта нового поколения, одновременно или через несколько дней после обработки культуры ЛПС на протяжении всего периода инкубации с ЛПС, оказывало сильный защитный эффект. Терапия на основе митохондриально-направленных антиоксидантов могла бы дать новую возможность для лечения заболеваний, связанных с окислительным стрессом, таких как РС, проказа и боковой амиотрофический склероз, при которых описано повреждение миелиновых оболочек.

РОЛЬ ЯДЕРНОГО РЕЦЕПТОРА PPARγ В РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА ОКСИЛИПИНОВ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ В ПЕРВИЧНЫХ АСТРОЦИТАХ КРЫС

Д.В. Чистяков[1,2], Н.В. Азбукина[3], А.А. Астахова[1], С.В. Горяинов[2], В.В. Чистяков[2], М.Г. Сергеева[1]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Российский университет дружбы народов, Москва; [3]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Исследования последних лет показывают перспективную терапевтическую роль транскрипционного фактора рецептора активаторов пролиферации пероксисом PPARγ в регуляции воспалительных заболеваний ЦНС. Ранее в нашей лаборатории было показано, что активация PPARγ в глиальных клетках мозга играет двойственную роль при развитии нейровоспаления – увеличивается экспрессия как антивоспалительных медиаторов (цитокин IL-10), так и белка циклооксигеназы 2 – одного из ключевых ферментов каскада метаболизма полиненасыщенных жирных кислот. В данном исследовании была поставлена цель изучить процессы синтеза оксилипинов астроцитами при развитии воспалительного ответа под действием агониста PPARγ – росиглитазона (RG) и антагониста PPARγ – GW9662. В ходе эксперимента клетки прединкубировали в течение 30 минут с тестируемыми веществами, и затем стимулировали на 4 часа липополисахаридом (LPS), агонистом Толл-подобного рецептора 4. Уровень оксилипинов (метаболитов арахидоновой (AA), докозагексаеновой (DHA), линолевой (LA) и эйкозапентаеновой

(EPA) кислот) образующихся под действием ферментов семейства циклооксигеназ (COX), липоксигеназ (LOX) и эпоксигеназ анализировали с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра Shimadzu 8040. Получено, что RG модулирует ответы клеток на стимуляциию LPS. RG увеличивает концентрацию высвобождаемых клетками свободных кислот AA, DHA, EPA, провоспалительных метаболитов AA получаемых по COX-пути (простагландины E, Д серии), а также противовоспалительных веществ (13-HDoHE (метаболит DHA)и др.). Изменение концентрации метаболитов AA, LA и DHA получаемых по LOX-пути не обнаружено. Это указывает на селективное действие RG направленное на COX-путь. Такая селективность агониста PPARγ приводящая к управлению синтезом оксилипинов по разным ветвям метаболизма полиненасыщенных жирных кислот обнаружена впервые. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 16-15-10298-П», масспектрометрический анализ выполнен при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ по Программе повышения конкурентоспособности РУНД «5-100» среди ведущих мировых научно-образовательных центров на 2016-2020 гг.*

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ mPGES-1 НА СИНТЕЗ ОКСИЛИПИНОВ ПРИ АКТИВАЦИИ ТОЛЛ-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 В ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ МОЗГА

Н.В. Азбукина[1], Д.В. Чистяков [2,3], А.А. Астахова[2], С.В. Горяинов[3], В.В. Чистяков[3], М.Г. Сергеева[2]
[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики и [2]НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; [3]Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Разработка новых противовоспалительных лекарственных средств является актуальной задачей современных молекулярно-биологических исследований. mPGES-1 (микросомальная простагландин E синтаза 1) является одним из ключевых ферментов синтеза простагландинов E серии и признан многообещающей мишенью для разработки новых противовоспалительных лекарственных средств. Предполагается, что ингибирование mPGES-1 блокирует только продукцию PGE2, не влияя на выработку PGI2 и других простагландинов, что позволяет избежать осложнений, связанных с применением селективных ингибиторов циклооксигеназ. Влияние ингибирования PGES-1 на воспалительный ответ и синтез оксилипинов в глиальных клетках мозга не изучено. Цель данного исследования: определить влияние ингибитора PGES-1 CAY10678 на синтез оксилипинов при развитии ответа при активации толл-подобного рецептора 4 (ТЛР4) в первичных астроцитах крысы. Для оценке влияния CAY10678 на воспалительный ответ глиальных клеток первичные астроциты крысы инкубировали 30 минут с CAY10678, затем на 4 ч. стимулировали липополисахаридом (агонист ТЛР4). Изменение синтеза оксилипинов (метаболитов арахидоновой, докозагексаеновой, линолевой и экозопентаеновых кислот) образующихся под действием ферментов семейства циклооксигеназ, липоксигеназ и эпоксигеназ анализировалось методом UPLC-MS/MS (Shimadzu 8040, Nexera). Количественный анализ проводился с использованием 16 дейтерированных стандартов. Получено, что CAY10678 значимо снижал синтез метаболитов арахидоновой кислоты – PGE2, PGD2, при этом синтез 12-HETE увеличивался. Изменялись метаболиты линолевой кислоты 12,13-DiHOME и 9,10-DiHOME, образующиеся под действием липоксигеназ. Таким образом, ингибирование mPGES-1 не только снижает уровень синтеза PGE2, но и затрагивает более сложные взаимосвязи между различными ветвями трансформации полиненасыщенных жирных кислот (распределение между циклооксигеназной и липоксигеназной ветвями) в глиальных клетках ЦНС. *Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-34-20100 мол_а_вед, масспектрометрический анализ выполнен при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ по Программе повышения конкурентноспособности РУНД «5-100» среди ведущих мировых научно-образовательных центров на 2016-2020 гг.*

АНАЛИЗ НЕЙРОМЫШЕЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЛИЧИНОК *DROSOPHILA MELANOGASTER* ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА NTE ЧЕЛОВЕКА

Д.Р. Жмуйдина, Е.В. Рябова, Н.В. Сурина, С.В. Саранцева
Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Санкт-Петербург, Россия

Нейротоксичная эстераза (neuropathy target esterase, NTE) представляет собой нейрональный трансмембранный белок, обладающий фосфолипазной активностью, который вовлечён в развитие синдрома отложенной нейропатии, вызванной отравлениями фосфорорганическими эфирами (organophosphorus compound-induced delayed neuropathy, OPIDN. В свою очередь мутации в данном гене приводят к развитию ряда заболеваний: наследственной спастической параплегии (НСП) типа SPG39, синдрому Лоренса-Муна, сидрому Гордона Холмса, синдрому Гаучера-Нейгауза и синдрому Оливера-Макфарлейна. На сегодняшний день механизмы развития этих заболеваний до конца не изучены. Данный ген консервативен и имеет ортологов от дрожжей до млекопитающих. Таким ортологом у дрозофилы является ген swiss cheese (sws), который на 39% идентичен NTE человека. У мутантов sws наблюдается патология глии, которая образует многослойные мембранные структуры вокруг тел нейронов и аксонов. Также происходит гибель нервных клеток путем апоптоза и, как следствие, снижается продолжительность жизни насекомого. Ранее нами было показано, что SWS участвует в образовании нейромышечных соединений (НМС) у *Drosophila melanogaster:* мутации в гене приводят к изменению нейротрансмитерной функции и структуры цитоскелета НМС личинки дрозофилы. Данная работа направлена на изучение влияния NTE человека на морфологию и функциональное состояние НМС дрозофилы. В работе были использованы трансгенные линии *Drosophila melanogaster* с гиперэкспрессией NTE человека в нейронах (на фоне нормального sws). Препараты были анализированы при помощи лазерной конфокальной микроскопии. *Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-09041.*

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДЕГИДРОЗИНГЕРОНА

О.В. Бондарь, Р. Карут, М. Фаррух, Р.С. Павельев, Ю.Г. Штырлин
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Настоящая работа посвящена исследованию биологических свойств новых азагетероциклических аналогов дегидрозингерона (ферулоил метана), который представляет собой половину молекулы куркумина. В тестах на панели опухолевых клеточных линий синтезированные аналоги проявили сопоставимую с доксорубицином и куркумином, но большую чем у дегидрозингерона цитотоксичность. В частности, IC_{50} лидерных соединений 5b и 5g для опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 составила порядка 3.9 и 1.1 μM соответственно, у доксорубицина IC_{50} – 1.2 μM, у дегидрозингерона и куркумина – 31 и 8 μM соответственно. Дальнейшие исследования механизма действия лидерных соединений показали, что они индуцируют апоптоз опухолевых клеток посредством индукции внутриклеточных активных форм кислорода, деполяризации мембран митохондрий и, в случае 5g, посредством нарушения целостности цитоплазматической и ядерной мембраны. Также было установлено, что исследуемые соединения, как и дегидрозингерон, инициируют арест клеточного цикла в фазе G2/M и ингибируют дальнейший переход клеток в фазу G0/G1. Исследуемые соединения значимо подавляют миграционную активность опухолевых клеток и, следовательно, снижают их инвазивность и злокачественность. По данным белкового вестерн-блоттинга 5g значимо повышает в опухолевых клетках экспрессию белка адгезии и межклеточных контактов Е-кадгерина, что объясняет его ингибирующее влияние на миграцию. Также установлено, что 5g повышает экспрессию проапоптотического белка Bax и понижает содержание антиапоптотического белка Bcl-2. Также было установлено, что исследуемые соединения в нетоксичных концентрациях значительно увеличивают противоопухолевую активность доксорубицина и паклитаксела за счет синергетического эффекта. Можно заключить, что полученные соединения представляют несомненный интерес в качестве противоопухолевых агентов и могут быть в дальнейшем исследованы на моделях опухолей в комбинации с интеркаляторами (доксорубицин) и разобщителями деления клеток (паклитаксел). *Эта работа выполнена при поддержке государственного задания № 1.5086.2017/7.8 Министерства образования и науки РФ, а также программы развития Казанского (Приволжского) федерального университета*.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ФОТОАФИННОГО МЕЧЕНИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ МИШЕНЕЙ ГИДРОФОБНОГО БЛОКА ПЛЮРОНИКОВ

А.А. Ежов[1], А.Е. Жирнов[2], Е.В. Нам[3], Г.А. Бадун[2], А.В. Романюк[4], Н.С. Мелик-Нубаров[2], И.Д. Гроздова[2]
[1]Физический факультет и [2]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; [3]Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, University of Queensland, Brisbane, Australia; [4]Department of Chemistry, Aarhus University, Aarhus, Denmark

Известно, что синтетические блок-сополимера полиэтиленоксида и полипропиленоксида (плюроники) являются ингибиторами (хемисенсибилизаторами) множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Такое ингибирование делает опухолевые клетки чувствительными к терапевтическим дозам лекарств. Целью работы было выявление молекулярных мишеней для связывания гидрофобного полипропиленоксидного (ППО) блока плюроников в живых клетках и определение того, как эффективность хемосенсибилизации зависит от связывания плюроников с молекулярными мишенями. Метод фотоафинного мечения (фотореактивного зондирования) был успешно применен для обнаружения молекулярных мишеней, с которыми связывается гидрофобный ППО блок синтетического плюроника в живых клетках. Обработка клеток неионогенным блок-сополимером, меченным фоточувствительным зондом (производным трифторметилдиазирина), выявила связывание гидрофобного ППО блока с клеточными липидами. Авторадиография клеток, обработанных блок-сополимерами, содержащими блок ППО, показала присутствие этих блок-сополимеров в плазматической мембране и подтвердила, что именно липиды выступают в качестве основных мишеней для плюроников в клетках. Насколько нам известно, это первая прямая демонстрация взаимодействия гидрофобного блока ППО плюроников с липидным слоем клеточных мембран. Установлено, что использование флуоресцеина в качестве маркера, присоединенного к плюронику изменяет внутриклеточные мишени плюроника и придает ему способностью взаимодействовать с нерастворимыми в спирте клеточными компонентами. Связанные таким образом молекулы плюроника с присоединенным флуоресцеином не участвуют в обращении МЛУ. Показано что наименьшая концентрация блок-сополимера, достаточная для подавления МЛУ, может быть использована в качестве количественного параметра его хемосенсибилизирующей активности. Значения наименьшей концентрации уменьшаются по мере увеличения сродства плюроника к липидам и усиления его флипазной активности. Таким образом, взаимодействие гидрофобного блока ППО с липидами плазматической мембраны и его флипазная активность являются основной причиной подавления МЛУ плюрониками. *Работа поддержана грантом РФФИ 18-03-01234*.

МИКРОСКОПИЯ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ТАРГЕТНОГО ДЕЙСТВИЯ СОВРЕМЕННЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

А.Н. Шкарина[1], А.С. Гаранина[2], И.Б. Алиева[3]
[1]МГУ им. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики; [2]Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; [3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Несмотря на прогресс современной медицины, онкологические заболевания являются одной из наиболее распространенных причин смертности населения во всем мире. Высокая летальность при лечении онкологических больных связана с несовершенством современных методов терапии, отсутствием персонализированных подходов, а также с осложнениями, развивающимися в результате лечения. Поиск новых подходов к подбору препаратов (с учетом лекарственной чувствительности кон-

кретной опухоли, а также возможности снижения токсических и побочных эффектов) является весьма актуальным; необходимы новые подходы к тестированию препаратов в доклинических исследованиях с учетом эффектов на опухолевые сосуды и микроокружение опухоли. В настоящей работе методом микроскопии сверхвысокого разрешения (3D-SIM-микроскопия) исследовали клеточные повреждения, лежащие в основе таргетного действия и побочных эффектов противоопухолевых препаратов *in vitro*. Исследовали эффективность воздействия противоопухолевых препаратов с разным механизмом действия и спектр вызываемых ими внутриклеточных повреждений структурных компонентов клетки опухоли *in vitro*; а также эффект воздействия тестируемого лекарственного вещества на эндотелиальную проницаемость *in vitro*. Были подобраны дозы препаратов, вызывающие гибель митотических клеток опухоли *in vitro*, но не вызывающие барьерной дисфункции в монослое культивируемых *in vitro* клеток эндотелия. С помощью 3D-SIM-микроскопии были охарактеризованы (1) нарушения морфологии клеточных органоидов (ядро, система микротрубочек в интерфазе; митотическое веретено (включая отдельные его компоненты) в митозе, интерфазные центросомы и центросомы в полюсах митотического веретена); (2) изменения нормальной архитектуры митотических веретен; (3) изменения взаимного расположения и ориентации составляющих его компонентов. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ 18-29-09082) и программы развития Московского университета (MSU Development Program PNR 5.13).*

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ

М.И. Брылев, А.С. Харичкин, Л.Г. Бушина, А.Ш. Жаббарова, Е.В. Грехнева, Н.Л. Меркулова
Курский государственный университет, Курск, Россия

Использование полипептидных препаратов в последнее время становится все более актуальным. Одним из таких препаратов является тималин, который представляет собой смесь олигопептидов, выделенных из тимуса животных. Заявлено, что препарат обладает иммуномодулирующими свойствами, стимулирует процессы регенерации и кроветворения, улучшает течение процессов клеточного метаболизма, проявляет антиагрегационную и противоопухолевую активность. Широкий спектр биологической активности, по-видимому, может быть объяснен пептидным многообразием данного препарата. Целью исследования являлось выделение группы олигопептидов, способных ингибировать агрегацию тромбоцитов, и установление ее состава. Молекулярную массу пептидов определяли методом МАЛДИ-анализа в режиме положительных ионов на приборе «Ultraflex II Bruker» фирмы «Bruker Daltoniks» с использованием в качестве матрицы α-циано-4-гидроксикоричной кислоты. Было установлено, что препарат представляет собой смесь большого количества олигопептидов с массами в диапазоне 500–3500 Да, а также содержит ряд пептидов с массой около 8 кДа. Учитывая слишком большое количество индивидуальных пептидов (более 150), идентификация каждого из них была бы трудоемким и неэффективным процессом. Поэтому было решено провести фракционирование образца и определить антиагрегационную активность каждой фракции для выбора наиболее активной группы пептидов с целью установления их структуры. Препарат был проанализирован методом ВЭЖХ-МС (Ultimate 3000, Q Exactive) для определения условий оптимального разделения компонентов. Разделение пула пептидов было выполнено методом препаративной хроматографии в системе вода-ацетонитрил-0,1% муравьиная кислота. В качестве критерия отбора фракций использовали коэффициент удерживания. Агрегацию тромбоцитов исследовали на агрегометре «Биола» турбидиметрическим методом. Показано, что пептидная фракция с коэффициентом удерживания от 0,4 до 0,8 проявила наилучшие показатели по изучаемой активности. Выделение более узкой фракции с целью идентификации индивидуальных пептидов с антиагрегационными свойствами является предметом дальнейшего исследования.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ Fab-ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ К ФУЛЛЕРЕНУ С60

О.Д. Гендриксон[1], Е.М. Осипов[1], Т.В. Тихонова[1], А.В. Жердев[1], О.Н. Солопова[2], П.Г. Свешников[2], Б.Б. Дзантиев[1], В.О. Попов[1]
[1]Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [2]Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва, Россия

Проблема иммунного распознавания – один из ключевых вопросов современной биохимии, важный как для понимания биологических процессов, так и для создания новых лекарственных препаратов и конструирования вакцин. На сегодняшний день круг потенциальных мишеней иммунного распознавания существенно расширился, в том числе благодаря частицам со структурно вырожденной поверхностью. К антигенам, взаимодействие с которыми не укладывается в рамки стандартных закономерностей иммунной реакции, относятся фуллерены – наночастицы, состоящие исключительно из атомов углерода и обладающие уникальной геометрией и свойствами. В настоящее время структурные основы взаимодействия фуллеренов со специфическими антителами мало изучены. В настоящей работе исследование структуры сайта иммунного связывания фуллерена со специфическими антителами проведено на примере Fab-фрагментов моноклональных антител к фуллерену С60 (FabC60). Ранее мы показали, что равновесная константа диссоциации комплекса фуллерена С60 с полноразмерными антителами составляет 1,1×10-7 М. Аффинность FabC60, охарактеризованная в данной работе методом конкурентного иммуноферментного анализа, составляет 9×10-6 М. Структура Fab-фрагментов антител к фуллерену С60 (FabC60) решена методом рентгеноструктурного анализа при разрешении 1.9 Å. Виртуальный докинг С60 в антигенсвязывающем кармане FabC60 демонстрирует, что связывание С60 с FabC60 обеспечивается энтальпийными и энтропийными факторами: π-π-стэкинг-взаимодействиями с ароматическими остатками антигенсвязывающего кармана и снижением площади доступной растворителю гидрофобной поверхности С60. Фрагмент подвижной петли CDR H3, локализованный на поверхности FabC60, затрудняет доступ С60 в антигенсвязывающий центр, что может объяснять пониженную аффинность антител к С60. *Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН № 32 «Наноструктуры: физика, химия, основы технологий».*

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛЕНКИ С ПОЛИПЕПТИДНЫМ ДЕЙСТВУЮЩИМ ВЕЩЕСТВОМ

Т.Н. Кудрявцева[1], Е.В. Грехнева[1], Н.Л. Меркулова[1], Л.Г. Климова[2], И.Б. Кометиани[1], С.А. Ефанов[1]
[1]Курский государственный университет, [2]Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Удобство применения и простота использования лекарственных форм пролонгированного действия обеспечивает им все большую популярность. К таким средствам относятся офтальмологические пленки для лечения и профилактики целого ряда заболеваний глаза. В данной работе исследовалась возможность получения пленок с заданным набором свойств. В качестве действующего вещества использовали тималин – препарат, полученный из тимуса животных. Олигопептиды, входящие в его состав, ускоряют репаративную регенерацию при травмах роговицы и обладают иммуностимулирующим действием, что делает его привлекательным объектом для офтальмологической практики. Среди исследованных полимеров (карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, поливиновый спирт) наиболее оптимальные свойства проявила карбоксиметилцеллюлоза. Однако, высокая скорость растворения полимера не позволяла обеспечить необходимый фармокинетический профиль. Пролонгированность действия препарата была достигнута регулированием скорости высвобождения ДВ путем снижения растворимости КМЦ за счет введения сшивающего агента, в качестве которого использовалась соляная кислота. В серии образцов с различным содержанием сшивающего агента было показано, что скорость выхода ДВ обратно пропорциональна количеству соляной кислоты. Также было исследовано влияние пластификаторов (глицерина, ПЭГ-400, ПЭГ-6000, диэтаноламина, триэтаноламина, тетраэтаноламина) на качественные показатели пленки (гибкость, эластичность) и скорость выхода ДВ. Была изучена стабильность ДВ в кислой среде. Изменения пептидного состава смеси в реакционных условиях не происходило. Содержание действующего вещества в образцах оценивали методом ВЭЖХ-МС (Ultimate 3000, Q Exactive). В качестве репера был выбран пептид с молекулярной массой 1935 Да. Таким образом, проведенное исследование показало, что использование тималина в офтальмологических пленках в качестве основного компонента, или в смеси с другими ДВ, представляется перспективным.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 2-КАРБОКСИ- 2-(N-АЦЕТИЛАМИНО) -3-(3’,5’-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-4’-ГИДРОКСИФЕНИЛ) – ПРОПИОНАТА КАЛИЯ

И.В. Жигачева, А.А. Володькин
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

В условиях стресса образование АФК митохондриями увеличивается, что приводит к сдвигу антиоксидантно-прооксидантного баланса в сторону увеличения содержания АФК в клетке. Взаимодействие АФК с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав липидов мембран митохондрий, приводят к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ). При этом в 2,5–3 раза увеличивается интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах этих органелл. Пространственно-затрудненные фенолы, в частности 2-карбокси-2-(N-ацетиламино)-3-(3’,5’-ди-трет-бутил-4’-гидроксифенил)-пропионат калия (калий анфен), снижают интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий растительного и животного происхождения и это снижение имеет дозовую зависимость. При этом эффективными концентрациями были 10^{-5}–10^{-8}, 10^{-13}–10^{-14} М. В этом же концентрационном интервале препарат повышает активность I комплекса дыхательной цепи митохондрий, обеспечивая высокую функциональность активность этих органелл в условиях стресса. Предотвращая дисфункцию митохондрий калий анфен повышал устойчивость растительных и животных организмов к действию стрессовых факторов. Можно предположить, что биологические эффекты калий анфена обусловлены его антиоксидантными свойствами и способностью его высоко разбавленных (10^{-14}–10^{-6} М) водных растворов самопроизвольно образовывать молекулярные ансамбли, обозначаемые термином «наноассоциаты», которые состоят преимущественно из структур воды. Результаты квантово-химических расчетов ассоциатов 2-карбокси-2-(N-ацетиламино)-3-(3’,5’-ди-трет-бутил-4’-гидроксифенил)-пропаната калия (лиганда) с последующей визуализацией структур предполагают возможность существования кинетически независимых гидрат содержащих агломератов (структур) в водной среде. Взаимодействие ассоциатов с аминокислотами приводит к образованию устойчивой структуры с присущей ей геометрией. В зависимости от природы пептида взаимное расположение молекул калий анфена, молекул воды и молекул пептида меняется, что, вероятно, влияет на структуру активного центра ферментов. Этим, по-видимому, определяется дозовая зависимость проявления биологической активности препарата.

ПОРООБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИКЛИЧЕСКОГО ЛИПОПЕПТИДА ФЕНГИЦИНА В БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

А.А. Захарова, С.С. Ефимова, О.С. Остроумова
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Циклический липопептид фенгицин (ФЕ) представляет собой фитотоксин, продуцируемый *Bacillus subtilis*. Благодаря своим противогрибковым, противоопухолевым свойствам, а также низкой гемолитической активности, ФЕ имеет огромный потенциал применения в клинической фармакологии [Deleu et al., Biophys. J, 2008; Yin et al., Anticancer Drugs., 2013]. Структура ФЕ включает гидрофильную и липофильный части, что обусловливает взаимодействие липопептида с клеточной мембраной и последующее нарушение ее целостности. Хотя противогрибковые свойства ФЕ были хорошо охарактеризованы [Ongena et al., Trends Microbiol., 2007; Liu et al., Fungal Biol., 2014; Zhang and Sun, Appl. Environ. Microbiol., 2018], подробный механизм его действия до сих пор является предметом интенсивных исследований. Целью данного исследования являлось установление молекулярных механизмов взаимодействия ФЕ с липидными бислоями различного состава, сформированными по методу Монтала и Мюллера [Montal and Muller, Proc. Nat. Acad. Sci., 1972]. В ходе исследования мембранной активности ФЕ было показано, что добавка липопептида с одной стороны бислоя, состоящего из пальмитоолеилфосфохолина: пальмитоолеилфосфоэтаноламина:пальмитоолеилфосфоглицерола:эргостерина в соотношении 20:20:50:10 мол% и омываемого 2 М

раствором KCl (pH 9), до концентрации 0,1–0,5 мкМ приводит к образованию хорошо воспроизводимых одиночных преимущественно катион-селективных каналов различной проводимости в пикоамперном диапазоне. В популяции преобладают одиночные каналы, характеризующиеся в 1,5 раза большей проводимостью при положительных трансмембранных напряжениях, чем при отрицательных. Кроме того, анализ зависимости макроскопического тока от концентрации липопептида позволяет предположить, что, по меньшей мере, димеры ФЕ участвуют в образовании проводящих субъединиц. В то же время, способность ФЕ формировать ион-проводящие поры не зависит от геометрической формы мембранных липидов, однако, значительно коррелирует с наличием отрицательно заряженных липидов в бислое. Вероятно, отрицательно заряженные липиды могут выступать в роли шаперонов для молекул липопептида. *Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ № МД-2711.2019.4*

РОЛЬ ЛИПИДНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПОР ЦЕКРОПИНОМ А

А.А. Захарова, С.С. Ефимова, О.С. Остроумова
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Широко известной проблемой современной медицины является развитие устойчивости патогенных бактерий к антибиотикам. Существует несколько путей преодоления резистентности, среди которых особое место занимает поиск новых природных антибиотических средств. Одной из наиболее распространенных в эволюции матриц природных антимикробных пептидов являются цекропины, в частности, цекропин А (ЦА), обнаруженные при изучении иммунного ответа ряда насекомых. Первичной мишенью действия ЦА является мембрана клеток-мишеней: считается, что патогенная клетка погибает при образовании ЦА пор в мембране и последующем нарушении водно-солевого баланса [Christensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1988; Sato et al., Biochim. Biophys. Acta, 2006; Ostroumova et al., Langmuir, 2007]. Целью исследования являлся анализ участия мембранных липидов в процессе формирования ион-проницаемых пор ЦА. Используя электрофизиологический метод реконструирования ЦА каналов в плоские липидные бислои, сформированные по методу Монтала и Мюллера [Montal and Muller, Proc. Nat. Acad. Sci., 1972], проведено сравнение порообразующей активности пептида в присутствии мембранообразующих липидов различной фомы и заряда молекулы. Было показано, что добавка ЦА с одной стороны отрицательно-заряженного липидного бислоя из пальмитоолеилфосфохолина и кардиолипина (80:20 мол %), омываемого 0,1 М раствором KCl (pH 7,4), до концентрации 2–3 мкМ приводит к образованию хорошо воспроизводимых ионных каналов многоуровневой проводимости. При этом замена кардиолипина на пальмитоолеилфосфоглицерол приводит к потере способности ЦА образовывать каналы при той же концентрации пептида, а её увеличение до 6 мкМ вызывает дестабилизацию бислоя. Анализируя полученные результаты, было выдвинуто предположение о критической роли геометрической формы отрицательно заряженных мембранообразующих липидов в регуляции порообразующей способности ЦА. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 19-14-00110.*

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ВАРИАБЕЛЬНОМУ ДОМЕНУ 9 СЕМЕЙСТВА БЕТА ЦЕПИ ТКР КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АНКИЛОЗИРУЮЩЕГО СПОНДИЛИТА

И.А. Шагина[1], Е.М. Мерзляк[1], Д.Б. Староверов[1,2], А.К. Мисорин[3], М.А. Щевелева[3], С.А. Лукьянов[1], Д.М. Чудаков[1,2], О.Б. Британова[1]
[1]Институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва [2]Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва; [3]BioCad, Санкт-Петербург, Россия

По мере углубления понимания патогенеза заболевания, появляется возможность развивать подходы направленные на подавление причины болезни. Анализ репертуаров ТКР здоровых и доноров, страдающих анкилозирующим спондилитом (аутоиммунное заболевание, характеризующееся воспалением хрящевой ткани суставов и постепенному замещению хрящевых тканей костной) выявил группу редко-сборных Т клонотипов, значительно чаще детектируемых в крови больных доноров, чем здоровых. Также эти ТКР были найдены в синовиальной жидкости больных, что может указывать на их участие в патогенезе заболевания. Ассоциированные с заболеванием ТКР содержали в своем составе вариабельный домен бета цепи, который кодировался TRBV9 генным сегментом. Деплеция Т-клеток, содержащих аутореактивные ТКР, видится нам перспективным подходом в лечении анкилозирующего спондилита. Нами были получены моноклональные антитела (МА) к TRBV9, которые показали высокую специфичность, аффинность и цитотоксичность в системе *in vitro*. Целью данного исследования было использовать полученные МА для направленной деплеции TRBV9 содержащих Т-клеток в системе *in vivo*. МА тестировали на представителях приматов *Macaca mullata*. Степень аминокислотного совпадения TRBV9 человека и макаки составляет 96%. МА вводили внутривенно в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг веса, использовали химерное и гуманизированное антитела. Эффективность деплеции целевых Т-клеток оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии и ПЦР в реальном времени, в разных временных точках (от 3 дней до 6 месяцев после введения препарата). Все макаки, вошедшие в исследование, хорошо перенесли однократное введение препаратов. Методом проточной цитофлуориметрии наблюдали снижение количества целевых клеток уже на 3-и сутки после введения препарата, максимальное снижение наблюдалось к 10-ому дню и продолжалось вплоть до полугода. Методом РТ-ПЦР показано снижение уровня экспрессии TRBV9 в 10-20 раз, относительно контрольной группы макак, а также относительно внутреннего контроля – мРНК TRBV7. Таким образом, показано, что полученное МА не вызывает интоксикацию, и приводит к высокоэффективной деплеции целевых Т лимфоцитов. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения терапевтического действия данного МА при анкилозирующем спондилите.

ДИЗАЙН И МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ГУМАНИЗИРОВАННЫХ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ АНТИТЕЛ К ИНТЕРФЕРОНУ-БЕТА

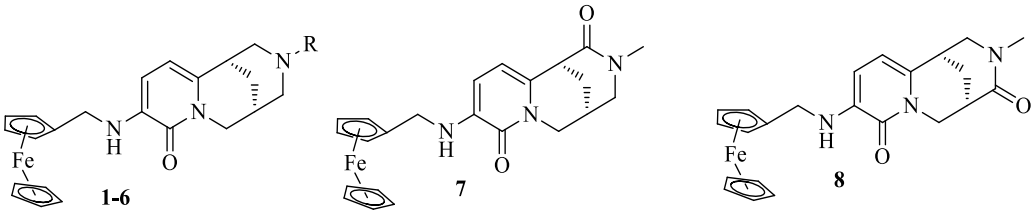
А.А. Панина[1], В.Н. Новоселецкий[2], В.С. Рыбченко[2], Т.К. Алиев[2], Д.А. Долгих[1], М.П. Кирпичников[1,2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

При гуманизации антител необходимо найти оптимальный способ замены аминокислотных остатков вариабельных доменов (VH и VL), не приводящий к изменению биохимических и биологических параметров. Мы проанализировали зародышевые гены VH и VL человеческих антител, наиболее гомологичные каркасным участкам VH и VL моноклональных мышиных антител к интерферону-бета человека. Были исследованы различия в значимых областях и предложены последовательности гуманизированных антител (HumAb), для которых были созданы модели пространственной структуры с помощью метода моделирования на основании гомологии. Реализация этого метода в веб-сервисе Rosetta Antibody (http://antibody.graylab.jhu.edu/antibody) включает следующие шаги: 1) поиск шаблонов среди антител с известной пространственной структурой и сходной аминокислотной последовательностью, 2) построение начальных моделей с использованием консервативных фрагментов шаблонов и VH/VL последовательности запроса, 3) улучшение начальных моделей путем подбора оптимальных конформаций основной цепи VH/VL и боковых цепей по всем моделям в целом. Полученные стартовые модели были дополнительно оптимизированы с учетом окружающего растворителя, для чего в программе Gromacs (http://www.gromacs.org/) с использованием силового поля charmm36 был проведен расчет молекулярной динамики (МД) моделей в водном растворе при температуре 300K и физиологической концентрации NaCl в течение 10 нс. Анализ МД показал, что модели принимают свои равновесные конформации уже через 1 нс. Полученные траектории МД были подвергнуты кластерному анализу, наиболее представительные конформации для каждой из стартовых моделей в дальнейшем рассматривались в качестве окончательных моделей, анализ которых позволил сформулировать ряд возвратных замен в каркасных участках VH и VL HumAb к интерферону-бета. Работа проводилась с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова. *Работа выполнялась при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 14.604.21.0189, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0189).*

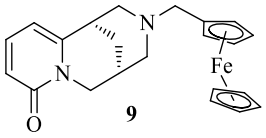
ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ КОНЪЮГАТОВ ПРОИЗВОДНЫХ АЛКАЛОИДА (-)-ЦИТИЗИНА С ФЕРРОЦЕНОМ

С.В. Садовников[1], А.В. Ковальская[2], И.А. Положенцева[2], И.П. Цыпышева[2].
[1]Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

В работе были изучены цитотоксическая активность конъюгатов производных алкалоида (-)-цитизина с ферроценом, в культуре клеток нейробластомы (SH-SY5Y), в ряду производных **1-9** исходя из различных заместителей у атома азота.



R = Me (**1**), (CS)NHPh (**2**), CH_2(CO)OMe (**3**), Bn (**4**), All (**5**), (CO)NHPh (**6**)



С помощью витального красителя PrestoBlue® была проведена оценка цитотоксической свойств соединений. В соответствии с полученными результатами, цитотоксическими свойствами в отношении клеток линии SH-SY5Y (нейробластома) обладают производные **2** (IC50=64,60±5,33 мкм, p=0.002), **4** (IC50=28,94±3,88 мкм, p=0.0001), **5** (IC50=22,31±3,05 мкм, p=0.0002), **6** (IC50=16,06±5,46 мкм, p=0.0002) для остальных производных IC50 превышал значение 100 мкм.

Таким образом, среди производных алкалоида (-)-цитизина с ферроценом, наиболее перспективными для дальнейшего изучения являются соединения **4,5,6** как наиболее токсичные для клеток. В тоже время не обходимо изучить влияние соединений на структуру клеточного цикла.

Работа выполнена в соответствии с планами госзадания ИБГ УфИЦ РАН № АААА-Ф16-116020350033-8 и УфИХ УфИЦ РАН № АААА-А17–117011910025–6, а также при поддержке гранта РФФИ № 17-43-020298_р-а.

ВЛИЯНИЕ ОЛИГОПЕПТИДА АКТГ(6-9)PGP НА ТРАНСКРИПТОМ КЛЕТОК ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО СТРЕССА У КРЫС

В.В. Ставчанский[1], И.Б. Филиппенков[1], Л.В. Дергунова[1], Н.Ю. Глазова [1], Н.Г. Левицкая[2], Е.А. Себенцова[1], Д.Д. Хухарева[2], С.А. Лимборская[1], Н.Ф. Мясоедов[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Одной из актуальных проблем современной молекулярной медицины является поиск лекарств, противостоящих негативному влиянию стресса на функции нервной ткани. Цель данной работы – исследование воздействия пептида АКТГ(6-9)PGP

на транскриптом клеток гиппокампа крыс в условиях острого стресса. Работа выполнена на крысах-самцах Вистар массой 220–250 г., которые были поделены на 3 группы. За 30 мин до стресс-воздействия крысам группы «стресс-АКТГ(6-9)PGP» внутрибрюшинно вводили АКТГ(6-9)PGP, животным групп «стресс-контроль» и «контроль» – воду. Животных группы «контроль» не подвергали стрессу. Стресс-воздействие включало иммобилизацию со световым и акустическим воздействием в течение 1 ч. Для оценки уровня тревожности грызунов использовали тесты «приподнятый крестообразный лабиринт» и «О-образный лабиринт» спустя 1,5 и 4 ч после стресс-воздействия соответственно. Полнотранскриптомный анализ изменений экспрессии генов проводили через 6ч от момента введения препаратов с помощью RNA-seq. Анализ изменения содержания мРНК всех белок-кодирующих генов (22030) показал, что стресс изменил экспрессию 932 генов, из которых 722 гена снизили, а 210 – увеличили экспрессию более чем в 1,5 раза (Padj<0,05). Введение АКТГ(6-9)PGP перед стресс-воздействием приводит к достоверному изменению уровня мРНК 268 генов, из которых 194 увеличили, а 74 снизили экспрессию относительно контроля. Биоинформатический анализ результатов при помощи программного обеспечения «DAVID v6.8» установил, что гены, изменившие экспрессию при воздействии АКТГ(6-9)PGP на животных со стрессом, относятся к сигнальным путям, связанным с функционированием рибосом (Fau, Rps16, Rpl10 и др.) и окислительного фосфолирования (Atp6v1h, Cox7c, Ndufc1 и др.). Полученные данные позволяют выявить молекулярно-генетические механизмы возможного действия пептида АКТГ(6-9)PGP на ткань гиппокампа крыс при стрессирующей нагрузке. *Исследование было выполнено при поддержке гранта РФФИ КОМФИ № 17-00-00104.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕПТИДА pHLIP ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА В ОПУХОЛЬ

О.Я. Брикунова[1,2], А.М. Демин[3], М.А. Абакумов[4], Т.Р. Низамов[4], А.Н. Ванеев[5], А.Г. Першина[1,2]
[1]Сибирский государственный медицинский университет, Томск; [2]Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск; [3]Институт органического синтеза им. П.Я. Постовского, Екатеринбург; [4]Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва; [5]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В настоящее время все большую актуальность приобретают разработки терраностических систем на основе неорганических наночастиц, обеспечивающих выявление опухоли и возможность реализации адресного терапевтического воздействия. Для успешного накопления подобных систем применяют различные векторные молекулы, которые способствуют удерживанию наночастиц в опухоли. Перспективной стратегией является создание систем, способных отвечать на специфические условия среды в опухоли, например, пониженное значение межклеточной pH. Данная стратегия может быть реализована за счет использования pH-зависимого выстраивающегося пептида (pHLIP), способного менять конформацию и встраиваться в мембрану клетки при pH ниже 7.0. Целью данной работы было исследовать эффективность направленной доставки в опухоль магнитных наночастиц оксида железа, конъюгированных с пептидом pHLIP. Магнитные наночастицы оксида железа со среднем диаметром ~11 нм покрытые силоксановой оболочкой, модифицированы полиэтиленгликолем и ковалентно конъюгированы с пептидом pHLIP (МНЧ-pHLIP). Функциональная активность МНЧ-pHLIP была подтверждена в исследованиях *in vitro*. Так в результате инкубации МНЧ-pHLIP с клетками линии 4T1 показано, более эффективное связывание наноконъюгата с клетками при снижении pH до 6,4, по сравнению с инкубацией при pH 7,4. По данным МТТ-теста МНЧ-pHLIP не проявлял цитотоксичности в отношении клеток линий 4T1 и MDA-MB-231. Эффективность накопления МНЧ-pHLIP в опухоли исследована на мышах Balb/c с подкожно привитой карциномой молочной железы мыши 4T1. Через 4 часа после внутривенного введения МНЧ-pHLIP на T2-взвешанных МРТ изображениях опухолей наблюдали подавление сигнала, которое сохранялось и усиливалось в течение 24 часов. Согласно исследованию образцов опухоли методом АЭС-ИСП установлено, что эффективность накопления наночастиц в опухоли составила 10% ID. Анализ pH-профиля опухолей показал, что концентрация железа в опухоли, коррелировала с измеренным значением внутриопухолевого pH (R2=0,99; p=0,01). Таким образом, пептид pHLIP может быть успешно использован для направленной доставки магнитных наночастиц оксида железа в опухоль и позволяет наночастицам удерживаться в опухоли не менее 24 часов. МНЧ-pHLIP является перспективной платформой для создания препаратов для тераностики опухолей.

МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОРЕАКТОРА ICELLIS NANO ДЛЯ АДГЕЗИВНЫХ КУЛЬТУР

М.А. Дженкова[1,2], С.Г. Васильева[1,2], А.В. Старикова[1,2], Н.А. Трушкин[1,2], А.А. Шмидт[1,2], Т.В. Егорова[1,2]
[1]Институт биологии гена РАН; [2]ООО «Марлин Биотех»; Москва, Россия

Генная терапия – один из методов лечения наследственных заболеваний, основанный на введении в соматические клетки пациента генетических конструкций. Активное развитие получила стратегия доставки целевого гена с помощью рекомбинантных аденоассоциированых вирусов (AAV). Для сборки AAV в лабораториях чаще всего используют линию HEK293T. Применяемые для масштабирования адаптированные к суспензии клетки HEK293T имеют ряд недостатков: показывают менее интенсивный рост при высокой плотности культуры и меньшую эффективность трансфекции. Цель данной работы – оценить возможность масштабирования продукции вирусного препарата в условиях адгезивного биореактора iCellis Nano (Pall Corporation). Была проведена наработка вирусных частиц методом транзиентной тройной трансфекции продуцентов HEK293T в условиях культивирования на чашках Петри (147,8 cm^2) и в биореакторе с площадью роста 1,6 m^2. Клетки инокулировали с посевной плотностью 10000 клеток/$см^2$. На 72 час после инокуляции проводили трансфекцию. На протяжении эксперимента производили поддержание основных параметров: T=37°C, pH=7,2, DO=50% и контролировали уровень глюкозы и лактата. Через 66 часов после трансфекции клетки лизировали в присутствии тритона X-100 0,5% v/v. Титр вируса определяли методом ПЦР в реальном времени с зондом к инвертированным повторам. Средняя продуктивная эффективность наработки вирусных частиц в биореакторе составила около 1,03E+11 ГК/$см^2$ (n=4), что примерно в 2 раза ниже эффективности продукции на чашке:

2,07E+11 ГК/см^2 (n=4). В результате 4 запусков биореактора адгезивного типа iCellis Nano с посевной площадью 1,6 м^2, был отработан процесс наработки частиц AAV. Несмотря на то что эффективность биореактора на единицу площади вдвое ниже по сравнению с результатом на контрольной чашке, процесс получения частиц AAV в биореакторе более технологичен и позволяет за один запуск произвести в среднем 1.7E+15 ГК вирусных частиц. Отработанная технология дает возможность дальнейшего увеличения посевной площади биореактора без дополнительной оптимизации протокола. *Работа была поддержана грантом Фонда содействия инновациям НТИс5/42610 "Аденоассоциированные вирусы, кодирующие укороченную форму утрофина, для терапии миодистрофии Дюшенна"*

ИНГИБИТОР 7-МЕТИЛГУАНИН: ПОДАВЛЕНИЕ РЕПАРАЦИИ ДНК, ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Д.К. Нилов[1], К.И. Кирсанов[2,3], Т.И. Фетисов[2], Т.А. Кургина[4], М.М. Кутузов[4], Н.В. Малюченко[1], Н.С. Герасимова[1], В.К. Швядас[1]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва; [3]Российский университет дружбы народов, Москва; [4]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Природное соединение 7-метилгуанин (7-МГ) ингибирует фермент репарации поли(АДФ-рибозо)полимеразу 1 (ПАРП-1) *in vitro* и может рассматриваться в качестве потенциального противоопухолевого агента для комбинированной терапии. Ранее мы продемонстрировали способность 7-МГ подавлять активность рекомбинантной ПАРП-1 человека с использованием радиоактивно меченого субстрата НАД+ и активированной ДНК, что стимулировало дальнейшие исследования его ингибиторных и потенциальных противоопухолевых свойств, результаты которых представлены в докладе. (1) Ингибиторный эффект 7-МГ в отношении очищенной ПАРП-1 был подтвержден с помощью нового флуоресцентного метода измерения ферментативной активности в реальном времени. Показано, что 7-МГ конкурирует с НАД+ за связывание с каталитическим доменом ПАРП-1. (2) Влияние 7-МГ на связывание ПАРП-1 с нуклеосомой было изучено с помощью spFRET-микроскопии. Показано, что ингибитор оказывает минимальный эффект на структуру нуклеосомы, однако вызывает образование непродуктивных комплексов нуклеосомы с ПАРП-1. (3) Цитотоксичность 7-МГ была оценена в отношении опухолевых клеток HCT116 (рак толстой кишки) и U2OS (остеосаркома) путем измерения популяции апоптотических клеток на проточном цитометре. Показано, что в ПАРП-ингибирующей концентрации 7-МГ не токсичен сам по себе, но способен усиливать апоптотическую гибель клеток в комбинации с ДНК-повреждающим препаратом цисплатином. (4) QSAR-моделирование ADMET-профиля ингибитора осуществили в программе ACD/Percepta. Его безопасность была также подтверждена in vivo в предварительных тестах на мышах. Хотя 7-МГ уступает по ингибиторной активности олапарибу и некоторым другим известным ингибиторам ПАРП, можно ожидать, что это природное соединение имеет более выгодный фармакокинетический и токсикологический профиль по сравнению с синтетическими ингибиторами и будет рассматриваться в качестве нового перспективного компонента противоопухолевой терапии. *Работа поддержана грантами РФФИ № 17-08-01614 и № 17-00-00163 (17-00-00132, 17-00-00097).*

ПЕПТИДНЫЕ БЛОКАТОРЫ МОЛЕКУЛ КОНТРОЛЯ ИММУНИТЕТА (ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ «ЧЕКПОИНТЫ») ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА

С.В. Подлесных[1], Д.Е. Мурашкин[1], Е.А. Колосова[1], Д.Н. Щербаков[1], В.В. Лампатов[2], А.И. Хлебников[2], С.А. Джонстон[3], А.И. Шаповал[1,3]

[1]Российско-американский противораковый центр, Алтайский государственный университет, Барнаул; [2]НИИ биомедицины, Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия; [3]Центр инноваций в медицине, Институт биодизайна, Университет штата Аризона, Темпи, Аризона, США

Молекулы контроля иммунитета, такие как CTLA-4 и PD-1 рецепторы, которые также называют иммунологическими точками контроля (англ. immune checkpoints) экспрессируются на Т-лимфоцитах и проводят ингибирующие сигналы, обеспечивающие снижение иммунного ответа. Одним из перспективных видов иммунотерапии онкологических заболеваний, является блокирование этих молекул с помощью моноклональных антител. В данной работе оценивалась возможность использования пептидов вместо моноклональных антител для блокады CTLA-4. С целью выявления пептидов, взаимодействующих с CTLA-4, мы использовали пептидные микрочипы. Данные микрочипы содержат 330 034 пептида, со случайными аминокислотными последовательностями. Для выявления пептидов использовали рекомбинантные химерные белки, содержащие Fc-фрагмент IgG1 человека (CTLA-4Fc, B7-1Fc и B7-2Fc). С помощью микрочипов были обнаружены 19 пептидов, которые специфически взаимодействуют с CTLA-4. Используя алгоритмы молекулярного докинга была определена парциальная энергия взаимодействия пептидов с петлей 99-MYPPPY-104 белка CTLA-4. С использованием методов 3D-моделирования было подтверждено, что выявленные пептиды преимущественно взаимодействуют с последовательностью MYPPPYY-петли молекулы CTLA-4. Для дальнейшей работы были выбраны и синтезированы 6 пептидов с максимальной расчетной аффинностью взаимодействия с CTLA-4. Используя метод иммуноферментного анализа (ИФА), мы подтвердили специфичность взаимодействия синтетических пептидов с CTLA-4. На основании полученных данных, мы предполагаем, что выявленные пептиды могут регулировать взаимодействие CTLA-4 рецептора с его лигандами B7-1/B7-2 и таким образом стимулировать активацию Т-лимфоцитов. Данные пептиды могут обеспечить альтернативный подход к манипуляции иммунным ответом для терапии онкологических заболеваний. *Работа выполнена при поддержке РФФИ № 17-04-00321, государственное задание Минобрнауки России № 6.3892.2017/4.6., «УМНИК» № 11931ГУ/2017.*

ВЛИЯНИЕ ТРИФЕНИЛФОСФОНИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЕПТИДНОГО МОТИВА YRFK НА ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ

Р.А. Ахмадишина, Л.Р. Сабирзянова, Й.Р. Абдрахимова, Р.И. Гарифуллин, Д.В. Салахиева, Т.И. Абдуллин
Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Благодаря разнообразию биологических свойств и низкой токсичности пептиды являются важными терапевтическими молекулами. Модификация малых пептидов фосфорорганическими группами является перспективным подходом к улучшению их фармакокинетических и фармакологических свойств [1–2]. Методом твердофазного синтеза получен ряд конъюгатов тетрапептидного мотива на основе катионных и ароматических аминокислот (YRFK) с трифенилфосфониевой (ТФФ) группой. Структуру олигопептидов характеризовали методами хромато-масс-спектрометрии и кругового дихроизма. Установлено, что среди полученных конъюгатов пептид TPP-KFRY-NH2, модифицированный по остатку лизина, имел пониженную гидрофильность и проявлял заметную цитотоксичность (IC_{50}≈0,3 мМ) по сравнению с ТФФ производными по остатку тирозина. Пептид TPP-YrFK-NH2 обладал способностью частично ингибировать образование супероксид анион-радикала (САР) в модельной реакции в растворе. По данным проточной цитометрии с TMRE большинство пептидов (0,25 мМ) умеренно понижали трансмембранный потенциал митохондрий при кратковременной экспозиции с клетками (на 6–18%); ТФФ группа оказывала модулирующий эффект. Дополнительно исследовано влияние олигопептидов в зависимости от структуры на уровень продукции митохондриального САР и морфологию митохондрий в клетках млекопитающих. Полученные результаты представляют интерес для создания модифицированных терапевтических олигопептидов, модулирующих активность митохондрий. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00766 и в рамках программы повышения конкурентоспособности КФУ.*

1. Akhmadishina R. et al., Front. Pharmacol. doi.org/10.3389/fphar.2018.00115.
2. Akhmadishina R. et al., Peptides. doi.org/10.1016/j.peptides.2017.10.002.

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИДЫ И ПЦР-АМПЛИФИКАТА НА ОРГАНИЗМЕННОМ УРОВНЕ

П.И. Селина, Д.Р. Сафина
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

В медико-биологических исследованиях важно учитывать безопасность применения используемых генетических инструментов. При создании ДНК-вакцин и геннотерапевтических препаратов перспективным направлением по разработке безопасных векторов является, в том числе, минимизация невирусных экспрессионных конструкций. В настоящее время функционирование минимизированной системы на основе ПЦР-амплификата недостаточно изучено, в том числе на организменном уровне. Нами была проанализирована эффективность функционирования двух наборов векторных конструкций, включающих векторы на основе ПЦР-амплификата и кольцевые плазмидные векторы. В первой группе в качестве репортерного гена использовали ген люциферазы светлячка *Photinus pyralis* для количественной оценки уровня его экспрессии, во второй – ген модифицированного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) для проведения биоимиджингового анализа. Экспрессионные конструкции содержали маркерный ген под контролем промотора цитомегаловируса человека. Сконструированные наборы векторов вводили в эмбрионы *Danio rerio*. Инъекцию образцов ДНК осуществляли в оплодотворенные яйцеклетки на стадии первого деления дробления в желточную область. Анализ временной динамики накопления маркерных белков показал наличие максимального уровня на 2–4 день после инъекции для всех использованных векторов. При этом флуоресценция, обусловленная экспрессией репортерного гена EGFP в составе сконструированных векторов, была обнаружена в различных типах клеток эмбрионов *Danio rerio*. Анализ зависимости накопления маркерных белков от молярного количества вводимой ДНК показал, что уровни экспрессии трансгенов для плазмиды и ПЦР-вектора достоверно не отличаются вне зависимости от используемой системы. Таким образом, показана высокая функциональная эффективность минимизированной экспрессионной генетической конструкции на основе ПЦР-амплификатана на организменном уровне. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-00-00189, №18-04-00319, Программ Президиума РАН «Биомедицинские технологии: инновационные разработки» и «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии».*

НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ N-ВИНИЛ-2-ПИРРОЛИДОНА СО СТАБИЛИЗИРОВАННЫМ ЯДРОМ, КОНЪЮГИРОВАННЫЕ С ЦИТОКИНОМ TRAIL DR5-B/V114C, ИНДУЦИРУЮТ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЫ

А.В. Яголович[1], А.А. Артыков[1], П.П. Куликов[2], А.Н. Кусков[2]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Ранее был получен амфифильный полимер на основе N-винил-2-пирролидона, модифицированный малеимидом на гидрофильном конце полимерной цепи для дальнейшей ковалентной конъюгации с противоопухолевым цитокином TRAIL DR5-B/V114C по связи цистеин-малеимид. Такой способ обеспечивает конъюгацию строго по N-концу белка, обеспечивая правильную ориентацию белковых молекул на поверхности наночастицы. Были получены полимерные наночастицы с соотношением полимера, модифицированного малеимидом и немодифицированного полимера 1:1, стабилизированные гидрофобным ядром на основе протионамида и конъюгированные с противоопухолевым цитокином TRAIL DR5-B/V114C с сорбционной емкостью около 30 мкг белка на 1 мг частиц. Средний размер частиц составил 550 нм. В данной работе была исследована биологическая активность полученных наночастиц на линии опухолевых клеток колоректальной карциномы HCT116. Конъюгированный препарат проявил значительную цитотоксическую активность, индуцируя до 40% клеточной гибели уже при концентрации белка 100 нг/мл, аналогично растворимому цитокину TRAIL DR5-B. При этом полимерные наночастицы, не

модифицированные белком, не проявили токсичности в концентрации 5 мг/мл. Таким образом, цитокин TRAIL DR5-B/V114C, конъюгированный с полимерными наночастицами, сохранил цитотоксическую активность, не уступающую активности растворимого цитокина TRAIL DR5-B/V114C. Можно полагать, что в дальнейших исследованиях *in vivo* на животных моделях конъюгированный препарат продемонстрирует улучшенные показатели фармакокинетики и специфической противоопухолевой активности за счет повышенной стабильности и более эффективной кластеризации рецептора смерти DR5 на поверхности опухолевых клеток. *Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00812.*

СИНЕРГИЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ДОЗ ВАЗОРЕЛАКСАНТОВ КАК СПОСОБ УКРЕПЛЕНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА

О.А. Казакова, А.Ю. Хапчаев, М.В. Сидорова, М.В. Самсонов, Н.В. Подкуйченко, А.В. Воротников, В.П. Ширинский
НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва, Россия

Острый отёк тканей развивается при акто-миозиновом сокращении эндотелиальных клеток и ослаблении контактов между ними. Ключевые активаторы миозина II немышечных клеток, киназа легких цепей миозина (MLCK) и Rho-ассоциированная протеинкиназа (ROCK), фосфорилируют регуляторные легкие цепи (РЛЦ) миозина по Ser19 и Ser19/Thr18. Терапевтическое применение ингибиторов MLCK/ROCK ограничено их гипотензивным действием на гладкие мышцы сосудов. Разработанный нами пептидный ингибитор MLCK PIK2 обладал противоотечным эффектом, не влиял на тонус сосудов, но имел узкое терапевтическое окно [Khapchaev et al, 2016]. Ингибитор PIK7 демонстрировал сходную активность *in vitro* и высокую переносимость животными [патент РФ 2682878]. Поскольку в эндотелиальных клетках MLCK и ROCK действуют скоординировано [Казакова ОА, неопубликованные данные], мы предположили, что совместное применение ингибиторов MLCK и ROCK позволит снизить их эффективные концентрации, потенциально снижая влияние на гладкие мышцы сосудов. Индуцированная тромбином проницаемость ФИТЦ-декстрана через монослой эндотелиальных клеток EA.hy926 значимо подавлялась при совместном воздействии PIK7 (10 мкМ) и ингибитора ROCK Y27632 (1 мкМ) и была сопоставима с таковой при воздействии «стандартных» концентраций PIK7 (100 мкМ) или Y27632 (10 мкМ). При комбинации 10 мкМ PIK7 и 1 мкМ Y27632 суммарная доля моно- и дифосфо-РЛЦ в клетках EA.hy926 через 15 мин после стимуляции снижалась с 46,5±6% до 26,3±6% ($p<0,05$). При этом доля монофосфо-РЛЦ миозина значимо снижалась по сравнению с таковой в отсутствие ингибиторов MLCK и ROCK (7,5±2% против 34,4±3,5%), а также в присутствии 10 мкМ PIK7 (20,2±2,6%) или 1 мкМ Y27632 (10,5±1,3%). Таким образом, совместное действие ингибиторов MLCK и ROCK позволяет добиться подавления активации миозина II и развития гиперпроницаемости эндотелиального монослоя в ответ на тромбин. При этом сочетанное действие ингибиторов позволяет на порядок снизить концентрации каждого из них без снижения кажущейся эффективности ингибирования. В целом наши результаты указывают на возможность создания оптимальных низкодозовых сочетаний активных соединений, которые могут оказаться избирательными к молекулярным мишеням в эндотелии как одной из первых мишеней для внутрисосудистых лекарственных препаратов.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРОВЕЗИКУЛ С КЛЕТКАМИ-МИШЕНЯМИ

С.В. Курбангалеева, С.К. Клетухина, О.А. Неустроева, А.А. Ризванов, М.О. Гомзикова
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

В регенеративной медицине наблюдается тенденция перехода от клеточной терапии к терапии на основе микровезикул (МВ). МВ представляют собой сферические структуры, окруженные мембраной, способные переносить в составе различные биологически активные молекулы, обеспечивая межклеточную коммуникацию. Предполагается, что мембранные рецепторы МВ могут участвовать в распознавании и специфическом связывании с поверхностными белками клеток-мишеней, что позволило бы использовать МВ в качестве векторной системы для адресной доставки лекарств. Для увеличения выхода МВ разрабатываются способы получения индуцированных МВ. МВ, индуцированные цитохалазином B (МВ-ЦВ), представляют собой перспективный вектор и инструмент бесклеточной терапии. МВ-ЦВ успешно используются в качестве вектора для доставки наночастиц, красителей и химиотерапевтических препаратов, однако до настоящего времени специфичность взаимодействия МВ-ЦВ с клетками-мишенями не изучалась. Нами были получены МВ-ЦВ из линии клеток PC3. Размер полученных МВ-ЦВ и эффективность взаимодействия МВ-ЦВ с клетками-реципиентами оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии и лазерной конфокальной микроскопии. Было обнаружено, что 95% МВ-ЦВ, полученных из клеток PC3, имеют размер от менее 220 нм до 1340 нм. Также было установлено, что эффективность слияния МВ-ЦВ PC3 с клеточными линиями PC3, SH-SY5Y и HCT116 не имела статистически значимых различий (процент клеток, содержащих мембранный компонент МВ-ЦВ, составлял: 56,81±0,41%, 59,46±3,8%, 58,95±3,9% соответственно). Обработка протеиназой K значительно снизила эффективность слияния МВ-ЦВ с клетками-реципиентами PC3 на 33,8±6,3%, SH-SY5Y на 54,8±4,97%, с HCT116 на 51,4±1,76%, с HeLa на 85,6±4,2% по сравнению с положительным контролем (клетки с МВ-ЦВ при 37°C в полной среде). Таким образом, мы обнаружили, что нет статически значимых различий в слиянии МВ-ЦВ с клетками-мишенями, из которых они были получены (взаимодействие гомофильных мембранных белков). Нарушение поверхностных рецепторов оказало наибольшее влияние на проникновение МВ-ЦВ, полученных из клеточной линии PC3, в клетки-мишени. Это позволяет предположить, что гетерофильное взаимодействие белков является более значительным в процессе распознавания и слияния внеклеточных везикул с клетками-мишенями.

ЛИПИДНЫЙ СПЕКТР ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLITICA* ПРИ ПЕРЕКРЕСТНОЙ АДАПТАЦИИ К pH- И ТЕПЛОВОМУ СТРЕССУ

Д.И. Дергачева, В.Ю. Секова, Е.П. Исакова, В.М. Терешина, Ю.И. Дерябина
Институт биохимии им. А.Н. Баха, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Механизмы адаптации к изменению температурных и осмотических параметров среды культивирования, помимо адаптивного синтеза ряда стрессорных белков, включают в себя такие процессы, как изменение состава липидов мембран и накопление в цитозоле различных осмолитов и протекторных агентов. Наиболее значимым динамическим изменениям в ответ на стрессовые условия подвергается липидный профиль грибной клетки, что дает основания рассматривать этот параметр как важный элемент адаптивного антистрессового ответа. В этой связи, цель представленной работы – выявление изменений липидного спектра полиэкстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolitica* в процессе адаптации клеток к повышенной температуре и экстремальным pH. В работе использовали штамм экстремофильного вида дрожжей *Y. lipolytica* W 29. Дрожжи культивировали на среде YNB с глицерином (0.6–1%) в качестве источника углерода, при pH 4.0, 5.5 и 9.0, применяя оптимальный тепловой режим (+28°-30°C) и тепловое воздействие (+37°-39°C). Экстракцию липидов из биомассы гриба, анализ липидных и жирнокислотных фракций проводили согласно [Bondarenko et al., 2017, Extremophiles, 21(4):743-754]. Результаты исследований показали, что липидный состав клеток, выращенных при оптимальной температуре, не претерпевал значительных качественных изменений в зависимости от pH. При pH 9.0 отмечалось небольшое снижение содержания запасных и мембранных липидов, а также повышение доли фосфатидных кислот в липидах мембран. Изменения внешнего pH при повышенной температуре (+37-39°C) приводят к остановке роста при pH 4 и снижению показателей роста при pH 9. Адаптация к повышенной температуре культивирования в щелочных условиях вносила существенные изменения в состав нейтральных и мембранных липидов. Наблюдалось снижение содержания запасных и мембранных липидов, изменение их качественного состава и степени ненасыщенности жирных кислот. Общей закономерностью являлось появление фракции диацилглицеринов на фоне снижения доли свободных жирных кислот в составе запасных липидов и значительное возрастание доли фосфатидилхолина в липидах мембран на фоне снижения стеринов. Таким образом, в работе установлено доминирование ответа на тепловое воздействие при перекрестном воздействии pH- и температурного стрессов.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА РАЗЛИЧНЫЕ КОМПАРТМЕНТЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ ЛОКАЛЬНОГО ИЗМЕРЕНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ С ПРИМЕНЕНИЕМ СКАНИРУЮЩЕЙ ИОН-ПРОВОДЯЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

В.С. Колмогоров[1,2,3], А.В. Алова[1,2], А.С. Юдина[1], А.С. Гаранина[3], А.С. Ерофеев[1,2,3], П.В. Горелкин[2,4,8], Н.Л. Клячко[1], И.И. Киреев[1], А.Г. Мажуга[1,3,7], К. Эдвардс[5,8], Ю.Е. Корчев[3,5,6], П. Новак[3,5,8].
[1]МГУ им. Ломоносова; [2]ООО «Нанопрофайлинг», Инновационный центр Сколково; [3]Национальный исследовательский университет «МИСИС»; [4]ООО «Медицинские нанотехнологии», Москва, Россия; [5]Imperial College London, London, United Kingdom; [6]WPI Nano Life Science Institute (WPI-NanoLSI), Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Japan; [7]Российский химико-технологический университет им. ДИ Менделеева, Москва, Россия; [8]ICAPPIC Limited, London, United Kingdom

Сканирующая ион-проводящая микроскопия (SICM) – это новый метод сканирующей зондовой микроскопии с наноразмерным боковым и вертикальным разрешением [Korchev et al., 2009], который позволяет обеспечить неинвазивное исследование in vitro отдельной клетки в условиях приближенных к физиологическим. За счет небольшого давления, возникающего за счет межмолекулярных сил отталкивания между клеточной мембраной и острием нанопипетки, можно обеспечить бесконтактное измерение жесткости с помощью SICM [Clarke et al., 2016]. Жесткость может быть измерена локально в разных частях ячейки, из-за малого размера наконечника нанопипетки, в отличие от АСМ, где используются большие сферические зонды.

В работе измерена жесткость клеток PC3 рака предстательной железы человека, подвергнутую воздействию паклитаксела для стабилизации микротубулина и цитохалазина-д для деполимеризации актина. В контрольных и обработанных клетках PC3 мы измерили жесткость над ядром и в области цитоплазмы, которые показывают два разных значения в контрольных клетках (1,3 кПа и 0,8 кПа соответственно). Измеренная жесткость после обработки паклитакселом показывает значительно повышенное значение в области над ядром и в области цитоплазмы (~ 4 кПа и ~ 1,8 кПа), тогда как обработка цитохалазином-д снижала жесткость клеток только в области цитоплазмы цитоплазмы (~ 0,5 кПа).

Эксперименты с GFP-прогерином были проведены в гетерогенной популяции HT1080 с контрольными и GFP-прогериновыми клетками. Контрольное измерение жесткости показывает ~ 1,7 кПа и ~ 0,7 кПа, когда клетки, обработанные GFP-прогерином, увеличивали значение только в области над ядром (~ 2 кПа).

Как мы видим, измерение жесткости на основе SICM показывает различные эффекты паклитаксела, цитохалазина-D, прогерина на компартменты раковых клеток, включая актин, микротубулин и мембрану ядра, соответственно.

Работа поддержана Российским научным фондом (SICM поддержана проектом № 19-79- 30062 и биологические эксперименты поддержаны проектом №. 17-15-01290)

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЛИПИДНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ, ЭКЗОСОМЫ, И МАГНИТНЫЕ НАНОСТЕРЖНИ: РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО ПОДХОДА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Е.О. Куценок[1], И.М. Ле-Дейген[1], А.Д. Усвалиев[1], А.О. Жигачев[2], Д.Ю. Головин[2], M.J. Haney[3], E.V. Batrakova[3], A.V. Kabanov[1,3], Ю.И. Головин[1,2], Н.Л. Клячко[1,2,3]

[1]Кафедра химической энзимологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия; [3]University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA

На сегодняшний день известно огромное количество различных лекарственных веществ. Однако часто они обладают рядом недостатков, среди которых, низкая растворимость, короткое время циркуляции в крови, быстрый вывод из организма. Именно поэтому системы доставки лекарственных препаратов представляют большой интерес для ученых. Среди них, одной из наиболее перспективных нам представляются экзосомы. Эти внеклеточные везикулы встречаются в большинстве биологических жидкостей и обеспечивают межклеточную коммуникацию. Благодаря особенностям генезиса, поверхность экзосом представляет собой своеобразную копию поверхности материнской клетки. Это важное свойство можно использовать для направленной доставки лекарственных препаратов.

Однако до сих пор стоит вопрос о контролируемом высвобождении содержимого из подобных везикул. Одним из решений данной проблемы могут стать комплексы экзосом с магнитными наностержнями. Помещенные в переменное низкочастотное магнитное поле (МП) наночастицы могут колебаться, тем самым разрыхляя экзосомальную мембрану и способствуя ускоренному высвобождению лекарства. Для слежения за изменениями текучести мембраны нами было предложено использовать два основных метода – ИК-спектроскопию Фурье и флуоресцентную спектроскопию. Таким образом, целью данной работы стала разработка комплексного подхода к изучению влияния магнитного поля на комплексы экзосом с магнитными наностержнями.

В виду сложности состава экзосом ИК-спектр везикул характеризуется многочисленностью полос поглощения. Для анализа состояния мембраны целесообразно использовать два пика, соответствующие симметричным и асимметричным колебаниям CH_2-групп липидов (2853±5 см$^{-1}$ и 2926±5см$^{-1}$). Нами было показано, что после пяти минут экспозиции комплексов экзосом с магнитными наностержнями в магнитном поле структура указанных полос изменяется. В частности, в структуре полосы поглощения, соответствующей асимметричным колебаниям CH_2-групп (2921 см$^{-1}$ до экспозиции в МП), наблюдается образование плеча на 2924 см$^{-1}$, что свидетельствует о повышении подвижности ацильных хвостов и разрыхлении экзосомальной мембраны.

Наблюдаемый эффект повышения текучести экзосомальной мембраны после экспозиции комплексов в МП поле был подтвержден флуоресцентной спектроскопией. Для этого предварительно в экзосомальную мембрану вводили метку-репортер. В данной работе нами была использована липидная метка B9PPC на основе BODIPY. Аналитическим сигналом является поляризация флуоресценции, снижение которой свидетельствует о разрыхлении мембраны. Для более детального изучения влияния магнитного поля на состояние мембраны экзосом варьировали время экспозиции в МП, а также параметры МП – величину магнитной индукции и частоту. Установлено, что для каждого набора параметров магнитного поля существует свое время наибольшего разрыхления мембраны. Это время наступает тем раньше, чем больше магнитная индукция и меньше частота МП. *Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 17-54-33027 и 18-29-09154.*

ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИКНОВЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ВО ВНУТРЕННИЕ СТРУКТУРЫ ГЛАЗА

А.Н. Ванеев[1,2], О.А. Кост[1], Н.Б. Чеснокова[4], О.В. Безнос[4], П.В. Горелкин[5], А.С. Ерофеев[2], Н.Л. Еремеев[2], А.В. Кабанов[1,3], Н.Л. Клячко [1,3]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]ООО «НаноПрофайлинг», Инновационный центр «Сколково», Москва, Россия; [3]University of North Carolina at Chapell Hill, USA; [4]НИИ офтальмологии им. Гельмгольца, Москва; [5]ООО «Медицинские нанотехнологии», Инновационный центр «Сколково», Москва, Россия

В настоящее время ведется активный поиск новых средств для лечения заболеваний глаз, связанных с воспалительными процессами. Одним из таких заболеваний является увеит. В патогенезе увеита важную роль играет окислительный стресс, результатом которого может быть появление большого количества активных форм кислорода, и поэтому введение антиоксидантов может оказаться эффективным. Антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза, обладают на порядки большей эффективностью по сравнению с низкомолекулярными антиоксидантами. Однако местное введение нативных ферментов (в виде глазных капель) оказывается неэффективным в связи с их быстрым выведением. Поэтому важно создать систему, которая будет обладать большим временем удерживания в области глазных тканей и выполнять свои функции в течение длительного времени. На первом этапе работы были получены наночастицы СОД на основе блок-иономерных комплексов с полиионами. Для этого к раствору СОД добавляли раствор протамина (поликатион), а затем раствор полианиона ПЭГ-ПГ (сополимер метокси-поли(этиленгликоль)$_{113}$-блок-поли (L-глутаминовой кислоты натриевая соль)$_{50}$). Затем добавляли глутаровый альдегид (0,5% водный раствор) для сшивки аминогрупп СОД и полимеров. Побочные продукты и непрореагировавшие реагенты удаляли центрифугированием с использованием мембранной фильтрующей системы. После чего модифицировали наночастицы СОД хитозаном, добавляли раствор хитозана. На втором этапе работы инстиллировали наночастицы СОД и наночастиц СОД, модифицированные хитозаном, в глаза кроликов, отбирали слезную жидкость и внутриглазную жидкость с течением времени. В слезной жидкости возрастание активности СОД наблюдается через 5 минут после инстилляции, далее происходит понижение активности с выходом на первоначальный уровень спустя час. Однако наночастицы СОД с хитозаном удерживаются гораздо лучше на поверхности глаз, чем не модифицированные наночастицы СОД и сам нативный фермент. Также было отмечено возрастание активности СОД во внутриглазной жидкости, что свидетельствует о проникновении наночастиц в переднюю камеру глаза. Таким образом, было продемонстрировано, что наночастицы СОД и наночастицы СОД, покрытые хитозаном, во-первых, лучше удерживаются на поверхности слизистой оболочки глаза по сравнению с раствором нативного фермента, во-вторых, способны проникать во внутренние структуры глаза. *Работа выполнена при финансовой поддержке GK 14.N08.11.0079 (МОН).*

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ АГОНИСТОВ АРИЛГИДРОКАРБОНОВОГО РЕЦЕПТОРА НА ТОКСИЧНОСТЬ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

В.Н. Бабаков, Н.Ю. Роговская, И.Д. Курдюков, П.П. Бельтюков, С.А. Дулов, А.С. Радилов
НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Санкт-Петербург

Оценивали влияние нетоксичных высокоаффинных эндогенных агонистов арилгидрокарбонового рецептора (непептидного димера триптофана FICZ и производное индола ITE), а также липополисахарида при токсическом действии бенз(а)пирена (далее БП) в клетках гепатомы человека линии HepaRG. IC50 БП для клеточной линии HepaRG определен в 7,4 мкМ, смесь 1 нМ FICZ и такой же серии разведений БП увеличивает IC50 до 15 мкМ. БП в концентрации 10 мкМ на начальном этапе замедляет рост культуры и затем приводит к гибели клеток через 48 ч после введения по некротическому пути. Липополисахарид с БП усиливает гибель клеток, агонисты AhR в концентрации 1 нМ FICZ и 10 нМ ITE демонстрируют цитопротекторное влияние на токсическое действие БП и способствуют выживанию клеток. FICZ усиливает долговременную активацию (фосфорилирование Ser177/Ser181) IKK a/b комплекса – регулятора сигнального пути транскрипционного фактора NF-κB, вызванную бенз(а)пиреном, но приводит к снижению индуцированной БП секреции IL-6 и IL-12 в кондиционную среду. В качестве маркеров генотоксического действия бенз(а)пирена определяли активные формы белков ключевых стресс-активируемых киназных каскадов и системы репарации ДНК. Липополисахарид с усилением токсичности БП в смеси также снижает активацию белков системы репарации ДНК ниже контрольного уровня. Агонисты арилгидрокарбонового рецептора (FICZ и ITE) проявляют цитопротекторное действие на фоне токсичности бенз(а)пирена, усиливают активацию фосфорилированием киназы Akt1 (Ser473) и снижают уровень фосфорилирования белка p53 (Ser15 и Ser46) и чекпойнт-киназ Chk1 (Ser 345) и Chk2 (Ser 345) на фоне активации системы репарации ДНК, вызванной БП. Таким образом, FICZ и ITE снижают генотоксичность бенз(а)пирена. По предлагаемому механизму высокоаффинные агонисты AhR конкурируют за рецептор с БП и снижают вероятность попадания его в ядро, а то время как активаторы NF-κB усиливают транспорт бенз(а)пирена в ядро. Снижение генотоксичности БП в присутствии агонистов AhR приводит к меньшей гибели клеток на фоне токсического действия БП. Цитопротекторное действие агонистов AhR отмечено и для других токсичных представителей класса полициклических ароматических углеводородов.

БИОИНЖЕНЕРИЯ. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И ПРИЛОЖЕНИЯ

Устные доклады

РЕНЕССАНС В МОРСКОЙ БИОХИМИИ: ОТ ГЕНОМОВ К ФЕРМЕНТАМ И БИОХИМИЧЕСКИМ ПУТЯМ

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

Морские организмы являются богатым источником разнообразных биополимеров, обеспечивающих структурную и физиологическую основу их существования в экстремальных условиях. Нередко такие биополимеры отличаются своими свойствами от аналогичных соединений наземного происхождения, что может быть использовано для разработки новых биотехнологических процессов, получения диагностических и терапевтических препаратов, функциональных продуктов питания. В ТИБОХ ДВО РАН уделяется большое внимание исследованиям полисахарид-модифицирующих ферментов и ферментов нуклеинового обмена из морских объектов. Сотрудниками Института были выделены и изучены ряд гликозилгидролаз, нуклеаз и фосфатаз с необычными специфичностями и механизмами действия. Морская биохимии сейчас переживает заметный ренессанс в связи с достижениями в области структурной и функциональной геномики. Новые технологии исследования геномов позволяют осуществлять как широкомасштабный, так и направленный поиск генов и генных кластеров для кодирования уникальных ферментов и путей биосинтеза ценных метаболитов. В настоящее время нами получены и проанализированы ряд геномов морских бактерий. Например, геномный анализ флавобактерий из рода Zobellia показал, что они обладают значительным литическим потенциалом для деградации различных олиго- и полисахаридов, поскольку их геномы кодируют мультигенные семейства гликозилгидролиз, полисахаридлиаз и оксидоредуктаз. Так, геном *Zobellia laminariae* KMM 3676T кодирует 108 гликозилгидролаз, 19 полисахаридлиаз и 63 сульфатазы. Такие ферменты могут быть использованы для модификации коммерчески важных субстратов, включая широко применяемые в медицине и пищевой промышленности полисахариды водорослей. Анализ геномов морских протеобактерий из КММ Института выявил уникальные генные кластеры, ответственные за синтез вторичных метаболитов, в том числе антимикробных пептидов, сахаров, жирных кислот и терпенов. Однако большинство кластеров было определено как гипотетические. Таким образом, применение геномных, транскриптомных и метаболомных подходов позволит найти новые биологические источники уникальных ферментов, а также получить ключевые ферменты, участвующие в биосинтезе морских биологически активных веществ. *Исследование поддержано грантом ДВО РАН № 18-4-009.*

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ЦЕЛЛЮЛАЗ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТИ В ИОННЫХ ЖИДКОСТЯХ

А.С. Доценко[1], А.М. Рожкова[1], А.П. Синицын[1,2]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

Возобновляемые непищевые источники лигноцеллюлозного сырья являются перспективным ресурсом для получения коммерчески востребованных продуктов. Биоконверсия лигноцеллюлозного сырья позволяет получать технические сахара, органические спирты и кислоты, алканы, алкены, фураны, диолы и другие органические соединения, которые далее могут использоваться в химической промышленности, производстве биотоплива и биополимеров. Биоконверсия лигноцеллюлозного сырья включает стадии предобработки, ферментативного гидролиза полисахаридов до технических сахаров, трансформации сахаров в различные органические соединения и последующего производства полимеров и топлива. Одними из способов увеличения эффективности биоконверсии являются использование ионных жидкостей для предобработки сырья и увеличение температуры проведения ферментативного гидролиза. Увеличение стабильности используемых ферментов в условиях проведения гидролиза, т.е. в присутствии ионных жидкостей и при повышенных температурах, позволит обеспечить увеличение эффективности биоконверсии. Комплекс целлюлаз, продуцируемый мицелиальным грибом *Penicillium verruculosum*, обладает высокой гидролитической способностью и используется в промышленных процессах гидролиза лигноцеллюлозного сырья. Основными ферментами комплекса являются целлобиогидролаза I и эндоглюканаза II, поэтому целью данной работы было осуществление рационального дизайна этих ферментов для увеличения термостабильности и стабильности в ионных жидкостях. Рациональный дизайн для увеличения термостабильности и стабильности в ионных жидкостях был основан на двух подходах: 1) анализ подвижности аминокислотных остатков в структуре ферментов и осуществление сайт-направленного мутагенеза с целью увеличения жесткости белковой глобулы, 2) анализ пространственной структуры ферментов, поиск поверхностных карманов и внутриглобулярных полостей и осуществление сайт-направленного мутагенеза с целью модификации структуры белковой глобулы. Применение данных подходов позволило увеличить термостабильность в 2,4-4 раза при температуре 60-80°C и стабильность в ионных жидкостях в 1,2-2 раза для целлобиогидролазы I и эндоглюканазы II P. verruculosum. *Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки РФ (Идентификационный номер проекта: RFMEFI61617X0081).*

НОВЫЕ УСТОЙЧИВЫЕ К РЕТРОИНГИБИРОВАНИЮ МЕВАЛОНАТКИНАЗЫ УЛУЧШАЮТ ПРОДУКЦИЮ ИЗОПРЕНА КЛЕТКАМИ *PANTOEA ANANATIS*

Е.Д. Казиева[1], Е. Ямамото[2], Е. Таджима[2], К. Йокояма[2], Ю.И. Каташкина[1], Е. Нишио[2], С.В. Машко[1]
[1]ЗАО НИИ Аджиномото-Генетика, Москва, Россия; [2]Институт инноваций, Ajinomoto Co., Inc., Кавасаки-ку, Кавасаки, Япония

Изопреноиды (терпеноиды) — широкий класс (более 50 тысяч) натуральных веществ, многие из которых обладают различными биологическими активностями и представляют коммерческий интерес. Все изопреноиды синтезируются из общих пятиуглеродных предшественников — изопентенилпирофосфата (IPP) и диметилаллилпирофосфата (DMAPP). Ретроингибирование мевалонаткиназ является важным механизмом регуляции биосинтеза предшественников изопреноидов в широком круге организмов и серьёзным препятствием для создания эффективных микробных штаммов-продуцентов этих веществ. Первая мевалонаткиназа, не подверженная ретроингибированию, была обнаружена ранее в метаногенной архее *Methanosarcina mazei*. В данной работе новые гены мевалонаткиназ из метаногенов *Methanosaeta concilii* и *Methanocella paludicola* и неродственной *археи Nitrosopumilus maritimus* были клонированы и экспрессированы в *Escherichia coli*, соответствующие ферменты были очищены и охарактеризованы. Подобно ферменту из *M. mazei*, все новые мевалонаткиназы оказались полностью устойчивыми к ретроингибированию. Были обнаружены необычные свойства (тетрамерная структура и способность активироваться DMAPP) мевалонаткиназы из *M. concilii*. Сравнение устойчивых и чувствительных к ретроингибированию мевалонаткиназ позволяет предположить, какой мотив может определять спектр ингибиторов данного фермента. Анализ генетического окружения показал, что именно гены устойчивых к ингибированию мевалонаткиназ входят в состав оперонов, включающих и другие гены биосинтеза изопреноидов. Вероятно, в отсутствие ингибирования мевалонаткиназы, регуляция мевалонатного пути осуществляется на уровне транскрипции. Было показано, что мевалонаткиназы *из M. concilii* и *M. paludicola* существенно превосходят ранее охарактеризованную мевалонаткиназу из *M. mazei* по сродству к мевалонату и каталитической эффективности. Сравнение штаммов-продуцентов изопрена, несущих разные гены мевалонаткиназ показало увеличение продукции при использовании новых эффективных ферментов. Для дальнейшего увеличения продукции был разработан метод сбалансированной амплификации генов целевого биосинтетического пути и подтверждена его эффективность на примере штамма-продуцента изопрена.

УНИКАЛЬНАЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СИНТЕЗА АКРИЛОВЫХ МОНОМЕРОВ

К.В. Лавров, Т.Е. Леонова, Т.А. Губанова, Т.И. Калинина, А.О. Шемякина, Е.Г. Гречишникова, А.Д. Новиков, Л.Е. Рябченко, Т.Е. Шустикова, Д.Д. Дербиков, М.Е. Шереметьева, Т.В. Герасимова, И.П. Токмакова, А.С. Яненко
НИЦ Курчатовский институт – ГосНИИгенетика, Москва, Россия

Акриловые мономеры (акриламид, акриловая кислота, и их производные) являются основой для синтеза водорастворимых и водонабухающих полимеров, применяемых в очистке сточных вод, нефтегазодобывающей, горной, текстильной, и бумажной промышленностях. Развитие производства полимеров на базе мономеров собственного производства сдерживается, в том числе, неразвитостью отечественных патентно-независимых, опережающих технологий. ГосНИИгенетика является лидером по разработке и внедрению биотехнологий производства мономеров. Ведутся передовые разработки для биокаталитического получения функционализированных мономеров, в т.ч. N-замещённых акриламидов, модифицирующих физико-химические свойства полимеров. Расширение спектра внедрённых и перспективных разработок создаёт основу для принципиального изменения организации производства мономеров. Основой для разработок являются рекомбинантные штаммы бактерий Rhodococcus – сверхпродуцентов необходимых для синтезов ферментов. Изучение разнообразия, физиологии и генетики родококков, чтение и анализ геномов, конструирование инструментов для редактирования геномов, создание экспрессионного инструментария позволяют эффективно решать практические задачи. Для расширения спектра получаемых мономеров используется транскриптомика, скрининг природных ферментов с последующей экспрессией в родококках, а также моделирование и изменение трёхмерных структур изучаемых ферментов. В ГосНИИгенетика накоплены фундаментальные знания о генетике и физиологии родококков, разработан генно-инженерный инструментарий (интегративные фаги, плазмидные вектора, промоторы, методы редактировании генома). Активно изучается применение родококков для биокатализа: сконструированы штаммы для биокаталитического получения спектра акриловых мономеров, внедрены процессы получения акриламида и акриловой кислоты, разрабатываются процессы получения N-замещённых акриламидов и метакриламида. Накопленный опыт демонстрирует практическую ценность и реальную применимость бактерий Rhodococcus в качестве полноценной платформы для биотехнологического получения акриловых мономеров.

ИНТЕГРИРОВАННЫЙ ПОДХОД К МОДЕЛИРОВАНИЮ И МАСШТАБИРОВАНИЮ МЕМБРАННЫХ БИОРЕАКТОРОВ

Е.В. Гусева, Н.В. Меньшутина
Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Приведен интегрированный подход к моделированию и масштабированию мембранных биореакторов, базирующийся на анализе отдельных составляющих биотехнологического процесса. В качестве современного инструмента для расчета и масштабирования биореакторов рассмотрено применение вычислительной гидродинамики, в частности пакета FLUENT на примере процессов получения молочной и глутаминовой кислот, а также культивирования клеток яичников китайского хомячка CHO в одноразовом мембранном половолоконном биореакторе. Функционирование биореактора как биотехнологической системы сопряжено с высокой сложностью в связи с многообразием различных процессов, протекающих при работе с различными биологическими объектами, например, микроорганизмами или клетками млекопитающих. При моделировании мембранных биореакторов рассматривают несколько уровней. Во-первых, необходимо уделить внимание биохимическим процес-

сам, протекающим внутри клетки, учитывать образование метаболитов и потребность в питательных веществах. От конструктивных особенностей биореактора и мембранного модуля зависит гидродинамическая обстановка в системе. Кроме того, учитывают тепломассобменные процессы непосредственно в реакторе. Многообразие факторов может оказывать негативное (стрессовое) воздействие на клетки микроорганизмы и привести к ряду сложностей, возникающих при работе и переходе к реакторам большего размера. В настоящее время для расчета и масштабирования биореакторов широко используются современные средства вычислительной гидродинамики, позволяющие глубже разобраться в составляющих процессов внутри реактора, сократить количество экспериментальных работ путем проведения большого количества вычислительных экспериментов, что в свою очередь приводит к сокращению временных затрат на запуск процесса. В работе рассмотрены процессы получения молочной и глутаминовой кислот, а также культивирование клеток яичников китайского хомячка CHO в одноразовом мембранном половолоконном биореакторе, включающем 20 и 60 волокон с использованием одного из пакетов вычислительной гидродинамики FLUENT ANSYS.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМОВ P450 ПОДСЕМЕЙСТВ CYP74B И CYP74C И ИХ МУТАНТНЫХ ФОРМ

Е.К. Аскарова, С.С. Горина, Е.О. Смирнова, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, Т.М. Ильина, А.Н. Гречкин
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Липоксигеназный каскад – источник сигнальных соединений, играющих важную роль при формировании иммунного ответа растений. Его продукты оксилипины, участвуют в ответных реакциях на механические повреждения, воздействие патогенов и факторов окружающей среды. Ферменты, катализирующие образование оксилипинов, принадлежат к атипичным цитохромам P450 семейства CYP74. Семейство CYP74 включает две дегидразы – алленоксидсинтазу (АОС) и дивинилэфирсинтазу (ДЭС) и две изомеразы – гидропероксидлиазу (ГПЛ) и эпоксиалкогольсинтазу (ЭАС). Объектами настоящей работы являются 4 рекомбинантных фермента подсемейства CYP74B: CYP74B3 (*Solanum tuberosum*), CYP74B4v1 (*Medicago sativa*), CYP74B6 (*Cucumis sativus*), CYP74B16 (*Linum usitatissimum*), а также 4 фермента подсемейства CYP74C: CYP74C4_ST (*S. tuberosum*), CYP74C31 (*Cucumis sativus*), CYP74C1_CS (*C. sativus*) и CYP74C13_MT (*M. truncatula*). Как было описано, подсемейство CYP74B объединяет 13-специфичные ГПЛ и 13-специфичные ДЭС. Подсемейство CYP74C включает 9/13-специфичные АОС и ГПЛ. Рекомбинантные ферменты были получены в гетерологичных системах экспрессии с использованием клеток *E. coli*. Для определения типа катализа были проведены инкубации с субстратами – 9 и 13-гидроперекисями линолевой и альфа-линоленовой кислот. Предпочтительными субстратами CYP74B являются 13-гидроперекиси. При инкубации ферментов помимо продуктов ГПЛ (ДЭС для CYP74B16) были обнаружены продукты ЭАС. В реакциях ферментов CYP74C со всем 4 субстратами образовывались продукты ЭАС и ГПЛ; в зависимости от субстрата соотношение этих продуктов менялось. Были получены мутантные формы ферментов CYP74C13_MT, CYP74C1_CS и CYP74C31 с заменами в каталитически важных доменах, гидропероксид-связывающем домене и F/L-toggle. Мутантные формы ферментов демонстрируют преимущественно АОС активность. В отличие от конверсии АОС в ГПЛ в результате сайт-направленного мутагенеза, обратные преобразования ГПЛ в АОС были проведены впервые в настоящей работе. Полученные результаты демонстрируют дуалистичный характер ферментов дикого типа ГПЛ/ЭАС подсемейств CYP74B и CYP74C, их универсальность и конверсию в АОС путем сайт-направленного мутагенеза. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-00508. Исследование фермента CYP74B16 проводилось при поддержке гранта 18-34-01012 мол_а.*

ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, СОПРЯЖЁННАЯ С АВТОТРОФНЫМ РОСТОМ НА МОНООКСИДЕ УГЛЕРОДА

А.А. Попова, М.И. Прокофьева, И.М. Елизаров, Е.А. Бонч-Осмоловская, С.Н. Гаврилов
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Интерес к генерации тока микроорганизмами вызван стремлением к совершенствованию технологий использования возобновляемых источников энергии. Одной из перспективных технологий является утилизация монооксида углерода (CO), выделяемого при сжигании бытовых отходов, при производстве стали и входящего в состав синтез-газа, с помощью микробных топливных элементов (МТЭЛ). Получение энергии при окислении CO описано для микробных консорциумов, выращенных на органических субстратах. Целью нашей работы была оценка способности чистых культур термофильных карбоксидотрофных бактерий генерировать электрический ток при автотрофном росте на CO без добавления органики. В качестве потенциальных электрогенов были протестированы термофильные грамположительные бактерии *Thermincola ferriacetica* и *Carboxydocella thermautotrophica*, способные к гидрогеногенной карбоксидотрофии и восстановлению Fe(III) в присутствии CO как единственного донора электронов. Ранее показано, что *T. ferriacetica* способна генерировать ток в МТЭЛ в присутствии органических субстратов. Для изучения электрогенной активности бактерий использовали мембранные МТЭЛ. На аноде поддерживали постоянный потенциал – 100 мВ против стандартного водородного электрода. Единственным источником углерода и донором электронов являлся CO. Мониторинг роста осуществляли прямым подсчётом клеток с помощью фазовоконтрастного микроскопа. Состав газовой фазы определяли газохроматографически. Измерения показали, что клетки *T. ferriacetica* способны генерировать ток при росте на CO, а клетки *C. thermautotrophica* нет. В анодной камере, инокулированной *T. ferriacetica*, потребление CO составило 7,53 мМ при генерации постоянного тока плотностью 17–36 мА/м^2 поверхности анода в течение 100 ч. Генерация тока коррелировала с потреблением CO и ростом клеток, что свидетельствует об использовании CO в качестве донора электронов при электрогенном росте *T. ferriacetica*. Наши эксперименты показали принципиальную возможность электрогенеза в МТЭЛ с использованием CO как единственного донора электронов, что открывает перспективы скрининга обширной группы карбоксидотрофных микроорганизмов на способность генерировать ток и их дальнейшего применения для переработки газообразных отходов с образованием электроэнергии. *Работа поддержана грантом РНФ № 17-74-30025.*

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ III ФОРМЫ РубисКО В ТРАНСАЛЬДОЛАЗНОМ ВАРИАНТЕ ЦИКЛА КАЛЬВИНА У ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Е.Н. Фролов, И.В. Кубланов, С.В. Тощаков, Н.В. Пименов, Е.А. Бонч-Осмоловская, А.В. Лебединский, Н.А. Черных
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

В ходе нашего недавнего исследования сульфатредукции в кислых горячих источниках была выделена и охарактеризована новая автотрофная сульфатредуцирующая бактерия *Thermodesulfobium acidiphilum* штамм 3127-1T. Этот микроорганизм рос автотрофно на водороде или формиат в процессе сульфатного или тиосульфатного дыхания, и это был единственный способ роста, который нам удалось обнаружить. Анализ генома *T. acidiphilum* 3127-1T открыл присутствие гена для большой субъединицы РубисКО (cbbL-III). Наш филогенетический анализ показал, что РубисКО из *T. acidiphilum* 3127-1T, совместно с гомологами из *T. narugense* Na82T, *Ammonifex degensii* KC4T и *Ammonifex thiophillus* SRT образуют отдалённый субклад у корня всей ветви III формы. Ген cbbL-III находился внутри генного кластера обозначенного нами cbb1 и состоящего из 10 генов, которые согласно нашим предсказаниям вовлечены в фиксацию CO_2. Также было идентифицировано два дополнительных генных кластера, обозначенных cbb2 и cbb3 (по три гена в каждом), которые согласно нашим предсказаниям кодируют функции связанные с фиксацией CO_2 и центральным метаболизмом углерода. Генные кластеры cbb содержали все необходимые гены ферментов цикла Кальвина, в том числе ген для фосфорибулокиназы, однако, было показано наличие трансальдолазы вместо седогептулоза-1,7-бисфосфатазы и седогептулоза-1,7-бисфосфат альдолазы. Поэтому мы предположили участие трансальдолазного варианта цикла Кальвина в фиксации CO_2 у *T. acidiphilum* 3127-1T. Результаты, полученные в ходе протеомного анализа, подтверждали результаты геномного анализа – все ферменты цикла Кальвина входили в число наиболее представленных белков в протеоме. Более того, экстракт автотрофно выращенных клеток *T. acidiphilum* 3127-1T обладал активностями рибулозабисфосфаткарбоксилазной, фосфорибулокиназной и трансальдолазной реакций. Согласно нашим экспериментам, III форма РубисКО работает в трансальдолазном варианте цикла Кальвина в *T. acidiphilum* 3127-1T. Данная работа впервые показывает участие III формы РубисКО в автотрофном росте через цикл Кальвина. *Эта работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 17-74-30025) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-34-00258).*

ДИССИМИЛЯЦИОННАЯ СУЛЬФАТРЕДУКЦИЯ У CRENARCHAEOTA: ГЕНОМИКА, ПРОТЕОМИКА

Н.А. Черных[1], Е.Н.Фролов[1], А.Ю. Меркель[1], Н.В.Пименов[1], А.В. Лебединский[1], Е.А. Бонч-Осмоловская [2]
[1] ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, Россия; [2]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Микробное диссимиляционное восстановление сульфатов (МДСР) является важным современным звеном цикла серы, распространенным в основном у бактерий, но у архей, известна только для эвриархеоты Archaeoglobus, который, как было установлено, приобрел гены МДСР от бактерий. У гипертермофильных кренархей семейства Thermoproteaceae гены, ответственные за восстановление сульфатов, представлены глубоко укоренившимися гомологами, отличающимися от гомологов бактерий и археоглобуса. Хотя для нескольких членов Thermoproteaceae была заявлена способность к МДСР, но этот процесс не был подтвержден экспериментальными данными. Данная работа направлена на выяснение МДСР в земных горячих источниках, благоприятных для Thermoproteaceae, и на выявление агентов процесса и генов, участвующих в «истинно архейной» МДСР. В качестве методов исследования мы использовали профилирование микробного термофильного сообщества в сочетании с радиоизотопным методом определения 35SO4-сульфатредуцирующей активности. Проводили эксперименты по росту, с получением данных протеомики "Vulcanisaeta moutnovskia", выделенной из наземного термального источника, а также проводили эксперименты с типовыми штаммами видов Thermoproteaceae, для которых ранее было заявлено, что эти организмы способны к МДСР. В кислых гипертермальных источниках Камчатского полуострова наблюдалась значительная скорость восстановления сульфатов. Профилирование данного сообщества показало, что археи составляют 95% от всех организмов и 20% организмов относятся к Crenarchaeota рода Vulcanisaeta. Было показано, что выделенная из этой среды "Vulcanisaeta moutnovskia" способна расти с помощью МДСР, в то время как другие испытанные нами Thermoproteaceae не обладали этой способностью. Геномные и филогенетические исследования показали, что у Crenarchaeota диссимиляционное восстановление сульфитов может быть древним, а последующее приобретение генов qmoABC от бактерий позволило "V. moutnovskia" расти путем сульфатзависимого дыхания. *Это исследование было частично поддержано грантом RSF 17-74-30025.*

МЕТАГЕНОМИКА: ОТ МИКРОБИОЛОГИИ ДО БИОТЕХНОЛОГИИ

А.В. Марданов
Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Абсолютное большинство микроорганизмов из природных экосистем не могут быть культивированы в лабораторных условиях и остаются неизученными. Метагеномика, анализ коллективного генома микробного сообщества, позволяет на геномном уровне охарактеризовать сообщество и отдельных его членов, включая некультивируемое большинство. В биотехнологии метагеномный анализ создает основу использования генетического потенциала "некультивируемого большинства" микроорганизмов, от новых ферментов до биоинженерии микробных консорциумов. В докладе будут представлены проведенные нами метагеномные исследования, результатами которых стало описание новых эволюционных линий микроорганизмов и их геномная характеристика, реконструкция путей метаболизма микробных сообществ. Объектами этих работ были микробные консорциумы, осуществляющие удаление биогенного азота и фосфора из сточных вод. Эти сложные по составу консорциумы включают различные группы микроорганизмов со взаимодополняющими функциональными возможностями. Анализ метагенома микробного сообщества биореактора, осуществляющего процесс анаммокс (анаэробное окисление аммония нитритом с

образованием газообразного азота), позволил получить несколько десятков геномов микроорганизмов, среди которых были представители новых филогенетических линий филумов Ignavibacteriae, Chloroflexi, Armatimonadetes, Patescibacteria, Verrucomicrobia, а также некультивируемые бактерии рода *Candidatus Briocadia*, осуществляющие анаммокс реакции. Эти данные позволили реконструировать пути метаболизма этих микроорганизмов и их функциональные роли в сообществе. Вторым объектом исследований был микробный консорциум фосфат-аккумулирующих бактерий, осуществляющих эффективное удаление фосфатов за счет их внутриклеточного накопления в виде полифосфатов. Метагеномный анализ этого консорциума позволил определить геномы основных членов сообщества, в том числе некультивируемых фосфат- и гликоген-аккумулирующих бактерий. Полученные результаты создают основу для направленной модификации микробных консорциумов с целью повышения эффективности осуществляемых ими биотехнологических процессов. *Работы коллектива были поддержаны грантами РФФИ №18-29-08008 и №18-29-25016.*

БИОИНЖЕНЕРИЯ. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И ПРИЛОЖЕНИЯ

Стендовые доклады

ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Д.Р. Батыргазиева, Е.В. Гусева, Н.В. Меньшутина
Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Культивирование клеток млекопитающих является востребованным направлением в области фармацевтики и медицины. В связи с многочисленными исследованиями возникает острая необходимость систематизации и структурирования экспериментальных данных. Развитие цифровых технологий позволяет решить данную задачу и обуславливает актуальность внедрения информационных систем. Информационная система включает в себя базу данных и алгоритм поиска по параметрам. База данных (БД) состоит из 7 таблиц, объединяющих в себе основные элементы процесса культивирования клеток: клеточная линия, питательная среда, подложка и биореактор. Стоимость данных элементов системы достаточно высока, поэтому на этапе планирования эксперимента исследователю крайне важно быть уверенным в том, что материал используемой подложки подходит для культивирования выбранной клеточной линии, а геометрические параметры биореактора позволяют использовать подложки предполагаемого типа. Информационная система реализована в виде приложения с дружественным интерфейсом в Microsoft Visual Studio 2015 ОС Windows 10. Она содержит следующие модули: «База данных» – можно вносить и изменять данные; «Поиск по параметрам» – позволяет отсортировывать информацию по необходимым параметрам; «Онтология культивирования» – вкладка содержит алгоритм подбора системы культивирования; «О программе» – описание приложения. Поиск осуществляется по следующим параметрам: Название клетки, тип клетки, способ культивирования, оборудование, область культивирования, матрикс. В основе модуля подбора системы культивирования лежит алгоритм, разработанный по рекомендациям из технической документаций различных производителей оборудования и матриксов. При наличии исходных данных, таких как оборудование и тип клетки млекопитающего, происходит пошаговый опрос системы. Логические вопросы, содержащиеся в данном алгоритме, подобраны так, что, переходя к новому шагу, система отсортировывает данные из БД, в результате которого пользователь получает достоверную информацию о процессе культивирования клетки. Таким образом, предложенная система способна выполнить поиск необходимых условий проведения процесса, выбрать решения среди известных экспериментальных данных и осуществить поддержку проектных работ по культивированию клеток млекопитающих.

ЗЕЛЕНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК КАК РЕПОРТЕР СВОРАЧИВАНИЯ ФОСФОЛИПАЗЫ А1 *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

С.И. Бахолдина[1], А.М. Стенкова[2], Е.П. Быстрицкая[1], Е.А. Менчинская[1], Т.Ю. Горпенченко[3], Д.Л. Аминин[1], Е.В. Сидорин[1], Н.Ю. Ким[1], Т.Ф. Соловьева[1]
[1]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; [2]Дальневосточный федеральный университет Школа биомедицины;[3]ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН Владивосток, Россия

Мы изучили влияние температуры (37, 26 и 18°C) на сворачивание рекомбинантной фосфолипазы А1 (PldA) *Yersinia pseudotuberculosis* в клетках *Escherichia coli* с помощью зеленого флуоресцентного белка (GFP) в качестве репортера фолдинга. В экспрессионной плазмиде последовательности PldA и GFP были соединены таким образом, что образование хромофора было возможно только при правильном сворачивании целевого белка. Экспрессионная конструкция, несущая только gfp ген, была использована в качестве положительного контроля. Максимальная флуоресценция наблюдалась в *E. coli*, выращенных при 18°C, тогда как в бактериях, культивируемых при 26°C она падает почти в 4 раза, а при 37°C практически находится на уровне бесплазмидных клеток. Следовательно, понижение температуры роста способствует корректному сворачиванию рекомбинантного белка. С помощью флуоресцентной микроскопии показано, что химерный белок накапливается в клетках в виде телец включения (ТВ), тогда как GFP находится в растворимой форме. ТВ химерного белка, синтезированные при 18°C, были выделены и очищены от сопутствующих примесей. Согласно SDS-PAGE ТВ содержат белок с молекулярной массой около 57 кДа, что соответствует расчетной величине. Они имеют сферическую форму и диаметр 800–1000 нм. Интенсивность флуоресценции белка в ТВ позволяет предполагать, что на долю корректно свернутого белка в ТВ может приходиться до 40%. Полученные ТВ по данным турбидиметрии практически полностью дезагрегируют в 0,03% SDS, при этом интенсивность флуоресценции химерного белка сохраняется на уровне 47%, указывая на то, что часть солюбилизированного из ТВ белка сохраняет близкую к нативной конформацию. В то же время по данным КД-спектроскопии этот процесс сопровождается частичной

денатурацией белка: содержание α-структуры увеличивается на 17,3%, за счет уменьшения содержания α-структуры. ТВ химерного белка не токсичны для эукариотических клеток и по данным конфокальной микроскопии обладают свойством проникать в клетки нейробластомы. Таким образом, GFP является удобным маркером, который позволяет следить за сворачиванием рекомбинантной фосфолипазы *in vivo* и за ее денатурацией при солюбилизации из ТВ под действием растворителя, а также за взаимодействием ТВ с эукариотическими клетками.

КОМПОЗИТНЫЕ ГИДРОГЕЛИ ФИБРИН/ЛИПИД/ПОЛИСАХАРИД ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Ю.А. Валиуллина, Д.А. Файзуллин, Ю.Ф. Зуев
Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Композитные гидрогели на основе белков и полисахаридов обладают большим потенциалом в области разработки средств доставки лекарств и в регенеративной медицине для замены и лечения тканей и органов благодаря дешевизне сырья, биосовместимости, малотоксичности, возможности в широких пределах регулировать функциональные свойства препаратов путем химической модификации входящих в их состав биополимеров и контроля их вторичной структуры [1]. Использование заряженных полисахаридов упрощает технологию получения гидрогелей, но неблагоприятно сказывается на токсичности и стабильности в организме. Определенную проблему представляет удержание лекарственного компонента в объеме гидрогеля и его целевое высвобождение в организме. С другой стороны, для инкапсуляции лекарственных средств и продления их циркуляции в кровотоке хорошо себя зарекомендовали липосомы на основе природных или синтетических липидов. Однако сами по себе липосомы слабо удерживаются в гидрогелях. Ранее нами было показано, что фибриновый гель при определенных условиях способен прочно связывать липосомы из дипальмитоилфосфатидилхолина [2]. В представленной работе исследованы физико-химические свойства и условия получения гидрогелей с использованием липосом из нейтральных липидов в качестве инкапсулирующего агента для лекарственного средства, фибрина – в качестве удерживающей матрицы и незаряженного полисахарида рамногалактуронана I в качестве средства, регулирующего механические свойства и обеспечивающего направленное высвобождение терапевтического фермента. *Работа частично поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Республики Татарстан (проект № 18-415-160011).*

1. Yahia L.H., et al. History and Applications of Hydrogels // J. Biomed. Sci. 2015, V. 4, P.2.
2. Бакирова Д.Р., Файзуллин Д.А., Валиуллина Ю.А., Сальников В.В., Зуев Ю.Ф. Влияние состава липидной поверхности на формирование и структуру фибриновых сгустков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2017 г., Том 163, № 6, С. 687-691.

СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ СУБТИЛИЗИНОПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS*

Ю.А. Васильева, Д.С. Пудова, М.Р. Шарипова
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия

Субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus pumilus* 3–19 (AprBp) представляет собой фермент, который обладает широкой субстратной специфичностью и проявляет максимальную активность при pH 9.0 и температуре 37°C. Данная протеиназа отличается сильными гидролитическими свойствами, позволяющими расщеплять белковые молекулы на короткие пептиды и аминокислоты. Благодаря своим свойствам протеиназу AprBp используют как кормовую добавку для сельскохозяйственных птиц и животных, что позволяет увеличить усвоение полезных веществ и белков, содержащихся в пище. Однако получение нативного фермента в промышленных масштабах требует больших затрат. Поэтому, актуальной задачей биотехнологии является упрощение и снижение стоимости промышленного производства ферментов, в частности протеиназ. Целью данной работы является создание устойчивой системы экспрессии фермента протеиназы на основе метилотрофных дрожжей *P. pastoris*. Дрожжи являются безопасными, легко культивируемыми организмами и способны осуществлять большинство посттрансляционных модификаций для получения биологически активного белка. Для получения экспрессии протеиназы в эукариотических клетках дрожжей провели трехступенчатое лигирование дрожжевого вектора с оптимизированным геном протеиназы aprBp под контролем сигнальных пептидов киллер-белка *Saccharomyces cerevisiae* и лизоцима *Gallus gallus*. При этом использовали безпротеазный штамм дрожжей *PichiaPink* и интегративный дрожжевой вектор pPINK-LC, в состав которого входит индуцибельный промотор AOX1, а также ген селективного маркера ade2. Клонирование полученных конструкций проводили в клетках *E. coli* DH5α целостность вставки подтверждали с помощью ПЦР, рестрикционного анализа и секвенирования. Для получения системы экспрессии клетки *P. pastoris* трансформировали путем электропарации дрожжевым вектором с интегрированным геном бациллярной протеиназы. Генотипирование белых колоний дрожжей подтвердило присутствие гена субтилизиноподобной протеиназы, встроенного в геном. Таким образом, получены рекомбинантные колонии дрожжей *P. pastoris*, в геном которых интегрирован ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* 3–19 под контролем гетерологичных сигнальных пептидов. *Данная работа поддержана грантом РНФ № 16-16-04062.*

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *HALOMONAS CHROMATIREDUCENS* AGD 8-3. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ И ОСОБЕННОСТЕЙ СТРОЕНИЯ ЭТИХ БЕЛКОВ

А.Н. Антипов, Н.Н. Мордкович, Т.В. Хижняк, Н.А. Окорокова, Т.Н. Сафонова, В.П. Вейко
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Нуклеозидфосфорилазы (NP) относятся к группе гидролаз N-гликозидных соединений. Отмечено, что в клетках злокачественных новообразований повышается уровень накопления этих ферментов и выражается в повышенной выживаемости опухолей. В рамках «зеленой химии» NP широко используются при синтезе модифицированных нуклеозидов, применяющихся в практической медицине. Молекулярный механизм ферментативной активности NP, так же как и природа проявления у этих белков термостабильности не выявлены. Активно проводится исследование новых NP из микроорганизмов, отличающихся условиями своего обитания. Грамотрицательная бактерия Halomonas chromatireducens AGD 8-3 выделена из содовых солончаков Кулундинской степи и способна к росту в аномально высоком уровне солености (2,7M NaCl) при щелочном значении среды (pH 9,5–10), что переводит ее в разряд экстремофилов. Гены (deoA и deoD) тимидин- (TPP, EC 2.4.2.4) и пурин-нуклеозидфосфорилазы (PuNP, EC 2.4.2.1) из *H. chromatireducens* AGD 8-3 амплифицированы и клонированы в составе ранее сконструированной нами экспрессионной плазмиды pUU, позволившей обеспечить высокий уровень накопления ферментативно активных целевых рекомбинантных белков в клетках *E.coli*. TPP и PuNP были очищены ионообменной хроматографий до гомогенного состояния, первичные структуры подтверждены. MALDI-TOF MS/MS и исследованы их физико-химические и ферментативные свойства. Аналитической гель-хроматографией показано, что TPP и PuNP формируют димерную и гексамерную формы, соответственно. Удельная активность нуклеозидфосфорилаз составила: PuNP–28 ед/мг (Топт. 55°C, pHопт. 7,0–9,1), а для TPP–235,2 ед/мг (Топт.60°C, pHопт.7,2–8,9). Методом ДСК исследована термальная устойчивость этих белков. Показано, что TPP из *H. chromatireducens* AGD 8–3 является толерантной по отношению к нуклеозидам рибо-ряда. Выявлена повышенная (примерно, в 1,7 раза) активность исследуемой TPP по отношению к dT, по сравнению с ее аналогом из *E. coli.* Получены кристаллы новых рекомбинантных NP из *H. chromatireducens* AGD 8–3, проведен сравнительный рентгеноструктурный анализ строения активных центров, третичной и четвертичной структур исследуемых ферментов и их аналогов из *E. coli*. *Исследование выполнено при поддержке РФФИ (Грант № 18-04-00784 А).*

СИСТЕМА ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ РНКАЗЫ (БИНАЗЫ) НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТНОГО ГИДРОГЕЛЯ: СТРУКТУРА, ТОКСИЧНОСТЬ И СКОРОСТЬ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА

Л.Р. Богданова[1], Н.Л. Захарченко[1], П. В. Зеленихин[2], О.Н Ильинская[2], Ю.Ф. Зуев[1]
[1]Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН; [2]Институт фундаментальной медицины и биологии КФУ, Казань, Россия

Прогресс в биотехнологии и фармакологии привел к появлению множества биомолекул, которые потенциально могут использоваться в качестве лекарственных препаратов. Тем не менее, подобные препараты имеют ряд ограничений, например, к пероральному приему из-за их чувствительности к агрессивной среде желудка. В связи с этим активно разрабатываются подходы по инкапсуляции терапевтических белков в инертные матрицы, с одной стороны, защищающие от протеолитических ферментов, а с другой – обеспечивающие постепенный выход и постоянную концентрацию активного вещества. В качестве подобных инертных матриц зачастую применяют гидрогели на основе полисахаридов, например, альгината, для которого характерны мягкие условия гелеобразования без использования органических растворителей. Это позволяет включать в поры альгинатного гидрогеля биомолекулы с сохранением их третичной структуры. Цель данной работы заключалась в инженерии системы доставки РНКазы *Bacillus pumilus* (биназы) с известными противоопухолевыми свойствами на основе альгинатного гидрогеля и поиске корреляций структура–свойства. Были получены микросферы из альгинатного гидрогеля, содержащие в порах полимерной матрицы биназу, которая представляет собой глобулярный катионный белок с pI 9,5 и молекулярной массой 12213 Да. Для получения микросфер использовали метод ионотропного гелеобразования, в качестве сшивающих агентов – катионы двухвалентных металлов: Zn^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}. Установлена зависимость между радиусом сшивающего катиона и структурными особенностями микросфер. Показано, что, варьируя концентрацию полисахарида, и/или катионов можно регулировать плотность микросфер, что определяет их свойства как материала для иммобилизации биназы. Исследовано высвобождение биназы из альгинатных микросфер с течением времени. Максимальное время удерживания РНКазы в микросферах составило 2 часа. С использованием МТТ-теста исследовано влияние микросфер на жизнеспособность клеток HeLa, которая уменьшается в ряду: Ca^{2+}>Ba^{2}+>Zn^{2+}. *Работа частично поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Республики Татарстан (проект № 18-415-160011). Сканирующая электронная микроскопия выполнена в Междисциплинарном центре аналитической микроскопии Казанского федерального университета.*

КОНСТРУИРОВАНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ БИОТЕСТОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА СЛОЖНЫХ СРЕД

Е.Н. Есимбекова[1,2], В.П. Калябина[2], В.А. Кратасюк[2,1]
[1]Институт биофизики СО РАН, Красноярск; [2]Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

Сложные по составу жизненно важные компоненты природной среды, такие как почва и продукты питания растительного происхождения, склонны к аккумуляции потенциально опасных веществ, поэтому анализ их безопасности является одной из приоритетных задач экологической токсикологии. В работе сформулированы принципы конструирования биолюминесцентных ферментативных тестов для оценки качества сложных сред, которые заключаются в обеспечении максимальной чувствительности к потенциально токсичным веществам при минимальном воздействии незагрязнённых сложных сред. Разработан-

ные принципы легли в основу схемы конструирования, которая применялась при создании нового биолюминесцентного метода для интегральной экспрессной оценки химической безопасности овощей и фруктов, основанного на использовании в качестве тест-системы ферментов светящихся бактерий НАД(Ф)•Н:ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы (Р+Л). В модельных экспериментах показано, что биферментная система Р+Л является чувствительной к ряду металлов (свинец, цинк, медь, ртуть, алюминий, хром) и пестицидов (α- и γ- ГХЦГ, ДДЭ, ДДТ) на уровне и ниже уровня их предельно допустимых концентраций или максимально допустимого уровня в продуктах питания. Проведена оценка воздействия исследуемых сложных сред на ферментативную реакцию в отсутствие загрязнителей. Подобраны условия пробоподготовки, обеспечивающие уменьшение эффекта воздействия компонентов сложной анализируемой среды на показания биотеста. На заключительном этапе проведены модельные эксперименты по оценке чувствительности ферментативной системы к смеси компонентов сложной системы и токсических веществ. Показано, что при внесении металлов и пестицидов непосредственно в пробу овощей чувствительность биферментной системы Р+Л к воздействию токсикантов сохраняется на уровне их ПДК для продуктов питания. Таким образом, биферментная система светящихся бактерий Р+Л может быть использована в качестве биотеста для анализа химической безопасности плодоовощной продукции. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки, проект № 18-44-242003.*

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВ ДОСТАВКИ РНКаз В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Н.Л. Захарченко[1], В.В. Сальников[1], О.Н. Ильинская[2], Ю.Ф. Зуев[1]
[1]Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН; [2]Институт фундаментальной медицины и биологии КФУ, Казань, Россия

В последние годы широкий спектр материалов, таких как липиды, полимеры, поверхностно-активные вещества и др., активно используются в противоопухолевой терапии, в качестве средств точечной доставки лекарственных препаратов. В этом ряду особое место занимают полисахариды, благодаря своим уникальным физико-химическим и биологическим свойствам. Хитозан является катионным полисахаридом, который, в определенных условиях, способен взаимодействовать с белками и образовывать стабильные комплексы. В работе исследованы наноразмерные комплексы, образованные хитозаном и одним из основных молочных белков – бета-казеином. Показана зависимость размеров наночастиц от концентрации компонентов. Подобрано оптимальное значение pH для формирования стабильных комплексов. Исследовано взаимодействие полученных наночастиц с РНКазами, на примере РНКазы А и биназы (бактериальной РНКазы из *Bacillus pumilus*). В работе использованы методы динамического светорассеяния, электронной микроскопии и спектрофотометрии. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ и правительства республики Татарстан № 18-44-160013 и № 18-415-160011.*

ВОЗМОЖНОСТИ КОНДУКТОМЕТРИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ МОРФОЛОГИИ КОМПОЗИЦИОННЫХ БЕЛОК-ПОЛИСАХАРИДНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ

О.С. Зуева[1], А.О. Макарова[2], Ю.Ф. Зуев[2]
[1]Казанский государственный энергетический университет; [2]Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Гидрогели представляют собой пространственные трехмерные сети, созданные из взаимодействующих биополимерных цепей, способные удерживать большое количество воды и включать дополнительные вещества для целенаправленного изменения их функциональных характеристик. Нами изучены гидрогели на основе желатины и ионного полисахарида κ-каррагинана. Взаимодействие макроионов белка и полисахарида может приводить к формированию устойчивых полиэлектролитных комплексов, способствующих гелеобразованию в данных системах. Для дальнейшего целенаправленного изменения свойств гидрогелей исследовано влияние наноматериалов, в качестве которых выбраны многостенные углеродные нанотрубки Таунит. Изучена удельная электрическая проводимость полученных композиционных гидрогелей при различных концентрациях гелеобразователей в присутствии углеродных нанотрубок и без них. Показано, что для нахождения оптимального массового соотношения κ-каррагинан/желатина (Z = 0.8), может быть использован не только обычно применяемый метод турбидиметрического титрования для контроля оптической плотности смеси, но и кондуктометрия. Установлена взаимосвязь между структурой и электропроводящими свойствами гидрогелей на основе желатины и κ-каррагинана. Показано, что ход кривых удельной электрической проводимости однозначно связан со структурными перестройками в рассмотренных системах, вследствие чего кондуктометрический метод наряду с другими методами может быть использован для изучения структурных переходов в гидрогелях. В ходе исследования установлено, что добавление углеродных нанотрубок к гидрогелям на основе полиэлектролитных комплексов далеко не всегда способствует увеличению их электрической проводимости и даже может приводить к противоположным результатам. Проанализированы возможные причины такого поведения. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и правительства республики Татарстан № 18-415-160011.*

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В РЕАКЦИИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА

Л.А. Иванова[1], А.Е. Баранчиков[2], Н.А. Верлов[1], Н.В. Цвигун[3], Ю.Е. Горшкова [4], А.П. Трашков[1], Г.П. Копица[1], А.А. Кульминская[1]

[1]Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; [2]Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва; [3]ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, [4]Объединенный институт ядерных исследований, Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка, Дубна, Россия

Бактериальная целлюлоза (БЦ) синтезируется бактерией *Gluconoacetobacter xylinum* на поверхности питательной среды в стационарных условиях в виде плотной плёнки, способной удерживать большое количество жидкости в соотношении 1:100 (сухое вещество: вода) и сохранять высокую механическую прочность на разрыв [2]. Физико-химические свойства и уникальная структура нано-гель-плёнки (НГП) бактериальной целлюлозы обуславливают ее широкое использование при создании новых композитных материалов для хирургии, медицины и др. областей [3]. Известно, что при использовании традиционных медицинских средств терапии различных ран частая смена перевязочного материала влечет за собой травмирование их поверхностей [1]. Использование же БЦ в качестве раневого покрытия, для которого необходимы гигроскопичность, водо- и паро-проницаемость материала, механическая прочность и биосовместимость, представляется весьма перспективной альтернативой стандартной терапии. Несмотря на перечисленные преимущества использования БЦ в тканевой инженерии для восстановления кожных покровов, существует ряд ограничений для ее применения в чистом виде в качестве эффективного раневого покрытия, в частности, ее низкая биодеградируемость [4]. Одним из очевидных приемов повышения биодеградируемости БЦ является использование природных способов деградации полисахаридов в результате их ферментативного гидролиза, который не может быть осуществлен организмом самостоятельно в виду отсутствия в человеческом теле целлюлитических ферментов. Целью данной работы было изучение процесса деградации целлюлозных нано-гель пленок под воздействием целлобиогидролазы из гриба *Scytalidium candidum* 3C, выбор условий биодеградации БЦ и проведение эксперимента *in vivo*. Комплексный анализ данных растровой микроскопии, низкотемпературной адсорбции азота и малоуглового рассеяния нейтронов показал, что биодеструкция БЦ, катализируемая целлобиогидролазой из *S. candidum* 3C, приводит: 1. К росту толщины первичных структурных элементов ламеллярного типа, из которых сформированы волокна БЦ; 2. К снижению удельной площади поверхности SБЭТ (порядка 5–10%) бактериальной целлюлозы 3. К разрыхлению структур, образованных волокнами бактериальной целлюлозы. Эти изменения способствуют уменьшению травматичности разрабатываемых раневых повязок.

СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БАЦИЛЛЯРНЫХ ПРОТЕИНАЗ

А.О. Корягина, Л.Р. Пушкарева, А.В. Солодкая, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова

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

Биотехнологии получения микробных ферментов активно развиваются. Для повышения количества целевого белка применяют системы экспрессии. Такие системы представляют собой комбинацию вектора экспрессии и штамма-продуцента. В настоящей работе для получения сериновых протеиназ (субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы) *Bacillus pumilus*, обладающих потенциалом в промышленности, была использована LIKE-система экспрессии. Ранее LIKE система была оптимизирована с помощью сигнальных пептидов *Bacillus megaterium* (SPPac, SPAsp, SPYngk). Важным этапом получения белка является подбор оптимального штамма продуцента. Внедрение технологии рекомбинантных ДНК позволило направленное вмешательство в генетику производственных штаммов. В качестве продуцентов могут выступать разнообразные штаммы бацилл, но наличие внеклеточных протеиназ препятствует накоплению рекомбинантных белков – происходит их расщепление, обусловленное наличием клеточных систем «контроля качества». Поскольку сворачивание многих гетерологичных белков обычно неэффективно, эти системы «контроля качества» представляют собой основные узкие места секреции рекомбинантных ферментов. В настоящей работе тестировали протеазодефицитные штаммы: *B. subtilis* BG2036, в котором удалены гены двух внеклеточных протеаз; и штамм *B. subtilis* IIG 27-31 полученный с помощью CRISPR-Cas системы, с инактивированными генами спорообразования, антимикробных метаболитов, образования биопленок и внеклеточных протеиназ (любезно предоставлен проф. J. Altenbuchner). Было показано, что внеклеточная активность субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы была в 2–3 раза выше в штамме *B. subtilis* IIG 27-31 в составе оптимизированной LIKE системы экспрессии. Таким образом, сочетание эффективной LIKE экспрессионной системы и оптимального штамма продуцента может стать основой для получения промышленно-важных белков. *Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров, а также при поддержке гранта РФФИ (проект № 19-08-00853).*

ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТАГЕНОМНОГО ПОДХОДА

Р.Ю. Котляров, А.В. Белецкий, А.Ю. Каллистова, А.Г. Дорофеев, Ю.А. Николаев, Н.В. Пименов, Н. В. Равин, А.В. Марданов

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Фосфаты используются в различных областях промышленности и аграрного сектора, а также являются компонентом коммунальных сточных вод. В настоящее время для очистки сточных вод от фосфатов применяются биотехнологии, основанные на использовании фосфат-аккумулирующих микроорганизмов (ФАО), «собирающих» неорганические фосфаты из среды и

включающих их в свою биомассу в виде полифосфатов при циклическом росте в анаэробных и аэробных условиях. В большинстве систем очистки сточных вод функцию фосфат-аккумуляции выполняют бета-протеобактерии Ca. *Accumulibacter phosphatis*. Однако, до настоящего момента ни один из известных представителей 'Ca. Accumulibacter' не выделен в чистую культуру. Поэтому целью работы является исследование новых представителей ФАО с помощью метагеномных подходов. Объектом исследования является микробный консорциум, полученный в лабораторной установке по очистки сточных вод от фосфатов, обеспечивающей удаление до 80% фосфора из среды. Суммарную ДНК образца активного ила секвенировали на Ilumina HiSeq 2500. Таксономический анализ полученных данных показал, что в исследуемом микробном сообществе доминировали представители филума Proteobacteria, на долю которых приходилось более 82,5% всех микроорганизмов. Большинство протеобактерий относились к классу Betaproteobacteria (52%), в основном к семейству Rhodocyclaceae (49%). Среди минорных групп обнаружены представители филумов Bacteroidetes (10,5%) и Chloroflexi (1,6%). В результате сборки метагеномных данных был получен геном представителя нового вида рода 'Ca. Accumulibacter', отличный от ранее описанных. В результате анализа его генома были выявлены основные метаболические пути, в том числе и путь аккумуляции фосфатов. Таким образом, исследуемое микробное сообщество является перспективным объектом как для дальнейших фундаментальных исследований метаболизма ФАО, так и для совершенствования биотехнологий очистки сточных вод от фосфора. *Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00627.*

АСМ ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ Н-СВЯЗЕЙ И СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ НАНОСТРУКТУР В МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Л.И. Матиенко, В.И. Бинюков, Е.М. Миль, А.А. Албантова
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

Мы предложили новый подход, использование метода атомно-силовой микроскопии (АСМ), к изучению роли водородных связей и супрамолекулярных структур в механизмах гомогенного и ферментативного катализа (Ni(Fe)-ARD Ациредуктон Диоксигеназы). Ферменты Ni(Fe)-ARD участвуют в methionine salvage pathway (MSP), универсальном пути превращения серосодержащих метаболитов в метионин. Различная активность Ni(Fe)-ARD по отношению к Ациредуктону и O_2 могла быть связана с самоорганизацией ферментов в различные макроструктуры за счет межмолекулярных Н-связей. Образование очень стабильных супрамолекулярных структур на основе тройных комплексов {Ni(acac)2•L1•L2} (L1=His=L-Гистидин и L2=Tyr=L-Тирозин), являющихся моделями Ni-ARD, может объяснить снижение активности Ni-ARD в реакции образования CO, являющегося нейротрансмиттером и антиапоптозной молекулой у млекопитающих. В случае адсорбции на модифицированной кремниевой поверхности тройных комплексов FeIIIx(acac)yTyrmHisn(H_2O)p, являющихся моделями FeARD, наблюдалась самоорганизация комплексов в структуры, напоминающие по форме микро трубочки тубулина (h~5 nm). Образование подобных структур может благоприятствовать активации O_2, региоселективному присоединению O_2 к ациредуктон-лиганду и последующим реакциям, приводящим к образованию метионина. Полученные данные могут приблизить нас к пониманию процессов, происходящих в результате функционирования Ni(Fe)-ARD Диоксигеназ, регуляторной роли Tyr- и His-фрагментов в синтезе метионина и CO. С использованием метода АСМ разработаны методические подходы для фиксации на поверхности за счет Н-связей и количественной оценки размерных параметров растительных митохондрий, ответственных за образование АТФ, и эритроцитов, переносчиков кислорода и различных веществ в клетки.

РЕКОНСТРУКЦИЯ КЛАСТЕРА ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА ЛАНТИБИОТИКА В ДРОЖЖАХ *PICHIA PASTORIS*

Ю. Мокрушина[1], И. Смирнов[1,2], С. Терехов[1], С. Пипия[1], А. Габибов[1]
[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия"

Рост числа инфекционных штаммов микроорганизмов со множественной лекарственной устойчивостью является серьезной проблемой современной медицины и представляет реальную угрозу для общественного здравоохранения во всем мире. Следствием устойчивости к антибиотикам являются рост медицинских расходов из-за необходимости интенсивной терапии пациентов, их более длительного пребывания в стационарах, а также рост смертности. Таким образом, становится актуальным разработка принципиально новых технологий получения препаратов с антимикробной активностью. Одним из современных подходов является поиск антибиотических препаратов среди «неклассических» природных источников биоразнообразия, таких как микробиота человека и животных или микроорганизмы-экстремофилы. Альтернативный подход к поиску новых антибиотиков может быть реализован в результате создания комбинаторных библиотек генетически модифицированных пептидных антибиотиков (лантибиотиков). В настоящей работе была проведена гетерологическая экспрессия кластера генов биосинтеза лантибиотика в дрожжах *Pichia pastoris* в качестве модельного организма-хозяина. Рекомбинантный штамм дрожжей с восстановленным биосинтезом лантибиотика проявлял антимикробную активность в отношении золотистого стафилококка. Получение искусственного «синтетического» разнообразия молекул за счет проведения мутагенеза гена лантитпептида и последующего ультравысокопроизводительного скрининга антимикробной активности, разработанного в нашей лаборатории ранее, открывает новые перспективы для создания лекарственных препаратов нового поколения. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-14-00331 и стипендии Президента РФ СП-3370.2019.4.*

НОВЫЕ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ СЕРООКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ *THIOHALOBACTER THIOCYANATICUS* HRH1^T И *GUYPARKERIA* SP. SCN-R1

Н.С. Шипков[1], Н.И. Дергоусова[1], Т.В. Ракитина[2], Л.А. Варфоломеева[1], Д.Ю. Сорокин[1,3], О.Г. Куликова[1], Т.В. Тихонова[1], В.О. Попов[1,2]

[1]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [2]НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия; [3]Отдел биотехнологии, Делфтский технический университет, Делфт, Нидерланды

Хемолитоавтотрофные галофильные серООкисляющие (SOB) бактерии *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1^T и *Guyparkeria* sp. SCN-R1 способны использовать тиоцианат в качестве единственного источника энергии, азота и серы. Ранее было показано, что процесс окисления тиоцианата в этих бактериях осуществляется по “цианатному пути”. Оба генома кодируют гомологи медь-содержащего фермента тиоцианатдегидрогеназы (TcDH), окисляющего тиоцианат по “цианатному пути” у представителей галоалкалофильных SOB рода *Thioalkalivibrio*. Однако, несмотря на наличие консервативных мотивов в белке, характерных для TcDH, общая гомология аминокислотных последовательностей по отношению к TcDH из *Thioalkalivibrio* не превышает 34 %. Кроме того, отличается окружение гена TcDH в соответствующем генном локусе. В частности, вместо системы транспорта меди Cop присутствует альтернативная система Cus.

TcDH из *Thiohalobacter thiocyanaticus* была выделена из лизата клеток, выращенных на тиоцианате. Наличие белка WP_0065748988 было подтверждено методом MALDI-TOF. Полученный препарат обладает тиоцианатдегидрогеназной активностью.

Для проведения дальнейших функциональных и структурных исследований гены соответствующих белков были клонированы в плазмидный вектор pHIS-Parallel3. Экспрессию белков в клетках *E. coli*. Очистку белков проводили методом аффинной хроматографии на Ni-агарозе с последующей гель-фильтрацией. Оба рекомбинантных белка в растворе существуют в виде агрегатов с различной молекулярной массой. После насыщения полученных белков ионами меди ферментативной активности в реакции окисления тиоцианата обнаружить не удалось.

Последовательности исследуемых белков содержат 6-7 остатков Cys. В кластере генов, предшествующем гену TcDH в этих бактериях, кодируется белок, принадлежащий к суперсемейству тиоредоксина. Существует вероятность, что этот белок способствует фолдингу TcDH. Для проверки этого предположения ген *Guyparkeria* клонировали в модифицированный плазмидный вектор pET-32a, содержащий тиоредоксин в качестве белка-носителя. Клетки *E. coli* с рекомбинантной плазмидой культивировали в среде M9 с добавлением ионов меди и микроэлементов. Очищенный рекомбинантный белок обладал меньшей склонностью к агрегации по сравнению с полученным ранее и обладал тиоцианатдегидрогеназной активностью.

РАЗНООБРАЗИЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В КИСЛЫХ ШАХТНЫХ ДРЕНАЖНЫХ ВОДАХ

Е.В. Груздев, В.В. Кадников, А.В. Марданов, Н.В. Равин

Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Кислые шахтные дренажные воды представляют собой экстремальную экосистему, которая характеризуется низким pH и высоким содержанием растворенных ионов металлов. На протяжении длительного времени считалось, что в таких экстремальных условиях способны обитать только прокариоты, поэтому в настоящее время данных о биоразнообразии эукариот весьма ограничены. Мы исследовали таксономический состав эукариот и прокариот кислых шахтных дренажей в районах месторождений металлов в Сибири. Объектами исследования были сообщества микроорганизмов обитающих в дренажных водах заброшенных шахт, расположенных вблизи месторождений «Шерловая гора», «Озерное», «Комсомольское» и в районе села Лазурка Алтайского края. Отобранные образцы характеризовались низким pH (от 2 до 5) и высоким содержанием металлов. Из образцов воды была выделена метагеномная ДНК с помощью набора MoBio PowerSoil (Qiagen). Таксономический состав прокариот и эукариот в микробных сообществах определяли в результате секвенирования вариабельных фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК на Illumina MiSeq. Полученные результаты показывают, что биоразнообразие организмов, обитающих в таких экстремальных экосистемах, невелико. Среди прокариот доминируют бактерии семейств *Gallionellaceae* и *Acidithiobacillaceae*. Биоразнообразие эукариот значительно отличалось в различных образцах. Были обнаружены представители мхов, зеленых водорослей, грибов и гетероконтов (группа SAR – страменопилы, альвеоляты и ризарии). В одном из образцов были обнаружены представители флагеллят Spumella, паразитами которых являются бактерии некультивируемого филума Dependentiae, обнаруженные среди прокариот. Подробные данные о составе микробных сообществ кислых шахтных дренажей будут представлены в докладе. *Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00356*.

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ВЫСОКОСТАБИЛЬНОЙ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ИЗ *DESULFUROCOCCUS AMYLOLITICUS*

В.Р. Сергеев[1,2], Ю.В. Киль[1], Г.Н. Рычков[1,2]

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

β-Галактозидаза (EC 3.2.1.23) из гипертермофильной археи *Desulfurococcus amyloliticus* катализирует реакцию расщепления β-O-гликозидной связи в лактозе и в синтетических β-D-галактозидах (пара- и орто-нитрофенилгалактозид, пНФГ и оНФГ). Методами HPLC и тонкослойной хроматографии был проведён анализ продуктов реакции, который показал, что после отщепления агликоновой части субстрата галактозильная группа может быть перенесена как на воду (гидролиз), так и на субстрат и другие акцепторы (трансгликозилирование). В отличие от реакции, катализируемой ферментом из *Escherichia coli*, расщепление лактозы β-галактозидазой *Desulfurococcus amyloliticus* (60°C, pH5, соответствующий pH-оптимуму активности) не приводит к значительному накоплению продуктов трансгликозилирования, что может быть связано с последующим расщеплением образующегося продукта. При этом заметный перенос галактозильной группы на лактозу происходит только при

относительно высоких концентрациях лактозы (2÷3 Км, Км~30 мг/мл), а при её низких концентрациях преимущественно происходит гидролиз. Закисление реакционной среды до pH4 не вызывает заметного увеличения уровня трансгликозилирования, которое отмечалось для β-галактозидаз грибного типа, например, из *Aspergillus oryzae*. Можно заключить, что в выбранных условиях основной реакцией является гидролиз. При добавлении в реакционную среду дополнительного акцептора – глицерина, происходит подавление переноса галактозильной группы на субстрат и синтезируется галактозил-глицерин. пНФГ является лучшим донором и акцептором галактозильной группы, чем лактоза, и в реакции расщепления пНФГ с добавлением внешнего акцептора «А» происходит гидролиз (образуется свободная галактоза) и синтез продуктов Гал-пНФГ и Гал-А. Показали, что хорошими акцепторами галактозильной группы являются низшие спирты (метанол, этанол, изопропанол, бутанол), этиленгликоль, глицерин. Фермент сохраняет активность в водноорганических смесях (например, в 55%-ом ацетонитриле), что может быть использовано для подавления гидролитического расщепления пНФГ и синтеза галактозидов с различной агликоновой группой.

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ BA3 ИЗ *THERMUS THERMOPHILUS*, СОПРЯЖЕННОЙ С ОДНОЭЛЕКТРОННЫМ ВОССТАНОВЛЕНИЕМ ИЗ ПОЛНОСТЬЮ ОКИСЛЕННОГО СОСТОЯНИЯ

С.А. Силецкий[1], И.Н. Белевич[3], Н.П. Белевич[3], Т. Сулейман[2], М. Викстром[3]
[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия; [2]Отдел химических наук и Bernal Научно-исследовательский институт, Университет Лимерика, Ирландия [3]Хельсинкская группа биоэнергетики, Институт биотехнологии, Хельсинкский университет, Финляндия

Гем-медные терминальные оксидазы катализируют 4-электронное восстановление кислорода до воды с образованием протон-движущей силы, засчет: a) переноса электронов и субстратных протонов с разных сторон мембраны, и b) редокс-зависимого протонного насоса. Каталитический цикл цитохромоксидазы включает 4 одноэлектронных перехода: OH → EH → R(P) → F → O. В оксидазах канонического семейства A (включая цитохромоксидазу митохондрий) каталитически активное полностью окисленное высоко энергетическое состояние OH самопроизвольно переходит в отрелаксированное состояние O. В отличие от OH, одноэлектронное восстановление состояния O ограничивается переносом электрона через входные редокс-центры (CuA и низко-спиновый гем a), не сопровождается переносом электронов в кислород-редуктазный центр (включающий гем a3 и CuB) и не сопряжено с перекачиванием протонов через мембрану. Изучена быстрая кинетика генерации мембранного потенциала при одноэлектронной инъекции с помощью комплекса трис(бипиридил)рутения в окисленное отрелаксированное состояние O цитохромоксидазы ba3 из *Thermus thermophilus* семейства B, представители которого характеризуются отличиями свойств каталитического центра, протон-проводящими путями и электрогенным механизмом перекачивания протонов от представителей семейства A [1]. Одноэлектронное восстановление отрелаксированного состояния O сопровождается двумя электрогенными компонентами. Быстрая (~ 14 мкс) электрогенная фаза отражает транспорт электронов между CuA и гемом b. Медленная фаза (~ 290 мкс) отражает перераспределение электронов от CuA и гема b в кислород-редуктазный центр на гем a3 и электрогенный перенос протонов из внутренний водной фазы, сопряженно с восстановлением гема a3. Сделан вывод о том, что при одноэлектронном восстановлении отрелаксированного состояния O, ни транслокации перекачиваемого протона, ни восстановления CuB не происходит. Частичный перенос электрона на гем a3 сопровождается переносом субстратного протона [1]. Таким образом, феномен отрелаксированного окисленного состояния O присущ гем-медным оксидазам семейства B.
Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-04-00503).

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ αvβ3-ИНТЕГРИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ВАРИАНТА 10 ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА ЧЕЛОВЕКА III ТИПА (^{10}Fn3)

Л.Н. Шингарова, Л.Е. Петровская, С.Ш.Гапизов, Е.А. Крюкова, Е.Ф. Болдырева, Е.В. Свирщевская, Д.А. Долгих
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Разработка новых лекарственных препаратов направленного действия для терапии хронических воспалительных и онкологических заболеваний является актуальной проблемой биомедицины и биотехнологии. Один из основных медиаторов неоангиогенеза в опухолях и участках воспаления – αvβ3-интегрин представляет собой перспективную мишень для таких препаратов. Ранее на основе 10 домена фибронектина III типа человека (^{10}Fn3) был получен искусственный связывающий белок (JCL), обеспечивающий нейтрализацию αvβ3-интегрина. Одной из основных проблем для терапевтического использования небольших белков является короткий период их полувыведения из организма. Для увеличения времени циркуляции может использоваться конструирование гибридовс альбумин-связывающим доменом (ABD) стрептококкового белка G. В рамках данной работы были получены гибридные белки, состоящие из JCL и варианта ABD с пониженной иммунногенностью (ABD035), в различной ориентации. Между белками-партнерами были помещены глицин-сериновые линкеры различной длины для обеспечения их независимого сворачивания. В белках JCL-L_5-ABD и ABD-L_7-JCL длина линкеров составляла соответственно 5 и 7 аминокислотных остатков, тогда как в JCL-L_{14}-ABD и ABD-L_{15}-JCL - 14 и 15, соответственно. Все варианты экспрессировали в цитоплазме клеток *E. coli* и выделяли из фракции растворимых белков с выходом 15-20 мг/л. Для контроля также был получен в изолированном виде рекомбинантный ABD. Были исследованы связывание гибридных белков с αvβ3-интегрином методом конфокальной микроскопии, их термическая стабильность, фармакокинетика и биораспределение. Фармакокинетические исследования показали, что JCL-L_{14}-ABD циркулирует в крови у мышей примерно в 10 раз дольше, чем ABD-L_{15}-JCL, и в 960 раз дольше, чем JCL. Полученные результаты демонстрируют перспективность использования гибридов с ABD для увеличения времени жизни связывающих белков на основе ^{10}Fn3 и других каркасных белков с небольшой молекулярной массой. *Работа проводилась при финансовой поддержке программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

СРАВНЕНИЕ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ НИКУЮЩЕЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ BspD6I И ЕЕ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ, НЕ СОДЕРЖАЩЕЙ ОСТАТКИ ЦИСТЕИНА

Л.А. Абросимова[1], Р.И. Артюх[2], Т.А. Перевязова[2], А.К. Юнусова[2], З.Ф. Агаева[3], Е.Е. Ларионова[1], Т.С. Орецкая[4], Е.А. Кубарева[4]
[1]Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [2]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино; [3]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; [4]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Объектом исследования является никующая эндонуклеаза (НЭ) BspD6I (Nt.BspD6I) штамма Bacillus species D6. Она узнает последовательность 5'-GAGTC-3'/5'-GACTC-3' в двуцепочечной ДНК, но в отличие от эндонуклеаз рестрикции гидролизует только одну, «верхнюю» цепь ДНК в строго фиксированном месте на расстоянии 4 пар нуклеотидов от участка узнавания к 3'-концу субстрата. НЭ широко применяются для решения биотехнологических задач. Понимание принципов их функционирования является актуальной задачей. Методом РСА ранее была получена кристаллическая структура дикого типа Nt.BspD6I, однако комплекс фермента с ДНК закристаллизовать не удалось. Согласно теоретической модели во взаимодействие с ДНК вовлечены остатки C11 и C160 N-концевого домена белка. Два других остатка Cys расположены в С-концевом каталитическом домене Nt.BspD6I. Для анализа пространственного расположения остатков Cys белка относительно ДНК нами был использован метод «кросслинкинга», основанный на реакции с ДНК-реагентами, содержащими пиридилдитиогруппу в участке узнавания фермента, в позиции гидролиза «верхней» цепи ДНК, а также с дуплексом без участка узнавания. Выход конъюгата составил 10–15% при инкубации Nt.BspD6I со всеми ДНК-дуплексами. Вероятно, остатки Cys вовлечены во взаимодействие с ДНК уже на стадии неспецифического связывания. Для оценки влияния остатков Cys на структуру Nt.BspD6I была получена и закристаллизована безцистеиновая (CF) форма белка. Сравнительный анализ структур нативного и мутантного белков с помощью программы PyMol показал, что замена всех остатков Cys на Ser не влияет на положение полипептидной цепи в пространстве и на распределение зарядов по поверхности белка. Установлено, что степени гидролиза субстрата (30-звенн. ДНК-дуплекса и ДНК фага T7) CF Nt.BspD6I и ферментом дикого типа за 30 мин при 37°C практически одинаковы в диапазоне концентраций KCl от 125 до 200 мМ, при этом удаление всех остатков Cys снижает эффективность комплексообразования белка с ДНК в тех же условиях в 4–5 раз. Таким образом, CF Nt.BspD6I может использоваться в качестве отрицательного контроля в реакции «кросслинкинга». Предполагается, что остатки Cys Nt.BspD6I необходимы для формирования стабильного фермент-субстратного комплекса *in vitro*. *Работа проводилась при поддержке гранта РНФ (№ 18-74-00049).*

ПОЛУЧЕНИЕ МНОГОТОЧЕЧНЫХ ФОРМ TvDAAO ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Д.Л. Атрошенко[1,2], М.Д. Шеломов[1,2], С.С. Савин[1,3], В.И. Тишков[1,2,3]
[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» им. М.В. Ломоносова; [3]ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Оксидаза D-аминокислот (DAAO) является ферментом, нашедшим применение в различных областях биотехнологии. DAAO катализирует превращением D-аминокислот в соответствующие α-кетокислоты с образованием пероксида водорода и иона аммония. DAAO используется в медицинской диагностике, в тонком органическом синтезе, однако основным процессом с использованием DAAO является получение 7 аминоцефалоспорановой кислоты (7-АЦК) из цефалоспорина С, а 7-АЦК является основным синтоном при получении цефалоспориновых антибиотиков различных поколений. Наиболее подходящей DAAO для получения 7-АЦК является фермент из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO). TvDAAO обладает наибольшей температурной стабильностью и лучшими каталитическими параметрами в реакции окисления цефалоспорина С среди известных DAAO, однако необходимо дальнейшие улучшение свойств. В случае TvDAAO необходимо улучшать: температурную стабильность для упрощения процесса очистки и возможности использования фермента при повышенных температурах, стабильность против инактивации пероксида водорода, поскольку H_2O_2 – продукт ферментативной реакции, окисляет TvDAAO. Также для снижения стоимости TvDAAO в общей стоимости процесса необходимо улучшить каталитические свойства фермента. В нашей лаборатории для направленного изменения свойств ферментов мы используем метод рационального дизайна. За время изучения TvDAAO были получено множество мутантных форм TvDAAO с единичными аминокислотными заменами с улучшенными свойствами. В данной работе эти точечные замены были объединены с целью получения многоточечной мутантной TvDAAO перспективной для использования при производстве 7 АЦК. В результате были получены мутантные TvDAAO обладающие в 10–30 раз более высокой температурной стабильностью, в 6–10 раз более высокой стабильностью к действию пероксида водорода и в 3–4 раза более высокими значениями каталитических констант или каталитической эффективности в реакции окисления цефалоспорина С. *Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 18-34-00594-мол_а*)

ДВА ПОДХОДА К СТАБИЛИЗАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Д.Л. Грановский, Е.М. Рябчевская, Е.А. Евтушенко, О.А. Кондакова, П.А. Иванов, Н.А. Никитин, О.В. Карпова
Кафедра вирусологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Сибирская язва – острое инфекционное заболевание, вызываемое бактерией *Bacillus anthracis*, являющейся одним из наиболее вероятных потенциальных агентов биотерроризма. Современные вакцины против сибирской язвы обладают рядом недостатков, в связи с чем весьма актуальна разработка новой низкореактогенной и безопасной рекомбинантной вакцины. Основным антигеном сибирской язвы, на который вырабатываются антитела, обеспечивающие защиту против инфекции, является протективный антиген (PA), при этом ключевую роль играет IV домен белка. Наиболее перспективным при разработке нового поколения вакцин считается использование полноразмерного рекомбинантного PA (rPA), который нестабилен: может подвергаться протеолизу и терять протективные свойства в результате дезаминирования ряда аминокислотных остатков. В

настоящей работе предлагается два подхода к решению проблемы нестабильности rPA. Первым является адсорбция полноразмерного rPA на поверхности полученных ранее в нашей лаборатории сферических частиц (СЧ), образующихся при термической обработке вируса табачной мозаики. СЧ способны адсорбировать на своей поверхности чужеродный антиген, биодеградируемы, безопасны и обладают адъювантными свойствами. Показано сохранение антигенной специфичности rPA при адсорбции на поверхности СЧ. Продемонстрировано, что образование комплекса СЧ-rPA приводит к стабилизации rPA в различных условиях. Вторым подходом является использование в вакцинных препаратах рекомбинантного белка с заменами подверженных спонтанному дезаминированию аминокислотных остатков, что по литературным данным приводит к стабилизации белка. В рамках реализации данного подхода был спроектирован, экспрессирован, выделен и очищен белок, содержащий III и IV домены PA с заменами Asn713 и Asn719 на Gln713 и Gln719 (rPA3,4). Было продемонстрировано, что полученный rPA3,4 узнается антителами к полноразмерному rPA. В дальнейшем планируется получить рекомбинантный белок, содержащий все четыре домена PA, с аминокислотными заменами, приводящими к увеличению стабильности. Таким образом, оба предложенных в настоящей работе подхода к стабилизации rPA представляются весьма перспективными для разработки нового поколения вакцин против сибирской язвы, а также существует возможность их комбинирования. *Работа поддержана грантом РНФ №18-14-00044.*

ИЗУЧЕНИЕ АДЪЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ С РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ СИММЕТРИИ

Е.А. Евтушенко, Е.М. Рябчевская, Т.И. Манухова, Н.А. Никитин, О.В. Карпова
Кафедра вирусологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Борьба с инфекционными заболеваниями – важная проблема человечества. Вакцинация является одним из наиболее действенных методов контроля распространения патогенов. Для повышения иммуностимулирующих свойств вакцин применяют адъюванты, представляющие собой компоненты вакцин, способные усиливать гуморальный и/или клеточный иммунный ответ на вакцинные антигены. Поиск новых безопасных и эффективных адъювантов, активирующих различные типы иммунного ответа – крайне актуальная проблема вакцинологии. Перспективным направлением при разработке адъювантов нового поколения является создание адьювантов на основе вирусов растений, которые биологически безопасны для млекопитающих, в частности для человека. Настоящее исследование посвящено сравнению адъювантных свойств вирионов вирусов растений с различной симметрией капсида, икосаэдрической и спиральной. Проведено сравнительное исследование адъювантных свойств вируса табачной мозаики (ВТМ), палочковидного вируса со спиральной структурой, и вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК), имеющего икосаэдрический капсид. В качестве модельного антигена был выбран овальбумин. Адъювантные свойства ВТМ и ВМЦК были сопоставлены с иммуностимулирующими свойствами сферических частиц (СЧ), полученных при термической обработке ВТМ. Для СЧ ранее мы показали наличие эффективных адъювантных свойств, кроме того, на основе СЧ была получена кандидатная вакцина против вируса краснухи [1]. В настоящей работе была проведена иммунизация лабораторных животных и проанализированы титры антител к овальбумину и к используемым адъювантам. Во всех случаях, когда лабораторных животных иммунизировали композициями модельного антигена с адъювантом на основе вируса растений, иммунный ответ на овальбумин повышался от 3 до 6 раз по сравнению с иммунизацией индивидуальным овальбумином. *Работа поддержана грантом Президента РФ № 075-15-2019-188.*

1. Trifonova E.A., Zenin V.A., Nikitin N.A., Yurkova M.S., Ryabchevskaya E.M., Putlyaev E.V., Donchenko E.K., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // Antiviral Research. 2017. V. 144. P. 27-33.

ГЕНЫ СЕМЕЙСТВА WOX В СОМАТИЧЕСКОМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ У *MEDICAGO TRUNCATULA*

Е.Ю. Красноперова, В.Е. Творогова, Л.А. Лутова
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Соматический эмбриогенез - один из способов регенерации растений, широко используемый в биотехнологии при трансформации растений. В ходе этого процесса задействуются те же гены, что и при развитии растения из зародыша, полученного генеративным путём. Важными регуляторами развития растений, в том числе соматического и зиготического эмбриогенеза, являются гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы семейства WOX. Ранее нами было показано участие гена MtWOX9-1 *Medicago truncatula* в соматическом эмбриогенезе: его сверхэкспрессия приводит к значительному увеличению эмбриогенности каллуса и к изменениям уровней экспрессии ряда генов, участвующих в соматическом эмбриогенезе. Цель исследования - изучение взаимодействия продуктов гена MtWOX9-1 с другими генами, ассоциированными с соматическим эмбриогенезом. Экспрессию генов семейства WOX могут регулировать пептидные гормоны из семейства CLE с помощью систем положительной или отрицательной обратной связи. Мы предположили, что гены CLE6 и CLE18, в свою очередь, могут также являться мишенями транскрипционного фактора MtWOX9-1,поскольку по результатам транскриптомного анализа сверхэкспрессия MtWOX9-1 влияет на экспрессию этих генов. Для проверки этой гипотезы мы используем метод EMSA. Для уточнения полученных данных, а также для выявления других мишеней MtWOX9-1, мы планируем использовать метод ChIP, позволяющий напрямую выявить в геномной ДНК места связывания этого транскрипционного фактора. Кроме того, мы ведем поиск других участников соматического эмбриогенеза среди генов семейства WOX. Нами были найдены новые гены семейства и выявлены их предполагаемые филогенетические связи. Мы собираемся исследовать их экспрессию в ходе соматического эмбриогенеза.

КЛЮЧЕВЫЕ ФЕРМЕНТЫ ФЕНОЛОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСА АЗОСПИРИЛЛ В БИОДЕКОЛОРИЗАЦИИ ТРИФЕНИЛМЕТАНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

М.А. Купряшина, Е.Г. Пономарева, О.А. Милова, В.Е. Никитина
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

В последние годы в связи с быстрым ростом индустриализации и катастрофическими масштабами загрязнения окружающей среды особое внимание уделяется биоредукции красителей-поллютантов. Тем не менее, остается много нерешенных вопросов, касающихся выбора биообъекта, подбора условий, сокращения времени и ресурсов, затраченных на процесс деградации. Показано участие ферментов фенолоксидазного комплекса грибов в деградации красителей, однако работы по исследованию способности бактерий к энзиматической детоксикации и утилизации синтетических красителей крайне малочисленны. Ранее нами была продемонстрирована продукция фенолокисляющих ферментов бактериями рода Azospirillum. В рамках данного исследования были оптимизированы условия выделения и очистки внеклеточных Mn-пероксидазы и лакказы *Azospirillum brasilense*, и получены гомогенные препараты белков. В экспериментах по биодеградации в качестве модельного красителя трифенилметаного ряда был выбран малахитовый зеленый (МЗ). МЗ обладает выраженными канцерогенными и тератогенными свойствами и запрещен к применению во многих странах, в России использование данного красителя разрешено. В результате исследований выявлена биодеградация высоких концентраций малахитового зеленого (1 мМ) с использованием препаратов фенолоксидаз азоспирилл, что позволяет сократить срок 100% деструкции красителя до 3 часов, по сравнению с биодеколоризацией МЗ бесклеточными экстрактами. С помощью методов УФ-видимой спектроскопии, ТСХ, ВЭЖХ и ИК-спектроскопии подтверждена деструкция молекулы красителя. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-316-00008 мол_а.*

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА СТРУКТУРУ И СВОЙСТВА БЕЛОК-ПОЛИСАХАРИДНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ

А.О. Макарова[1], О.С. Зуева[2], Ю.Ф. Зуев[1]
[1]Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН; [2]Казанский государственный энергетический университет, Казань, Россия

Нанокомпозитные гидрогели широко используются в регенеративной медицине и фармакологии. По сравнению с обычными полимерными гидрогелями нанокомпозитные гидрогели обладают улучшенными физико-химическими, механическими и электрическими свойствами. По объему исследований и практическому использованию углеродным нанотрубкам (УНТ) принадлежит лидирующее положение среди наноматериалов. Во многом это обусловлено относительной легкостью получения нанотрубок, воспроизводимостью свойств и возможностью варьирования в широких пределах их содержания. В то же время остается открытым вопрос о токсичности УНТ из-за их способности воздействовать на субклеточные и клеточные структуры и в целом на органы и ткани живых организмов.

Целью работы являлось исследование электропроводности, механических свойств, структуры и токсичности гидрогелей на основе природных биополимеров (желатин и к-каррагинан) в присутствии УНТ. Было установлено, что при добавлении УНТ к гидрогелям удельная электропроводность, демонстрирующая характерную сигмоидальную зависимость, указывающую на температурный переход «золь-гель», может увеличиваться. В присутствии УНТ существенно изменялись морфология и реологические свойства гидрогелей. Токсичность гелей оценивали в МТТ-тесте по отношению к клеткам HeLa. Исходный гель обладал невыраженной токсичностью. Показано, что при добавлении УНТ в образец цитотоксичность увеличилась в незначительной степени. На основании экспериментальных данных делается попытка прогнозирования электропроводящих и механических свойств гидрогелей в зависимости от их состава. Оценена токсичность исследуемых систем. Полученные результаты могут служить фундаментальной базой для создания систем под задачи доставки лекарств и регенеративной медицины. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта № 18-415-160011. Изучение образцов с помощью электронной микроскопии выполняли в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» Казанского (Приволжского) федерального университета.*

ВИРУСЫ РАСТЕНИЙ КАК ИНСТРУМЕНТ СОЗДАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСА

Е.М. Рябчевская, Е.А. Евтушенко, О.А. Кондакова, М.В. Архипенко, Е.В. Скурат, П.А. Иванов, Н.А. Никитин, О.В. Карпова
Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Ротавирусная инфекция является одной из основных причин вирусного гастроэнтерита у детей. Существующие аттенуированные вакцины имеют ряд серьезных недостатков. Задача создания рекомбинантной вакцины против ротавируса (РВ) является весьма актуальной. Одной из проблем разработки новых вакцин является большое серологическое разнообразие штаммов РВ. Основные антигены РВ: VP6, VP7, VP5* и VP8*. Вирусы растений имеют большой потенциал для создания инновационных вакцин, они абсолютно безопасны для человека, обладают высокими иммуностимулирующими свойствами и могут выступать в роли носителя эпитопов. В настоящей работе были использованы два растительных вируса: вирус мозаики альтернантеры (ВМАльт) и вирус табачной мозаики (ВТМ). Белок оболочки (БО) ВМАльт был применен в качестве носителя для эпитопа белка VP6 (RLSFQLMRPPNMTP), который способен активировать эффективный протективный иммунный ответ. В результате слияния эпитопа VP6 с БО ВМАльт был получен химерный рекомбинантный белок ER6. Ещё один антиген – (ep8,7)x6 – был сконструирован путем 6-ти кратного повтора эпитопа белка VP8* (MASLIYRQLL), который способен индуцировать выработку высоких титров вируснейтрализующих антител у лабораторных животных, и эпитопа белка VP7 (MKYDQNLELDM). Дополнил набор антигенов белок (ep5)x12, представляющий собой двенадцать тандемных повторов эпи-

топа белка VP5* (KAANYQYNYLRDGEQVTA). Антитела к выбранным участкам VP5* и VP7 способны активировать гетеротипический иммунный ответ. Все выбранные эпитопы консервативны для штаммов РВ группы А, которые обуславливают большинство случаев ротавируса у людей. Сферические частицы (СЧ), получающиеся при термической обработке ВТМ были использованы в качестве адъюванта и носителя для презентации набора антигенов РВ. Для каждого из антигенов ER6, (ep8,7)x6 и (ep5)x12 продемонстрировано, что они эффективно сорбируются на поверхности СЧ и при этом сохраняют свою антигенную специфичность. Изучена возможность совместной сорбции представленных антигенов на поверхности СЧ. Учитывая уникальные адъювантные свойства СЧ и консервативность выбранных эпитопов смесь комплексов СЧ-ER6, СЧ-(ep8,7)x6 и СЧ-(ep5)x12 может служить перспективной основой для рекомбинантной вакцины против ротавируса. *Работа частично поддержана грантом РФФИ 18-34-00006мол_а и АО «Нацимбио».*

ВЛИЯНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ *RHODOCOCCUS QINGSHENGII* S10, НА ВЫВЕТРЕЛЫЕ СЕРПЕНТИНИТЫ

И.В. Хиляс[1], А.В. Сорокина[1], Т.А. Щербакова[2], М.Р. Шарипова[1]
[1]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии; [2]Центральный научно-исследовательский институт геологии нерудных полезных ископаемых, Казань, Россия

Микробные сообщества, колонизирующие минеральные поверхности, представляют значительный эволюционный и экологический интерес. Минеральные поверхности представляют собой экстримальные экониши, имеющие микробиоценоз, на который влияет большое количество внешних факторов, таких как температура, свет, соленость, высокий pH, дефицит и недоступность питательных веществ. Связанные с минералами микроорганизмы вносят существенный вклад в геомикробиологические процессы, включая образование минералов, растворение или разрушение. Микроорганизмы изменяют породы и минералы в результате биохимической активности. Бактерии способны продуцировать широкий спектр биологически-активных соединений, включая пептиды, синтезируемые мультифункциональными нерибосомальными пептидными синтетазами (NRPS) и поликетидными синтетазами (PKS). Среди разнообразных микробных пептидов, соединения обладающие железосвязывающей активностью (сидерофоры) представляют наибольший интерес. Сидерофоры – секретируемые низкомолекулярные соединения с высокой степенью аффинность к Fe(III). Бактерии, относящиеся к роду Rhodococcus способны продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов, включая два вида сидерофоров: гетеробактин А и родобактин. Целью данной работы явилось идентифицировать разнообразие биосинтетических генных кластеров, вовлечённых в синтез вторичных биологически-активных метаболитов. С помощью программного обеспечения antiSMASH в геноме *R. qingshengii* S10 были идентифицированы 22 биосинтетических генных кластера, среди которых найдены одна PKS-синтетаза и 10 NRPS-синтетаз. Два NRPS кластера *R. qingshengii* S10 имеют высокий уровень гомологии к кластерам, вовлечённым в биосинтез известных сидерофоров у родококков. Один кластер имеет 100% гомологию к генному кластеру гетеробактина *R. qingshengii* BKS 20-40, Rhodococcus sp. ADH, R. erythropolis SK 121; второй кластер имеет 50% гомологию к генному кластеру, ответственному за синтез альбахелина, *R. qingshengii* BKS 20-40, *R. erythropolis* CCM2595. У пяти кластеров не было выявлено никакой гомологии с известными бактериальными NRPS кластерами. Мы также провели эксперименты по изучению влияния метаболитов, секретируемых в железо-дефицитных условиях *R. qingshengii* S10, на выветрелые серпентиниты. Однако, обработка минерала очищенными метаболитами показала отсутсвие влияния метаболитов на его структуру и химический состав. Таким образом, продуцируемые *R. qingshengii* S10 сидерофоры не оказывают влияния на процессы растворения, трансформации или образования новых форм минералов из породы выветрелых серпентинитов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-74-00062.

ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*

М.Д. Шеломов[1,2], Д.Л. Атрошенко[1,2], М.А. Эльдаров[2,3], С.С. Савин[1,2], Т.А. Чубарь[1,2], В.И. Тишков[1,2,3]
[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; [3]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3) катализирует реакцию окисления D-аминокислот с помощью молекулярного кислорода с образованием соответствующих α-кетокислот, пероксида водорода и иона аммония. Ген данного фермента был обнаружен в большом количестве различных организмов, от дрожжей до человека. Считается, что основная функция DAAO в микроорганизмах – это включение D-аминокислот в метаболизм клетки в качестве источника азота. В многоклеточных организмах данный фермент чаще всего выполняет регуляторную и защитную функции. Также данный фермент широко используется в различных областях биотехнологии и медицинской диагностики. Поэтому для эффективного применения DAAO на практике необходимы оксидазы D-аминокислот с определенными параметрами (субстратная специфичность, pH оптимум активности и т. д.). Также очень актуальным является систематическое изучение физиологической роли фермента в организме. В результате анализа генома метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* были обнаружены четыре гена, предположительно кодирующие D-аспартат оксидазу и три DAAO. Целью нашей работы было клонирование гена одного из ферментов (OpaDAAO2) в *E. coli*, экспрессия, получение рекомбинантного фермента и изучение его свойств. Ген OpaDAAO2 было получен с хромосомной ДНК с помощью ПЦР и клонирован в плазмиду серии pET. Далее была проведена экспрессия гена фермента в клетках *E. coli*, проведены выделение и очистка хроматографическими методами. Определены pH- и температурная стабильности, pH-профиль активности, также были определены каталитические параметры OpaDAAO2 с набором D-аминокислот и цефалоспорином C. Показано, что фермент имеет необычный профиль активности.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №17-04-01487).

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ
Устные доклады

ЛОГИСТИКА АПОПТОТИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ РАСТЕНИЙ

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

Программированная клеточная смерть растений, как и животных, осуществляется с участием протеолитических ферментов, обладающих редко встречающейся аспартатной специфичностью гидролиза. У растений таким ферментом является фитаспаза. Фитаспаза относится к семейству субтилизин-подобных (серин-зависимых) протеаз растений и структурно сильно отличается от цистеин-зависимых апоптотических протеаз (каспаз) животных. Различие в структуре апоптотических протеаз животных и растений определяют принципиальные отличия в стратегии их участия в процессе клеточной смерти. Так, фитаспаза синтезируется в виде неактивного белка-предшественника, который автокаталитически и конститутивно процессируется с образованием активного фермента. Благодаря наличию сигнального пептида в молекуле белка-предшественника, активная фитаспаза секретируется в межклеточную жидкость (апопласт) с помощью канонического пути, который может быть блокирован обработкой брефелдином А. При различный стрессовых воздействиях, индуцирующих клеточную смерть, фитаспаза возвращается из апопласта внутрь клетки и получает возможность гидролизовать внутриклеточные белки. Механизм этого ретроградного транспорта фитаспазы долгое время оставался загадочным. Мы обнаружили, что возвращение фитаспазы в клетки листьев растения *Nicotiana benthamiana* происходит с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза, и интернализованная фитаспаза может быть выявлена в клетке внутри мембранных везикул. Эндоцитоз фитаспазы специфичен, что подразумевает наличие рецептора для фитаспазы на плазматической мембране растительной клетки. Возвратившаяся в клетку фитаспаза сохраняет свою протеолитическую активность. Блокирование клатрин-зависимого эндоцитоза с помощью продукции белка Hub (фрагмента тяжелой цепи клатрина) предотвращает стресс-индуцированное возвращение фитаспазы и появление ее активности внутри клетки. Существенно, что ингибирование клатрин-зависимого эндоцитоза также предотвращает стресс-индуцированную гибель растительной клетки. Мы полагаем, что обнаруженный нами ретроградный транспортный путь, индуцируемый стрессом и использующий клатрин-зависимый эндоцитоз, может оказаться характерным не только для фитаспазы, но и для более широкого круга апопластных ферментов растений. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-14-00010.*

ФИТОГОРМОНЫ И АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В РАЗВИТИИ СИМБИОТИЧЕСКИХ КЛУБЕНЬКОВ БОБОВЫХ

В.Е. Цыганов[1,2], Т.А. Серова[1], А.П. Горшков[1], П.Г. Кусакин[1], А.Б. Китаева[1], А.В. Цыганова[1]
Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; Санкт-Петербургский научный центр РАН, Санкт-Петербург, Россия

Фитогормональная регуляция и активные формы кислорода в развитии симбиотических клубеньков Бобовых активно изучаются в настоящее время. Для выявления роли цитокининов нами была проведена иммунолокализация транс-зеатина-рибозида и изопентениладенина в клубеньках гороха дикого типа и мутантов, блокированных на различных стадиях развития. В клубеньках дикого типа цитокинины были выявлены в меристеме, зоне инфекции и апикальной части зоны азотфиксации. У мутанта sym33-3, дефектного по транскрипционному фактору (ТФ) IPD3/CYCLOPS, с нарушениями выхода бактерий, а также последующей дифференцировки клубенька, цитокинины в основном локализовались в меристеме. У мутанта sym40, дефектного по ТФ EFD, цитокинины были выявлены в зоне инфекции, но в отличие от дикого типа они отсутствовали в гипертрофированных инфекционных каплях, характерных для данного мутанта. Предположено, что аккумуляция цитокининов на поздних стадиях развития клубеньков гороха ассоциирована с проникновением бактерий в растительные клетки и последующей дифференцировкой растительных клеток и бактероидов. Для изучения фитогормональной регуляции старения клубеньков была проведена иммунолокализация биоактивной формы гиббереллинов и предшественника этилена, 1–аминоциклопропан–1–карбоновой кислоты (АЦК). Было показано снижение содержания гиббереллинов и повышение содержания АЦК при старении клубеньков гороха дикого типа и неэффективных мутантов. С увеличением возраста клубеньков у всех генотипов наблюдалось повышение уровня транскриптов генов АЦК синтетазы и оксидазы (PsACS2, PsACO1) и гиббереллин 2-β-оксидазы (PsGA2ox1), причем у всех мутантов оно индуцировалось раньше, чем у дикого типа. Таким образом, показана позитивная регуляция старения симбиотического клубенька гороха этиленом и негативная – гиббереллинами. Для выявления роли активных форм кислорода в развитии симбиотических клубеньков был проведен цитохимический анализ распределения пероксида водорода в клубеньках гороха дикого типа, а также неэффективных мутантах. В клубеньках дикого типа пергидроксид церия наблюдался в клеточных стенках, стенках и матриксе зрелых инфекционных нитей. Проведенный анализ позволяет предположить, что пероксид водорода участвует в развитии инфекционной нити и дифференцировке бактероидов. *Работа поддержана РНФ 17-76-30016.*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ N6-БЕНЗИЛАДЕНИНА С ИНДИВИДУАЛЬНЫМИ ЦИТОКИНИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ: НА ПУТИ СОЗДАНИЯ РЕЦЕПТОР-СПЕЦИФИЧНЫХ ЦИТОКИНИНОВ

Е.М. Савельева[1], В.Е. Ословский[2], И.А. Гетман[1], С.Н. Михайлов[2], Г.А. Романов[1]
[1]Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; [2]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Цитокинины относятся к одному из важнейших классов фитогормонов, влияющих на многие стороны метаболизма клеток растений. Действие цитокининов в растительной клетке основано на их взаимодействии с цитокининовыми рецепторами. Рецепторы цитокининов представляют собой мультидоменные трансмембранные белки с активностью гистидинкиназ. Они

обычно присутствуют в растении в виде семейства из нескольких близких по структуре изоформ, обладающих разной локализацией и лигандной специфичностью. Такие свойства рецепторов делают принципиально возможным создание регуляторов роста растений с избирательным действием на отдельные органы. Но для этого необходимо детальное понимание структурных основ лигандной специфичности рецепторов. К настоящему моменту классический метод определения структуры белка − рентгеноструктурный анализ его кристалла − не доступен для рецепторов цитокининов из-за технической сложности их кристаллизации. Однако расширение данных о лиганд-рецепторных взаимодействиях за счёт исследования искусственных цитокинин-подобных соединений, а также использование ряда биоинформатических подходов способны раскрыть молекулярные основы, обеспечивающие функциональные различия цитокининовых рецепторов. Мы провели скрининг широкого ряда синтетических производных на основе природного цитокинина N6-бензиладенина, исследуя их взаимодействие с индивидуальными цитокининовыми рецепторами *in vivo* и *in vitro*. В результате мы выявили новые особенности структуры цитокининов, влияющие на параметры лиганд-рецепторных взаимодействий. Также были обнаружены соединения, обладающие избирательной активностью по отношению к отдельным изоформам рецепторов. Поиск новых цитокининов с уникальными свойствами продолжается. *Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №№ 17-04-00969,16-04-01594, 17-04-01939.*

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ФЛАВОНОИДОВ И АЛКАЛОИДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА МОДЕЛЬНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ И ВСТРОЕННЫЕ В НИХ ИОННЫЕ КАНАЛЫ

О.С. Остроумова, А.А. Захарова, С.С. Ефимова
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Работа посвящена систематическому изучению действия ряда флавоноидов и алкалоидов на свойства модельных липидных мембран и реконструированных в них ионных каналов, формируемых антимикробными агентами. Для выполнения экспериментальных исследований использованы модельные липидные мембраны, плоские липидные бислои и моноламеллярные липосомы. Для оценки изменения в распределении электрического поля на границе мембраны при введении тестируемых соединений применена техника регистрации токов, протекающих через плоские липидные бислои в присутствии ионофоров. Для описания влияния флавоноидов и алкалоидов на фазовые переходы мембранообразующих липидов использована дифференциальная сканирующая микрокалориметрия. Дополнительно проведена флуориметрия индуцированной тестируемыми соединениями утечки флуорофора из липидных везикул. Для изучения действия соединений растительного происхождения на функционирование ионных каналов применены методы инкорпорирования антимикробных агентов в плоские липидные бислои и проведены измерения токов проводимости при фиксации трансмембранного напряжения. Установлено, что среди флавоноидов, не только дигидрохалконы (флоретин и флорицин), как считалось ранее, но и халконы (бутеин, ликохалкон А и кардамонин), флавонолы (мирицетин и кверцетин), изофлавоны (генистеин и биоханин А), а также флаваноны (ликуритигенин и нарингенин) вызывают значительное (более 50 мВ) падение неэкранируемого скачка граничного потенциала мембраны. Аналогичным эффектом характеризуются некоторые алкалоиды, в частности, капсаицин и пиперин. Способность разобщать мембранные липиды, выраженная в снижении температуры и кооперативности главного фазового перехода мембранообразующих липидов, а также индуцируемой соединением утечке кальцеина из липосом, обнаружена у 4'-гидроксихалкона, бутеина, кардамонина и ликохалкона, капсаицина, пиперина, сангвинарина, берберина и хинина. Проведен детальный анализ связей между структурой модифицирующих агентов и величинами изменения физико-химических характеристик мембран. Продемонстрировано, что влияние тестируемых соединений на ионные каналы, формируемые противогрибковыми липопептидами и полиеновыми макролидами, опосредовано модификацией свойств липидного матрикса. *Работа поддержана грантом РФФИ (№18-34-20047).*

ПОИСК ГЕНОВ УГЛЕВОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОТВЕТОМ НА ХОЛОДОВЫЙ СТРЕСС У КАРТОФЕЛЯ

М.А. Слугина, Е.З. Кочиева, А.В. Щенникова
Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Solanum секц. Petota включает более 100 видов картофеля, характеризующихся различиями в морфологии, биохимии и физиологии. Культивируемый вид *Solanum tuberosum* чувствителен к низким температурам, в то время как многие дикорастущие клубнеобразующие виды картофеля произрастают в условиях пониженных температур. Это делает виды секции перспективной моделью для изучения механизмов ответа на холодовый стресс. Показано, что первичные существенные нарушения гомеостаза при охлаждении затрагивают углеводный метаболизм.

В данной работе изучена зависимость изменений углеводного состава листьев различных дикорастущих и культивируемых видов картофеля от активности генов углеводного метаболизма в ответ на воздействие пониженной температуры. Было измерено содержание крахмала в листьях у *S. tuberosum* сорт Red Scarlet и дикорастущих видов *S. demissum, S. kurtizanum, S. vernei, S. chacoense* и *S. stoloniferum* до и после холодового стресса. При нормальных условиях максимальное количество крахмала детектировано в листьях сорта Red Scarlet, а минимальное – у *S. chacoense*. После 4 дней инкубации при +4°C в листьях сорта Red Scarlet и видов *S. demissum, S. chacoense* и *S. stoloniferum* произошел полный распад крахмала с одновременным накоплением редуцирующих сахаров; у S. kurtizanum и S. vernei остались следовые количества крахмала. Биохимический анализ сопровождался изучением экспрессии ключевых генов метаболизма крахмала (крахмал-фосфорилазы PHO1a, грануло-связанной крахмалсинтазы GBSS, α-гликан-H2O-дикиназы GWD) и сахаров (сахарозосинтазы SUS4, вакуолярной инвертазы PAIN-1), а также генов ингибиторов апопластной INH1 и вакуолярной INH2 инвертаз и амилаз SBAI. Только для PHO1a и INH1 динамика экспрессии в ответ на холодовый стресс была одинакова у всех образцов картофеля. Падение экспрессии PHO1a указывает на существенную роль фосфоролиза в наблюдаемом распаде крахмала. Рост экспрессии INH1 предполагает, что

важным механизмом ответа на стресс является сохранение сахарозы в апопласте за счет подавления активности инвертаз ингибитором. Таким образом, гены PHO1a и INH1в являются кандидатами на роль основных регуляторов ответа на холодовый стресс у картофеля. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 17-29-08017 и № 18-016-00108) и Министерства науки и высшего образования РФ.*

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ
Стендовые доклады

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ НА СТАДИИ ДЕГРАДАЦИИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЖЕНЬШЕНЯ

Е.С. Глаголева, Д.В. Кочкин
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Тритерпеновые гликозиды (ТГ) – широко распространенные в растительном мире вторичные метаболиты, многие из которых обладают выраженной биологической активностью. Исследование закономерностей накопления ТГ в культурах клеток высших растений может помочь выяснению особенностей их метаболизма, функциональной значимости для растения, а также имеет большое практическое значение. ТГ растений рода Женьшень (Panax) – гинзенозиды – представлены преимущественно соединениями даммаранового и олеананового ряда. В культурах клеток, как правило, определяют только основные гинзенозиды даммаранового ряда, тогда как из интактных растений к настоящему времени выделено уже несколько сотен разнообразных ТГ. Кроме того, удивительно мало известно о связи накопления отдельных гинзенозидов с ростовыми и физиологическими характеристиками клеток, такими, например, как фаза ростового цикла или жизнеспособность. Мы исследовали накопление ТГ в суспензионной культуре клеток *Panax japonicus* var. repens в течение цикла субкультивирования методом ВЭЖХ, совмещенного с масс-спектрометрией. Этот метод позволил определить содержание порядка 30 гинзенозидов различных структурных групп, включая некоторые минорные гинзенозиды, малонилированные гликозиды и производные олеаноловой кислоты. Было установлено, что к концу цикла субкультивирования в клетках увеличивается содержание гинзенозидов олеананового ряда со свободной C28 карбоксильной группой, преобладающим среди которых являлся зингиброзид R1. Также в конце цикла появлялись частично дегликозилированные гинзенозиды даммаранового ряда (гинзенозиды F2 и Rd2, гипенозид XVII, нотогинзенозид Fe). Накопление этих соединений было строго ассоциировано с наступлением стадии деградации культуры. Вероятно, их образование является результатом ферментативного отщепления сахарного фрагмента гликозил-гидролазами от более гликозилированных предшественников, накопленных клетками в течение ростового цикла, однако это требует дальнейших исследований.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЕ ПРЕДСКАЗАНИЕ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НОВОГО КЛАССА ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ, КОДИРУЕМЫХ ГЕНОМАМИ МНОГИХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА КРЕСТОЦВЕТНЫЕ

Т.Н. Ерохина, Л.В. Самохвалова, Д.Ю. Рязанцев
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Недавно было показано, что первичные транскрипты микроРНК растений могут кодировать небольшие пептиды, названные miPEPs. Кроме того, miPEPs были выявлены у животных и человека. Предполагается, что эти пептиды могут играть роль в регуляции экспрессии генов. Целью нашей работы было биоинформационное исследование пептидов, закодированных консервативными открытыми рамками считывания (ORFs) в геномах растений. Оказалось, что для двудольных растений весьма консервативным является пептид miPEP156, кодируемый 5'-концевой областью РНК pri-miR156a у крестоцветных. Наш биоинформатический анализ показал, что miPEP156 кодируется геномами более чем 20 видов растений семейства Brassicaceae. Мы спрогнозировали физико-химические свойства этих микропептидов, и предположили, что на функциональную активность miPEP-156a могут влиять посттрансляционные модификации. Кроме того, была предсказана третичная и вторичная структура пептида. Наконец, чтобы получить прямые доказательства кодирования miPEP-156a в растениях Brassicaceae, мы провели биоинформатический анализ доступных протеомных и транскриптомных данных для *Arabidopsis thaliana*. Анализ данных, полученных с использованием технологии Next generation sequence (NGS), показал, что РНК pri-miR156a обнаруживаются в составе полисом, изолированных обычными биохимическими методами, а также методом иммунопреципитации с эпитопной меткой рибосомного белка. Таким образом, мы получили первые прямые доказательства того, что РНК pri-miR156 подвергаются трансляции, по крайней мере, у *A. thaliana*. Для подтверждения результатов предсказания мы синтезировали синтетический пептид, идентичный miPEP-156a, и получили моноклональные антитела для прямой идентификации пептида в растениях. Данные экспериментальных исследований будут представлены. Очевидно, что дальнейшая идентификация и функциональный анализ микропротеинов miPEP могут выявить новые скрытые функции предшественников микроРНК, которые ранее рассматривались как некодирующие РНК. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-000174.*

ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ КАК МАРКЕРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА СОИ

Л.Е. Иваченко[1,2], В.А. Кузнецова[2]
[1]Благовещенский государственный педагогический университет; [2]Всероссийский научно-исследовательский институт сои, Благовещенск, Россия

В почвах некоторых районов Амурской области, где выращивается соя, пшеница, гречиха и кукуруза выявлены концентрации тяжелых металлов (ртути, свинца, цинка и меди) близкие к значениям ПДК. Адаптация растений к различным условиям

окружающей среды связана с изменением метаболических процессов с участием ферментных систем. Растительные клетки содержат эндогенную антиоксидантную систему защиты от стресса, включающую ферменты и низкомолекулярные соединения. К антиоксидантным ферментам относятся оксидоредуктазы (каталаза, пероксидаза, полифенолоксидаза, супероксиддисмутаза), которые являются маркерами стрессового состояния растений. Ранее нами установлено, что удельная активность каталаз и пероксидаз культурной и дикорастущей сои, а также набор множественных форм этих ферментов подвергаются значительной изменчивости в зависимости от природно-климатических условий региона и погодных условий вегетационного периода, что способствует формированию устойчивости сои к воздействию окислительного стресса. При действии окислительного стресса адаптивная роль множественных форм оксидоредуктаз неодинакова. Но доказательств дифференцированной экспрессии генов оксидоредуктаз при действии окислительного стресса недостаточно. В связи с этим цель работы – выявить и установить роль оксидоредуктаз сои в условиях окислительного стресса, вызванного действием солей тяжелых металлов. Удельную активность оксидоредуктаз определяли спектрофотометрическим методом, белок – Лоури, множественные формы – электрофорезом, содержание малонового диальдегида – тиобарбитуровой кислотой, тяжелых металлов – вольтамперометрическим методом. В проростках сои, выращенных в течение 5 суток, на растворах солей (ацетат свинца, сульфат кадмия, сульфат цинка и сульфат меди) была выявлена повышенная концентрация Pb^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}. Установлено, что уровень малонового диальдегида в проростках сои повышался, удельная активность оксидоредуктаз изменялась относительно контроля. Отмечено появление новых множественных форм окидоредуктаз, устойчивых к окислительному стрессу, что свидетельствует об экспрессии генов в условиях окислительного стресса. Установлено, что в условиях окислительного стресса происходит образование новых множественных форм оксидоредуктаз.

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКА 16К ТОБРАВИРУСА ПОГРЕМКОВОСТИ ТАБАКА – МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНОГО БЕЛКА, ВЫПОЛНЯЮЩЕГО ВАЖНУЮ РОЛЬ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ВИРУСА И РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА

Н.О. Калинина[1,2], С.С. Макарова[2], А.В. Махотенк [1,2], М.Э. Тальянский[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, Россия

16К тобравируса погремковости табака (ВПТ) – это низкомолекулярный белок, содержащий 141 аминокислотный остаток (а.о.), N-концевая половина которого содержит два цистеин-гистидин богатых мотива (предполагаемые «цинковые пальцы»), тогда как С-концевая половина обогащена положительно заряженными а.о., которые образуют два независимых сигнала ядерной локализации (NLS1 - 75–91 а.о. и NLS2 - 112–128 а.о.), обеспечивающие локализацию белка в ядре (Ghazala et al., 2008). Показано, что белок 16К является супрессором сайленсинга, фактором патогенности и вовлечен в ранее неизвестный защитный механизм, оперирующий в ядре клетки с участием ядерного белка коилина (Shaw et al., 2014). Предсказания структуры с помощью программы FoldIndex, подтвержденные определением спектров кругового дихроизма рекомбинантных полноразмерного белка 16К и мутантов, соответствующих N- и С-концевым половинам белка, свидетельствуют, что N-концевая половина белка является структурированной, тогда как С-концевая половина неупорядоченной. В настоящей работе изучен ряд биохимических свойств белка 16К, а именно его способность к гомологичным и гетерологичным белок-белковым взаимодействиям, РНК-связывающие свойства и определены участки, ответственные за эти активности. В растениях *N. benthamiana*, зараженных ВПТ, белок 16К выявляется в виде стабильного димера. Рекомбинантный белок 16К, наряду с димером, образует тример и тетрамер. Анализ делеционных и точечных мутантов показал, что олигомеризация обеспечивается в основном участком, включающим а.о. с 20 по 40 в составе N-концевой половины белка. Белок 16К обладает РНК-связывающей активностью, причем с большей эффективностью формирует комплексы с оц миРНК, чем с дц миРНК. Эффективность формирования комплексов с малыми РНК выше в буфере, содержащем ионы цинка, чем ионы магния. Основной вклад в формирование комплексов белок 16К-РНК вносят последовательности NLS. Методом Фар-Вестерн блоттинга картированы участки взаимодействия белка 16К и белка телец Кахаля коилина: показано, что в составе белка 16К – это С-концевая половина, включающая последовательности NLS, а в составе коилина - N-концевой домен. *Работа поддержана грантом № 14.W03.31.003 Правительства Российской Федерации.*

КАРТИРОВАНИЕ ПРОТЕОМА СЕМЯН НА ОСНОВЕ BOTTOM-UP СТРАТЕГИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЭЖХ-МС

Е.М. Лукашева[1], М.П. Банкин[2], Т.В. Мамонтова[1], Г.Р. Мавропуло-Столяренко[1], А.А. Царев[1], В. Хёхенвартер[3], Т.В. Гришина[1], Г.Н. Смоликова[2], С.С. Медведев[2], А.А. Фролов[1,3]
[1]Кафедра биохимии и[2]Кафедра физиологии и биохимии растений Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия;[3]Институт биохимии растений, Галле, Германия

Протеом семян является интересным фундаментальным и прикладным объектом исследования, поскольку семена – важный источник пищи для людей и животных. Целью данной работы был анализ функций и локализации белков, выделенных из зародышей гороха (Pisum sativum) с желтыми и зелеными семядолями и из семян рапса (Brassica napus), качество которых было снижено путем длительного хранения или ускоренного старения. Из измельченного, предварительно зафиксированного в жидком азоте, биоматериала (50-150 мг) методом фенольной экстракции был выделен тотальный белок. Для растворения полученного после осаждения ацетоном белка был использован раствор содержащий хоатропные агенты – мочевину и тиомочевину, а также кислотолабильный детергент AALS II, совместимый с LC-MS. Анализ был основан на bottom-up протеомной стратегии. Для этого после измерения концентрации белка были отобраны аликвоты и проведен ограниченный протеолиз трипсином. Триптические гиролизаты были проанализированы с помощью нано-LC-ESI-Q и LIT-Orbitrap-MS в режиме data dependent acquisition (DDA). Обработка полученных масспектрометрических данных была произведена на основе комбинированных баз данных последовательностей поисковым алгоритмом SEQUEST. Было обнаружено более 1900 белков в зародышах

гороха и почти вдвое меньше белков в семенах рапса. Было выявлено 34 функциональные группы белков, различным образом представленных в группах образцов. Аннотация функций и локализации белков была основана на разработанной авторами схеме с использованием инструментария ПО MapMan, LocTree3, базах данных String и KEGG. Было показано, что у зародышей гороха с желтыми семядолями в большем количестве присутствовали белки, связанные с белковым метаболизмом и окислительным катаболизмом, и LEA-белки. У семян рапса после длительного хранения значительно уменьшался пул запасных белков, LEA-белков, а также белков, ответственных за адаптацию к стрессу. Полученные данные позволяют обсуждать роль белков в устойчивости семян гороха и рапса к абиотическим стрессорам. Работа поддержана грантом РНФ №17-16-01042

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ДИВИНИЛЭФИРСИНТАЗ ИЗ РАЗНЫХ ПОДСЕМЕЙСТВ СЕМЕЙСТВА CYP74

Е.О. Смирнова, Е.К. Аскарова, С.С. Горина, Т.М. Ильина, Л.Ш. Мухтарова, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин
Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань

Ферменты CYP74 являются одними из основных компонентов липоксигеназного каскада растений. Результатом функционирования данного каскада реакций является образование соединений, которые получили название оксилипины. Данные соединения помогают растениям в борьбе с биотическими и абиотическими стрессорами, принимают участие в процессах роста и развития растений. К семейству CYP74 относятся четыре группы ферментов: дивинилэфирсинтазы (ДЭС), алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). К настоящему времени ДЭС обнаружены у небольшого числа видов растений. В отличие от остальных ферментов CYP74 активность ДЭС можно наблюдать не только по уменьшению субстрата, но и по увеличению продукта. Их кривая Михаэлиса-Мэнтена выглядит, как когда для ферментов описан аллостерический эффект. Однако для CYP74 данный эффект не описан. И, как правило, данное поведение принимают за наличие артефактов. Никто не анализировал продукты реакции в случае, когда субстрат уменьшается, но дивиниловых эфиров не образуется. В продуктах реакции CYP74 периодически наблюдаются соединения, характерные для разных ветвей липоксигеназного каскада. Для ДЭС таких эффектов описано не было. Объектами данной работы стали ДЭС льна, табака и лютика, которые относятся к трем разным подсемействам: CYP74B, D и Q соответственно. Полученные результаты показали, что фермент CYP74B16 льна-долгунца (LuDES) катализировал превращение 13-гидроперекиси альфа-линоленовой кислоты (13-ГПОТ) в дивиниловый эфир, а 13-гидроперекиси линолевой кислоты (13-ГПОД) - в основном в эпоксиспирт, продукт эпоксиалкогольсинтаз. Подобными свойствами обладает и ДЭС лютика едкого (CYP74Q1, RaDES), которая также как и ДЭС льна является 13-специфичной. Таким образом, данные ферменты обладают ДЭС/ЭАС активностью. ДЭС табака (CYP74D3, NtDES) является 9-специфичным ферментом. При участии данного фермента 9ОД превращается в продукт характерный для 9-специфичных ДЭС. Но в реакциях с 9-ОТ образуются в равных количествах продукты ДЭС и ГПЛ, таким образом, 9-специфичный фермент табака обладает ДЭС/ГПЛ активностью. Таким образом, было показано, что исследуемые ферменты обладали двойной активностью в зависимости от используемого субстрата. *Работа была проведена при поддержке гранта РФФИ 18-34-01012 мол_а.*

ПОИСК СТИМУЛЯТОРОВ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ

В.Е. Творогова, Э.А. Поценковская, А.А. Кудряшов, Е.К. Красноперова, Л.А. Лутова
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Соматический эмбриогенез как способ регенерации растений из соматических тканей лежит в основе множества методик трансформации растений. В связи с этим поиск стимуляторов этого процесса важен для биотехнологии. Целью нашего исследования является поиск таких стимуляторов среди генов семейств WOX и NF-Y, кодирующих транскрипционные факторы, и изучение механизмов их работы на модельном объекте Medicago truncatula. Ранее мы обнаружили, что белок MtWOX9-1 из семейства WOX способен стимулировать соматический эмбриогенез. Анализ транскриптома каллусов со сверхэкспрессией гена MtWOX9-1 позволил нам выявить группы генов, работу которых, предположительно, стимулирует MtWOX9-1. Эти группы включают в себя несколько генов NF-Y, в том числе - MtNF-YB10, гомолог гена LEC1. Также мы выявили несколько других генов NF-Y, активных в ходе соматического эмбриогенеза. Некоторые из кодируемых ими белков способны к взаимодействию с MtNF-YB10. В настоящее время мы получаем растения с потерей функции исследуемых генов с помощью технологии CRISPR для оценки их роли в соматическом эмбриогенезе. *Работа поддержана грантом РНФ 16-16-10011 и грантом РФФИ 17-04-01708.*

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ООМИЦЕТА *PHYTOPHTHORA INFESTANS* MONT. DE BARY: ВЫДЕЛЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

В.О. Цветков[1], В.О. Максутова[1], А.В. Сорокань[2], Л.Г. Яруллина[1,2]
[1]Башкирский государственный университет; [2]Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

Оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary является возбудителем фитофтороза - опаснейшего заболевания картофеля, поражающего практически все части растения. Важная роль в развитии патологического процесса отводится протеолитическим ферментам *P. infestans*. Участие внеклеточных протеиназ имеет различный характер: от разрушения структурных и защитных белков растений до процессинга собственных внеклеточных пептидов, необходимых для развития заболевания. Исследование гидролаз патогенов представляет интерес как с точки зрения познания молекулярных механизмов взаимодействия важнейших компонентов наземных экосистем, так и с позиции поиска эффективных безопасных методов защиты культурных растений. Методом аффинной хроматографии получены препараты протеаз *P. infestans*. Показано присутствие в мицелии че-

тырех изоформ с молекулярными массами от 20 до 80 кДа, из которых три (за исключением высокомолекулярной) присутствуют также в культуральной жидкости. Для исследования температурной стабильности протеаз образцы выдерживали при различной температуре в течение 20 минут. Наибольшая активность проявляется при прогревании до 50 °C. Сравнительный анализ литературных данных позволяет заключить, что протеазы фитофторы проявляют относительно низкую температурную стабильность. Исследованные ферменты проявляют высокую протеолитическую активность при pH 6–9, чуть меньшую – при pH 4–5. Широкий диапазон активности, по-видимому, связан с присутствием в препарате нескольких изоформ с различным pH-оптимумом. Методом электрофореза в горизонтальном градиенте мочевины исследована стабильность одной изоформы. Результаты свидетельствуют о низкой устойчивости белковой молекулы к действию хаотропного агента: денатурация начинается в 1–2 М мочевине, что согласуется с приведенными выше данными о термостабильности. В то же время, следует отметить и крайне низкую кооперативность процесса денатурации (электрофоретическая подвижность плавно понижается при изменении концентрации мочевины от 1 М до 6 М), что может свидетельствовать о деградации молекул до более мелких фрагментов, сохраняющих каталитические и субстрат-связывающие свойства. Низкая стабильность и возможность деградации протеаз являются одной из возможных причин различия количества выявленных изоформ в мицелии и в культуральной жидкости.

ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА *ARTEMISIA ANNUA* L.

А.Г. Шутова[1], С.Н. Шиш[1], П.С. Шабуня[2], С.А. Фатыхова[2], А.В. Башилов[1]
[1]Центральный ботанический сад НАН Беларуси; [2]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Оценен генетический потенциал полыни однолетней в условиях центральной агроклиматической зоны Беларуси. Показано, что в надземной массе изученного таксона накапливается эфирное масло в количестве до 0,35 мл/100 г сухого растительного сырья.

В составе эфирного масла согласно данным, полученным методом газовой хроматографии преобладали изоартемизиякетон (более 50%) и β-селинен, причем содержание изоартемизиякетона несколько увеличивалось к фазе цветения, а содержание β-селинена, напротив, снижалось. Однако эти изменения составляли не более 10%. Также показано присутствие в эфирном масле значительных количеств β-селинена, β-мирцена и камфоры. В составе фенольных соединений преобладают фенольные кислоты, а именно хлорогеновая и изомеры дикофеоилхинной кислоты.

Для растений полыни однолетней, выращенных на опытном участке Отдела биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси, установлено высокое содержание фенольных соединений (гидроксикоричные кислоты – 20,3±1,1, флавоноиды – 4,5±0,1, фенольные соединения – 28,4±2,7 мг/г сухого растительного сырья). При этом методом количественного экстракционно–спектрофотометрического определения суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах растений было показано преимущественное накопление гидроксикоричных кислот в надземной части полыни однолетней.

ГЛИКОБИОЛОГИЯ
Устные доклады

ПАРАДОКСЫ ГЛЮКАНТРАСФЕРАЗ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ДРОЖЖЕЙ: ЭКСПОРТ, ЗАКРЕПЛЕНИЕ, АКТИВНОСТЬ, ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Т.С. Калебина
МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Клеточная стенка (КС) и плазматическая мембрана, разделенные периплазматическим пространством, представляют собой компартменты клетки дрожжей, формирующие в совокупности их клеточную поверхность. КС целиком покрывает дрожжевую клетку и в основном состоит из белков-маннопротеинов (~40%), глюкана (~50%) и хитина (около 5%). Считается, что полисахариды КС дрожжей связаны ковалентными связями в единую сеть. На клеточной поверхности локализуются важные в функциональном отношении белки – глюкантрансферазы, которые участвуют во встраивании новосинтезированных фибрилл глюкана в процессе роста клетки и гидролизуют этот структурный полисахарид при растяжении КС и почковании. Глюкантрансферазы клеточной стенки ограничены в возможности латерального перемещения по ней, однако должны находиться в тесном контакте со своим субстратом – глюканом на протяжении всей жизни клетки и по всей ее поверхности. При этом они проявляют свою активность только там и тогда где и когда это необходимо, поскольку отсутствие контроля за их активностью должно приводить к лизису клеток и их гибели. До настоящего времени остаются малоизученными вопросы экспорта, встраивания и механизмов регуляции активности глюкан-ремоделирующих ферментов клеточной поверхности дрожжей – глюкантрансфераз. В последнее время в литературе накапливаются сведения о том, что некоторые глюкантрансферазы обладают свойствами амилоидных белков. Данные факты позволяют по новому представить процесс встраивания этих ферментов в глюкановый каркас КС, а также предложить способ регуляции их активности, основанный на их способности формировать структуры типа амилоидных. В свою очередь способность глюкантрансфераз клеточной поверхности дрожжей фибриллизоваться и, возможно, индуцировать фибрилизацию других белков, может представлять опасность для высших эукариот, включая человека, клетки которых контактируют с поверхностью дрожжей при использовании этих микроорганизмов в пищевых, биотехнологических и медицинских целях.

ГЛИКОЗИДГИДРОЛАЗЫ: И ЛОМАТЬ, И СТРОИТЬ

А.А. Кульминская
Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

Для улучшения использования возобновляемых ресурсов биомассы в биотопливе/биоэнергетике, текстильной, сельскохозяйственной и пищевой промышленностях, фундаментальные исследования и применение ферментов, получаемых с использованием микрооганизмов, весьма актуальны. Ключевым фактором успеха рынка любой продукции и, в частности, биотехнологической, во всем мире являются эффективные и малозатратные производственные процессы, приводящие к высоким выходам чистых продуктов. Важным инструментом этого процесса является прямое или косвенное использование ферментов, которые катализируют синтез или трансформацию различных веществ. Несмотря на значительный прогресс в химии синтетических углеводов, новые синтетические методы и стратегии по-прежнему востребованы для решения проблем в создании сложных углевод-содержащих молекул. В отличие от химических способов гликозилирования, которые обычно требуют утомительных манипуляций с защитой/снятием защиты для достижения регио- и стереоселективности, ферментативное гликозилирование обычно обеспечивает идеальный контроль аномерной конфигурации C1 атома в молекуле сахара и высокую региоселективность без необходимости защиты химически активных групп. Таким образом, включение ферментативной трансформации в процедуры синтеза углеводов значительно упрощает эти схемы и существенно повышает их общую эффективность. В лаборатории энзимологии ПИЯФ накоплен значительный опыт исследований функционально-структурных аспектов действия конкретных ферментов, необходимых для того, чтобы трансформировать структуру поли- или олигосахаридов, обнаруженных в природе. Мы, в первую очередь, занимаемся углевод-активными ферментами (CAZymes), которые гидролизуют, а в некоторых случаях и синтезируют гликозидные связи. На протяжении ряда лет в лаборатории ведутся структурно-функциональные исследования гликозидгидролаз различных семейств, изучение на молекулярном уровне трансгликозилирующей активности этих ферментов и использование ферментативных реакций для синтеза новых биологически значимых соединений. К настоящему моменту подробно изучены грибные гликозидгидролазы 3-го, 10-го, 16-го, 27-го, 29-го, 32-го и 35-го семейств по классификации CAZy (http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/).

ФУКОИДАНАЗЫ МОРСКОЙ БАКТЕРИИ *WENYINGZHUANGIA FUCANILYTICA* CZ1127

А.О. Зуева, А.С. Сильченко, А.Б. Расин, С.П. Ермакова
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Фукоиданы представляют собой обширный класс биополимеров, состоящих в основном из остатков α-L-фукозы, этерифицированных серной кислотой [1]. Эти полисахариды проявляют широкий спектр биологических активностей, в том числе противоопухолевой, иммуномодулирующей, противовирусной [2]. Вследствие чрезвычайной нерегулярности строения их молекул возникают трудности в установлении взаимосвязи между структурными особенностями фукоиданов и проявляемой ими биологической активностью. Традиционные химические методы исследования структур полисахаридов редко приводят к удовлетворительным результатам при изучении фукоиданов. Использование ферментов – фукоиданаз, позволит установить де-

тальную структуру фукоиданов и выявить закономерности, связанные с их биологическим действием. В качестве инструментов для определения структуры сложных полисахаридов должны быть использованы биохимически охарактеризованные ферменты. На сегодняшний день среди представителей 107 семейства класса гликозидгидролаз охарактеризована только одна фукоиданаза [3]. Целью работы является биохимическое описание четырех новых рекомбинантных фукоиданаз FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4 морской бактерии *Wenyingzhuangia fucanilytica* CZ1127. Гены фукоиданаз были клонированы, рекомбинантные ферменты были продуцированы в клетках *Escherichia coli*. Изучены каталитические свойства полученных фукоиданаз: установлено, что ферменты имели схожие оптимумы каталитической активности, однако проявляли различную субстратную специфичность. Показаны перспективы использования FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4 для изучения структур фукоиданов. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект. № 18-04-00905_а).*

1. Усов, А. И. Фукоиданы – сульфатированные полисахариды бурых водорослей / А. И. Усов и др. // *Успехи химии. – 2009. – №78. – С. 846-862.*
2. Senthilkumar, K. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer / K. Senthilkumar et al. // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2013. – V.60. – P. 366-374.
3. Silchenko, A. S. Expression and biochemical characterization and substrate specificity of the fucoidanase from Formosa algae / A.S. Silchenko et al. // *Glycobiology*. – 2017 – V.27. – №3. – P. 254-263.

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФУКОИДАН-СУЛЬФАТАЗ МОРСКОЙ БАКТЕРИИ *WENYINGZHUANGIA FUCANILYTICA* CZ1127T

А.С. Сильченко, А.Б. Расин, А.О. Зуева, С.П. Ермакова
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Фукоиданы принадлежат семейству сульфатированных гетерополисахаридов, обнаруженных в бурых водорослях. Основным компонентом структуры этих полисахаридов являются остатки сулфатированной a-L-фукозы. Фукоиданы обладают широким спектром биологических активностей, однако определение взаимосвязи между структурой и их биологическим действием затруднено из-за сложного строения этих макромолекул [1]. Ферменты морских организмов, участвующие в катаболизме фукоиданов, являются перспективными инструментами для установления детальной структуры этих полисахаридов. В то же время ферментативная машинерия, участвующая в катаболизме фукоиданов, плохо изучена. На сегодняшний день только несколько ферментов, участвующих в деполимеризации и деацетилировании фукоиданов, были экспрессированы и биохимически охарактеризованы [2–3]. Ферменты, осуществляющие дальнейшие шаги катаболитического процесса, до сих пор не описаны. Сульфатазы играют ключевую роль в катаболизме сульфатированных полисахаридов морского происхождения, однако сведения о фукоидан сульфатазах в литературе ограничены. В качестве объекта для поиска и изучения фукоидан сульфатаз была выбрана морская бактерия *Wenyingzhuangia fucanilytica* CZ1127T. Биоинформационный анализ позволил выявить кластер генов, предположительно, кодирующий ферменты, участвующие в катаболизме фукозосодержащих сульфатированных полисахаридов, включая 6 сульфатаз. Использование разнообразных сульфатированных фукоолигосахаридов позволило установить детальную субстратную специфичность и каталитические особенности некоторых сульфатаз. Полученные результаты дают новые знания о процессе катаболизма фукоидана морскими бактериями и открывают новые возможности в изучении детальных структур этих полисахаридов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 16-14-10131.

1. Li B., Lu F., Wei X., Zhao R. Fucoidan: structure and bioactivity // *Molecules*. 2008. Vol. 13. P. 1671–1695.
2. Kusaykin, M.I.; Silchenko, A.S.; Zakharenko, A.M.; Zvyagintseva, T.N. Fucoidanases // *Glycobiology* 2015. Vol. 26. P. 3–12.
3. Nagao T., Kumabe A., Komatsu F., Yagi H., Suzuki H., Ohshiro T. Gene identification and characterization of fucoidan deacetylase for potential application to fucoidan degradation and diversification // *J. Biosci. Bioeng*. 2017. Vol. 124. P. 277–282.

УЧАСТИЕ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА В РОСТЕ РАСТЯЖЕНИЕМ КЛЕТОК КОРНЯ КУКУРУЗЫ

Л.В. Козлова[1], А.Р. Назипова[1], О.В. Горшков[1], М.В. Агеева[1], Е.В. Энейская[2], А.А. Кульминская[2], Т.А. Горшкова[1]
[1]Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань; [2]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

Ранние этапы развития большинства растительных клеток включают деление, рост растяжением (или расширением) и дифференцировку. Рост растяжением подразумевает многократное увеличение размеров клетки в одном из направлений при незначительном росте в других. Скорость и полярность этого процесса, как принято считать, контролируются свойствами клеточной стенки – прочной, но при этом эластичной клеточной оболочки, состоящей в основном из полисахаридов. Интенсивные модификации состава и архитектуры клеточных стенок предваряют и сопровождают рост растяжением. Однако, механизмы, обеспечивающие этот процесс, исследуются в основном на двудольных растениях, имеющих первый тип клеточной стенки. Злаки, так широко представленные в нашей повседневной жизни, имеют клеточные стенки второго типа, что по большому счету выводит их за рамки современных дискуссий о механизмах роста растяжением. Стадии развития растительных клеток удобно исследовать на корнях, поскольку возраст клеток в них прямо соотносится с расстоянием от кончика корня. Мы провели транскриптомное профилирование в пяти зонах первичного корня проростков кукурузы, не доходя до зоны формирования корневых волосков. Были проанализированы следующие зоны: чехлик, меристема, начало растяжения, активный рост растяжением, окончание роста растяжением. Развитие клеток корня сопровождалось дифференциальной экспрессией множества генов, кодирующих ферменты углеводного метаболизма и в частности – имеющих отношение к клеточной стенке. Подробно была проанализирована дифференциальная экспрессия генов целлюлозо-синтазного комплекса, генов, вовлеченных в

синтез, модификацию и распад глюкуроноарабиноксилана, глюкана со смешанным типом связей, рамногалактуронана I и гомогалактуронана. Динамика экспрессии этих генов была соотнесена с изменениями состава клеточных стенок корней кукурузы, которые были установлены ранее с применением набора биохимических и иммуноцитохимических методов. Активность глюкан-гидролаз, возможно задействованных в модификациях клеточных стенок в ходе роста растяжением, была установлена с применением искусственных субстратов. *Работа выполняется при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда, № проекта 18-14-00168.*

КАПСУЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫХ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *ACINETOBACTER BAUMANNII*: СТРОЕНИЕ И РАСЩЕПЛЕНИЕ ДЕПОЛИМЕРАЗАМИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ

А.А. Касимова, Н.П. Арбатский, Ю.А. Книрель, М.М. Шнайдер, А.В. Попова
Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

Условно-патогенные грамотрицательные бактерии *Acinetobacter baumannii* – один из наиболее распространенных возбудителей внутрибольничных инфекций. Их лечение осложняется способностью бактерий приобретать и накапливать различные механизмы антибиотикоустойчивости, что делает актуальным поиск альтернативных способов борьбы с инфекциями. Ими могут стать фаготерапия, основанная на лизисе бактериальных клеток вирусами бактерий – бактериофагами, и вакцинотерапия с использованием конъюгатных иммунопрепаратов. Клетки *A. baumannii* окружены защитной капсулой, состоящей из капсульного полисахарида (КПС). Широкое структурное разнообразие КПС *A. baumannii* обусловлено вариабельностью генного состава хромосомного локуса, кодирующего ферменты, участвующие в биосинтезе КПС. В настоящей работе изучены КПС семи штаммов *A. baumannii*, выделенных от больных в различных госпиталях. КПС выделяли методом водно-фенольной экстракцией бактериальных клеток по методу Вестфаля и очищали с помощью гель-проникающей хроматографии. Моносахаридный состав КПС определяли анализом ацетатов полиолов методом газожидкостной хроматографии. Строение КПС устанавливали с помощью ЯМР-спектроскопии ^{1}H и ^{13}C с использованием двумерных экспериментов ^{1}H,^{1}H COSY, ^{1}H,^{1}H TOCSY, 1H,1H ROESY, 1H,13C HSQC и ^{1}H,^{13}C HMBC. С целью создания биохимической основы для фаготерапии ацинетобактерных инфекций выяснены механизмы расщепления КПС *A. baumannii* рекомбинантными деполимеразами специфических бактериофагов (КПС штаммов B05 и AbWRMAC3340) или деполимеразами, полученными из профагов, обнаруженных в геномах *A. baumannii* (КПС штаммов AYE, AB5256 и B8300). Олигосахаридные продукты расщепления фракционировали с помощью гель-проникающей хроматографии и исследовали методами масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением и одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии. Все деполимеразы обладали гликозидазной активностью и специфически расщепляли одну из гликозидных связей в повторяющихся звеньях КПС по гидролитическому механизму, давая мономеры и/или олигомеры (димеры или в одном случае тример) повторяющихся звеньев КПС. Полученные олигосахариды могут быть использованы для получения конъюгатных вакцин против ацинетобактерных инфекций.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-04-0125.

ГЛИКОМЕССЕНДЖЕР В КОММУНИКАЦИИ ПАРТНЕРОВ РАСТИТЕЛЬНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ АССОЦИАЦИЙ

Ю.П. Федоненко[1], Е.Н. Сигида[1], С.А. Коннова[1,2]
[1]Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН; [2]Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

Наземные растения на протяжении всего жизненного цикла активно взаимодействуют с ризосферной микрофлорой, представители которой по характеру взаимоотношений с растением-хозяином делятся на патогенные, симбиотические и ассоциативные, причем последние составляют самую многочисленную группу. Локализация гликополимеров на поверхности бактериальной клетки придает им свойства посредников в этих взаимодействиях. Считается, что концепция успешного формирования растительно-микробной ассоциации включает в себя соответствие микропартнера двум основным критериям: активная колонизация и стимуляция роста растений. На первом этапе бактерии, привлекаемые химическими аттрактантами корневых экссудатов как неспецифическими, так и специфическими белковыми и/или углеводными компонентами, движутся к растению. Таксис является первым реальным и легко наблюдаемым этапом формирования симбиоза. На следующих этапах происходит адсорбция, включающая фазы адгезии и заякоривания, а далее – пролиферация бактерий и образование микроколоний и/или биопленок на поверхности корней. В эти процессы вовлечены жгутики, пили, гликополимеры бактерий, а также растительные и бактериальные лектины. Некоторые микроорганизмы, например азоспириллы, продуцируют целлюлозоподобные полимеры, содействующие прочному закреплению бактерий на корневой поверхности. Бактериальные полисахариды, как мембранные, так и экстраклеточные, принимают непосредственное участие на каждом из начальных этапов формирования растительно-микробной ассоциации. В докладе будут суммированы данные исследований, посвященных изучению структуры О-антигенов ассоциативных грамотрицательных бактерий, определяющих специфичность взаимодействия с растением-хозяином.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ, СИНТЕЗ РОДСТВЕННЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ ИЗ ХРЯЩЕВЫХ РЫБ И ИГЛОКОЖИХ

Н.Е. Устюжанина, М.И. Билан, Д.З. Винницкий, П.А. Фомицкая, Е.Ю. Бородина, А.Г. Гербст, А.С. Дмитренок, А.И. Усов, Н.Э. Нифантьев
Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

Гликозаминогликаны (ГАГ) – природные полисахариды, построенные из чередующихся остатков гликозамина и уроновой кислоты. Эти биополимеры входят в состав хрящей, являются компонентами синовиальной жидкости, образуют внеклеточный матрикс, а также в виде гликопротеинов представлены на поверхности большинства эукариотических клеток. Функции ГАГ

разнообразны: помимо структурной функции они играют ключевую роль в процессах клеточного узнавания, адгезии и перемещения клеток, в иммунном ответе, свертывании крови. Гликозаминогликаны внеклеточного матрикса, ранее считавшегося инертной структурой, оказывают большое влияние на пролиферацию клеток и онкогенез, и потому могут стать основой для разработки новых лекарственных средств для лечения онкологических заболеваний.

Нами было проведено комплексное исследование гликозаминогликанов из хрящевых рыб и иглокожих, которое включало выделение и структурную характеристику полисахаридов, направленный синтез олигосахаридов, родственных этим биополимерам, конформационный анализ и исследование биологической активности полученных соединений. Из хрящей рыб были выделены линейные ГАГ хондроитинсульфаты CS, а из нескольких видов иглокожих были получены разветвленные фукозилированные хондроитинсульфаты FCS. Примечательно, что каждый вид животного продуцирует уникальный по структуре ГАГ – полимеры различаются степенью сульфатирования, положением сульфатных групп, наличием разветвлений, молекулярным весом.

Рис. 1. Структурные элементы гликозаминогликанов: хондроитинсульфатов (CS) и фукозилированного хондроитинсульфатов (FCS).

Синтез родственных олигосахаридов был выполнен из доступных моносахаридных предшественников: пентаацетата D-глюкозы и D-глюкозамина. Полученные соединения являлись удобными моделями для конформационного анализа и структурных исследований. В экспериментах *in vitro* было оценено влияние полученных поли- и олигосахаридов на систему гемостаза, ангиогенез и стимуляцию противоопухолевого иммунитета. *Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ 19-73-20240.*

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГЛИКОКАЛИКСА

И.М. Рыжов, А.Б. Тузиков, М.С. Савченко, И.С. Попова, Т.В. Тыртыш, Г.В. Пазынина, С.В. Цыганкова, Н.В. Бовин
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Гликокаликс клетки представляет собой окружающую клетку оболочку, состоящую из гликопротеинов, протеогликанов и гликолипидов, и выполняет рецепторные, защитные и транспортные функции. Он задействован в процессе агглютинации эритроцитов анти-А- и анти-В-антителами, так как соответствующие А- и В-антигены имеют углеводную природу и входят в состав гликокаликса. Агглютинация эритроцитов является основным клиническим методом АВ0-типирования. При этом точный механизм и стехиометрия агглютинации изучены недостаточно. Из-за значительного структурного разнообразия АВН-антигенов на поверхности природных эритроцитов, их применение для таких исследований затруднено. Подходящим инструментом для изучения механизма агглютинации являются эритроциты, несущие на поверхности антигены с точно заданной структурой и заданного количества (плотности). Мы разработали два метода получения таких эритроцитов.

Первый подход основан на прямой химической модификации Н-эритроцитов, не имеющих своих А- или В-антигенов, с помощью активированных эфиров А- или В-гликанов. Модификация в таком случае проходит по поверхности гликокаликса. Второй подход основан на встраивании синтетических гликолипидов (FSL-конструктов) в мембрану Н-эритроцитов. Модифицированные таким образом эритроциты называют кодецитами. Применение FSL-конструктов с различной структурой позволяет варьировать такие параметры кодецитов как расстояние между антигеном и мембраной (за счет использования спейсеров различной длины) и валентность представленных антигенов (моновалентные А- или- В-антигены, или миметики мультивалентных антигенов, в которых коровая часть заменена олигопептидом).

Серия экспериментов по агглютинации природных эритроцитов группы крови А1, кодецитов, несущих различные FSL-производные с тетрасахаридом А (тип 2), и Н-эритроцитов, химически модифицированных этим гликаном, позволила позволила сделать заключение о предпочтительной вовлеченности гликопротеинов в процесс агглютинации. Предложенная методология сайт-избирательной модификации клеток может быть применена для изучения разнообразных гликан-белковых (а также пептид-белковых, если L – это пептид) взаимодействий клеточной поверхности. *Работа поддержана грантом РФФИ № 18-33-00795.*

СИНТЕЗ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ УГЛЕВОДНЫХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛЕПРЫ И ТУБЕРКУЛЕЗА

П.И. Абронина[1], Н.М. Подвальный[1], Н.Н. Кондаков[1], К.Г. Федина[1], Т.М. Мельникова[1], А.Г. Королёва-Ушакова[2], Е.В. Баранова[2], С.Г. Игнатов[2], П.В. Соловьев[2], С.Ф. Бикетов[2], Л.О. Кононов[1]
[1]Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН; Москва; ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора, Оболенск Московской обл., Россия

Разработан эффективный метод синтеза спейсерированных олигосахаридных фрагментов липоарабиноманнана (LAM) микобактерий, содержащих остатки арабинофуранозы, и фенольного гликолипида (PGL-I) *Mycobacterium leprae.* Получены новые антигены на основе синтетических углеводных эпитопов PGL-I и/или LAM, конъюгированных с бычьим сывороточным

альбумином (BSA). Данные углевод-белковые конъюгаты отличались степенью пришивки углеводных остатков и их структурой, а в случае конъюгатов, содержащих одновременно различные углеводные эпитопы, также и последовательностью их конъюгирования с BSA. При анализе серологической активности конъюгатов с сыворотками крови больных лепрой, больных туберкулёзом и здоровых доноров были определены показатели их чувствительности и специфичности, а также выявлены перспективные структуры для дальнейшей разработки средств серодиагностики микобактериозов.

НАНО- И МЕЗОРАЗМЕРНОЕ СТРУКТУРИРОВАНИЕ В РАСТВОРАХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ: ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ТОНКОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ (БИО)ХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ С УЧАСТИЕМ УГЛЕВОДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Л.О. Кононов
Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

К настоящему времени хорошо установлено [1-4], что большинство макроскопически гомогенных водных и неводных растворов разнообразных низкомолекулярных веществ структурировано на нано- и мезо-уровне (размер неоднородностей, супрамеров [4], варьирует от 1 нм до 102–103 нм). Этот новый тип «слабого» (если судить по величине энергии взаимодействия, которая не превышает kT [2]), но крайне эффективного и самопроизвольного структурирования жидкостей долгое время не привлекал внимание исследователей; и только недавно была выявлена его важность для адекватного описания химических процессов [4, 5]. Мы развиваем подход, который в явном виде учитывает структуру реакционного раствора и основан на гипотезе о том, что во многих случаях истинными реагирующими частицами в растворах являются не отдельные молекулы реагентов, а их нековалентно-связанные супрамолекулярные агрегаты, супрамеры [4]. В соответствии с этим супрамерным подходом молекулярная структура и условия проведения реакций определяют структуру образующихся супрамеров и, как следствие, их химические свойства. В докладе будет представлен обзор опубликованных и новых результатов, свидетельствующих о том, что для адекватного обсуждения результатов реакций гликозилирования и других реакций с участием углеводов и их производных необходимо учитывать структуру реакционного раствора. Например, изменение качества растворителя, в котором проводится реакция, может (1) приводить к существенному увеличению плотности супрамеров гликозил-донора и снижению его реакционной способности при разбавлении [6] или (2) способствовать протеканию эффективного сужения цикла в тиопиранозидах [7]. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-13-10244-П).*

1. Rak, D.; Sedlak, M. J. Phys. Chem. B 2019, 123, 1365-1374.
2. Zemb, T.; Kunz, W. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2016, 22, 113-119.
3. Zemb, T. N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016, 113, 4260-4265.
4. Kononov, L. O. RSC Adv. 2015, 5, 46718-46734.
5. Krickl, S. et al. Phys. Chem. Chem. Phys. 2017, 19, 23773-23780.
6. Nagornaya, M. O. et al. Carbohydr. Res. 2018, 470, 27-35.
7. Abronina, P. I. et al.Org. Lett. 2018, 20, 6051-6054.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ ПЛАНКТОННОЙ И БИОПЛЕНОЧНОЙ ФОРМ *HERBASPIRILLUM LUSITANUM* P6-12

Н.С. Величко, В.С. Гринев, Ю.П. Федоненко
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Существенную роль в формировании ассоциативных взаимодействий играют полисахариды (ПС) бактериальной поверхности. Эндофит *H. lusitanum* P6-12 один из двух представителей рода гербаспирилл, обнаруженных в клубеньках бобовых. Экзополисахариды Herbaspirillum вовлечены в процесс колонизации корней растений-хозяев. Бактериальные ПС также являются важными факторами, участвующими в клеточной агрегации при биопленкообразовании. Общеизвестна способность микроорганизмов переключаться между свободноживущим и прикрепленным состояниями, используя биопленку как фактор колонизации, патогенности, вирулентности и защиты от условий среды. Исследования экстраклеточных ПС планктонной и биопленочной форм *H. lusitanum* P6-12 могут внести существенный вклад в понимание молекулярных механизмов формирования и функционирования микробных сообществ в природных экотопах. Показано, что планктонная культура *H. lusitanum* P6-12 образует капсулу, в составе которой были обнаружены гликополимеры липополисахаридной природы и комплекс ПС с липидом. В культуральную жидкость бактерий выделяют комплекс ПС с липидом. Экстраклеточные ПС (ЭПС) *H. lusitanum* P6-12 отличаются от капсульных ПС (КПС) моносахаридным составом, а также составом липидной компоненты. Полисахаридные части КПС *H. lusitanum* P6-12 содержали остатки глицерина и бутантетраола. В то время как ПС части ЭПС отличались присутствием только глицерина. Остатки полиспиртов с большей долей вероятности, соединены посредством фосфодиэфирных связей, и несут на себе высокую плотность отрицательного заряда. Показаны отличия биополимерного и моносахаридного состава ПС планктонной и биопленочной форм роста. Экстраклеточные ПС биопленочной культуры содержат больше белков, чем углеводов. В экзополимерах биопленочной формы роста выявлены C16:1 и C18:1 кислоты, в то время как у планктонной культуры такие кислоты обнаружены не были. Очевидно, что присутствие подобных ЖК является способом адаптации микроорганизмов к условиям среды обитания. С применением ДСН-ПААГ элкктрофореза, ИК-спектроскопии, ГЖХ анализа показана гетерогенность ПС планктонной и биопленочной культуры *H. lusitanum* P6-12, что, очевидно, связано с их различной ролью в процессе колонизации макропартнера и реализации эффективного симбиоза, а также адаптации к существованию.

PROBING OF PROTEIN GLYCATION BY PEPTIDE-BASED MODEL SYSTEMS: ANALYSIS OF PEPTIDE PRODUCTS IN PARALLEL TO SUGAR AND A-DICARBONYL INTERMEDIATES

Nadezhda Frolova[1], Uta M. Herfurth[1], Duc Viet Nguen[1,2], Alena Soboleva[2,3], Gerd Ulrich Balcke,[4] Claudia Birkemeyer[1], Andrej Frolov[2,3]

[1]Universität Leipzig, Faculty of Chemistry and Mineralogy; [2]Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Department of Bioorganic Chemistry, [3]St. Petersburg State University, Department of Biochemistry and [4]Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Department of Cell and Metabolic Biology

Glycation is a non-enzymatic modification formed by reaction of reducing sugars with amino groups of proteins. Resulting Amadori compounds oxidize ('glycoxidation'), yielding advanced glycation end-products (AGEs), a heterogeneous group of potentially pro-inflammatory compounds. Alternatively, carbohydrates are involved in formation of α-dicarbonyls, yielding AGEs upon reaction with lysyl and arginyl residues ('oxidative glycosylation'). Despite the well-known deteriorating effect of AGEs, the exact formation mechanisms, relative contribution and possible interference of these pathways are unknown. Therefore, here we address glycation potential of dietary sugars and estimate the contribution of the major glycation pathways in formation of corresponding AGEs. Our experiments relied on model glycation systems, based on synthetic peptides, their Amadori modified counterparts and selected dietary sugar (or, in some cases, their ^{13}C-labeled analogs). Thereby, all AGE-formation pathways can be considered simultaneously. Analysis of peptide, sugar and α-dicarbonyl intermediates will rely on RP-UHPLC-ESI-QqTOF-, GC-Q-EI- and RP-HPLC-IT-MS, in two latter cases, after appropriate derivatization. The structures of peptide products and sugar intermediates were identified by their MS/MS fragmentation patterns, whereas annotation of carbonyl compounds relied on EI patterns and co-elution with authentic standards. Individual glycation pathways were assigned by isotopic composition of products. Analysis of the glycation mixtures revealed 37 lysine- and 22 arginine-derived products. Annotation of the glycation pathways, assigned to the generation of lysine-derived AGEs, revealed their formation via several routes: (*i*) both glycoxidative and autoxidative pathways (α-amino semiadipic aldehyde-containing product and peptide fragments), (*ii*) mostly via "glycoxidation", i.e. Amadori degradation (carboxymethylated peptides) or (*iii*) "autoxidative glycosylation" (pyrraline). This data were supported by kinetics profile of approximately 30 carbonyl compounds. To summarize, our approach allowed identification of the major routes for formation of specific AGEs. *This project was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant number FR3117/2-3) and RFBR (research project number 18-34-00927).*

ИЗУЧЕНИЕ ГЛИКАН-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ПОМОЩЬЮ ГЛИКОЭРРЕЕВ

Н.В. Шилова[1,2,3], Н.Р. Хасбиуллина[2,3,4], А.Ю. Нокель[2,3], П.С. Обухова[1], К.Л. Доброчаева[1], Н.В. Антипова[5,6], Н.В. Бовин[1]

[1]Институт биоорганической химии. им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН; [2]Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ; [3]ООО «Семиотик; [4]Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН; [5]НИУ «Высшая школа экономики»; [6]Российский университет дружбы народов Москва, Россия

Углевод-связывающие белки (УСБ) включают в первую очередь естественные и адаптивные антитела, лектины, гликозилтрансферазы и гликозидазы. Незаменимым инструментом для их исследования является гликоэррей (PGA), представляющий собой слайд размером с предметное стекло, на который нанесены сотни или даже тысячи лиганов – гликанов в виде спотов размером около 100 мкм в 6 повторах каждый. Результат взаимодействия УСБ с гликанами считывается с помощью флуоресцентного ридера и обрабатывается с помощью программного обеспечения. PGA характеризуется хорошей воспроизводимостью результатов, низким фоном и широким динамическим диапазоном, что позволяет анализировать даже небольшие количества образца. Наш последний вариант гликоэррея содержит >400 олиго- и >200 полисахаридов, что позволяет изучать антигликановые антитела (АГАТ) крови. В результате систематического исследования с помощью PGA мы обнаружили множество АГАТ у человека (> сотни специфичностей). Было сделано предположение, что такое многообразие необходимо для выполнения ими надзорной функции - элиминирования постоянно появляющихся трансформированных клеток. По каким именно механизмам осуществляется эта функция – еще предстоит выяснить, однако первые результаты гликоэррея по взаимодействию АГАТ с белком C3b показали, что в этот процесс, по всей видимости, может быть вовлечена система комплемента. АГАТ, детектируемые с помощью PGA, оказались перспективными маркерами для диагностики таких заболеваний, как рак и осложнения беременности (с показателями чувствительности и специфичности >70%). Не менее важным является изучение лектинов. Например, с помощью PGA было проведено изучение специфичности галектинов человека – как дикого типа, так и их молекулярных конструктов, что позволяет изучить влияние точечных мутаций и олигомеризации этих белков на гликан-связывающую специфичность. С помощью PGA можно изучать специфичность лектинов непосредственно в составе моноцитов, клеточных линий млекопитающих, бактериальных клеток, вирусов (гемагглютинин вируса гриппа). Для работы с клеткам млекопитающих был сконструирован специализированный эррей – с увеличенным размером спотов и мультимерным представлением гликанов, так как размер клетки, например, моноцита сопоставим с размером спота. *Работа поддержана грантом РФФИ № 18-04-00749.*

ГИПОТЕЗА О ПРОИСХОЖДЕНИИ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ

Н.В. Бовин

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

Естественными антителами (еАТ) называют Ig, продуцируемые B1-клетками. еАТ могут связываться с антигенами, с которыми организм никогда не контактировал, их репертуар сходен у всех людей, формируется в течение первого года жизни и затем мало меняется; аффинного созревания с этими Ig (преимущественно IgM) не происходит; мало меняется с возрастом и титр антител. Ключевые вопросы, на которые до сих пор нет однозначного ответа, это: как образуются антитела без какого-

либо контакта с их антигеном (например, анти-А у людей группы крови В)? Почему репертуар разных людей близок, и со временем (и титры тоже) не меняется? Зачем нужна полиреактивность еАТ и почему IgM? Обобщение собственных исследований в области еАТ к гликанам, а также литературные данные способствовали формулированию следующей гипотезы. 1. Репертуар еАТ определяется генетическим фактором: жизненно важные специфичности отобраны эволюцией. 2. Но инициация (priming) генетически отобранных В1-клеток происходит благодаря бактериям. У мышей-гнотобиотов еАТ нет совсем. 3. В1-клетки инициируются исключительно благодаря контакту с интестинальными бактериями (микробиотой) в течение первого года жизни человека. 4. Главной мишенью еАТ являются молекулярные паттерны микроорганизмов и опухолевых клеток. Этим обусловлено доминирование IgM. 5. Fab-фрагмент еАТ (и В1-клеточного рецептора) имеет два сайта связывания разных антигенов: первый (Pri-сайт) для инициации, а второй (Rec-сайт) для рутинной работы в течение жизни. Pri-сайт может выполнять обе функции. Pri и Rec сайты могут быть физически разделены на полипептидной цепи, но не обязательно. 6. Rec-сайт может быть полиреактивным (узнавать группу антигенов), но может быть и высокоспецифичным (как например, у еАТ против антигенов групп крови). Pri-сайт всегда полиреактивен. 7. Fab-фрагмент еАТ значительно протяженнее, чем у адаптивных АТ, это позволяет ему узнавать молекулярные паттерны, составленные из нескольких молекул, и пространственные эпитопы белков. 8. Полиреактивность является благом: репертуар еАТ узок, но одно еАТ может узнавать множество патогенов. Механизм полиреактивности основан на том, что молекулярные паттерны (особенно у бактерий) не бесконечно разнообразны: подобно кристаллографическим группам Федорова, количество их архетипов невелико.

ГЛИКОБИОЛОГИЯ

стендовые доклады и конкурс молодых ученых

РАМНОЗОСОДЕРЖАЩИЕ ГЛИКОПОЛИМЕРЫ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК АКТИНОБАКТЕРИЙ

Н.В. Потехина[1], Е.М. Тульская[1], Г.М. Стрешинская[1], А.С. Шашков[2], Л.И. Евтушенко[3]
[1]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва;[2]Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва; [3]Институт физиологии и биохимии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино-на-Оке, Россия

Гликополимеры играют важную роль в архитектуре и целостности клеточной стенки, а также жизнедеятельности микроорганизмов. Они участвуют в создании отрицательного заряда на поверхности клеток, выполняют ряд физиологических функций, а компоненты, входящие в их состав, определяют фаговую и иммунологическую специфичность микробных клеток, играют ключевую роль в процессах межклеточного узнавания. В фокусе настоящего сообщения особенности структур гликополимеров клеточных стенок, содержащих в своем составе остатки рамнозы, некоторых представителей класса Actinobacteria. Рамнозосодержащие полимеры выявлены у незначительного числа актинобактерий представителей родов Brevibacterium, Clavibacter, Rathayibacter, Curtobacterium, Kribbella и Streptomyces, многие из которых ассоциированы с растениями или являются фитопатогенами. Представлены структурные особенности выявленных полимеров – тейхоевых (ТК), тейхуроновых (ТУК) и тейхулозоновых (ТУЛК) кислот и нейтральных полисахаридов (НПС). В составе ТК и ТУЛК (Brevibacterium, Streptomyces, Kribbella,) остатки рамнозы присутствуют в качестве боковых заместителей и имеют L-конфигурацию. В составе НПС и ТУК (Curtobacterium, Rathayibacter, Clavibacter) остатки рамнозы входят в основную цепь полимера и встречаются также в качестве боковых заместителей, имея как L-, так и D- конфигурацию. Структуры рамнозосодержащих гликополимеров актинобактерий являются уникальными, некоторые содержат в своем составе остатки моносахаридов: галактофуранозы, маннозы, рибофуранозы, ксилозы и фукозы (некоторые из которых редко встречаются в составе гликополимеров грамположительных бактерий), а также пировиноградной кислоты. Обсуждается роль рамнозильных остатков во взаимодействиях актинобактерий с другими организмами (нематоды, растения и человека) на начальном этапе развития процесса патогенеза. Результаты исследований показали перспективность изучения рамнозосодержащих гликополимеров клеточных стенок актинобактерий, как с точки зрения выявления новых природных биополимеров с уникальными свойствами, так и в связи с вопросами экологии этой обширной группы бактерий.

НЕДОСТАТОК ГЛЮКОЗЫ В РОСТОВОЙ СРЕДЕ ОБУСЛАВЛИВАЕТ НЕДОГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ И СНИЖЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА МУЦИНА MUC1 НА МЕМБРАНЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

М.С. Сыркина[1,3], В.С. Вьюшков[1,3], М.А. Рубцов[1,2,3]
[1]Кафедра молекулярной биологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Кафедра биологической химии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия; [3]Международная ассоциированная лаборатория LIA LFR2O «Laboratoire franco-russe de recherches en oncologie», Вилледжюиф, Франция – Москва, Россия

Муцин MUC1 человека - мембранный гликопротеид, гиперэкспрессирующийся в клетках различных типов рака. Интенсивное гликозилирование молекулы MUC1 необходимо для правильной укладки и стабилизации ее структуры. Эктсрацеллюлярный домен MUC1 содержит область VNTR (20-125 тандемно повторяющихся последовательностей из 20 а.к. остатков), где каждый повтор содержит 4 потенциальных сайта О-гликозилирования. Таким образом, для синтеза данного гликопротеида необходимо большое количество углеводов.

На основе клеток линии HT-29 (карциномы кишечника) были созданы клеточные модели, стабильно экспрессирующие различные варианты MUC1 с областью тандемных повторов, содержащей 0, 1, 4, 8, 12 или 20 повторов. Была установлена корреляция между увеличением длины области тандемных повторов и сокращением количества рекомбинантного белка на

мембране клетки. Было определено отношение содержания мембранного белка к суммарному. Сравнение полученных отношений для разных линий показало уменьшение содержания мембранной формы белка с увеличением количества тандемных повторов в белке. Таким образом, высокий уровень внутриклеточного MUC1 может быть маркером углеводного голодания и косвенно указывать на прогрессирование опухолевого роста. Также было продемонстрировано 20-тикратное снижение количества эпитопов sialyl Lewis a в рекомбинантном белке, несущем 20 тандемных повторов, по сравнению с белком, содержащим 1 повтор. Наконец, было показано, что продолжительное культивирование без смены среды приводит к снижению содержания рекомбинантного белка в клетках.

Полученные данные, демонстрирующие сокращение уровня гликозилирования и накопления муцина MUC1 человека вследствие углеводного голодания, указывают на один из возможных механизмов регуляции презентации белка на мембране клетки. Если вместо культуры клеток рассматривать опухоль, необходимо учитывать гетерогенность условий внутри и снаружи. Клетки, располагающиеся внутри быстрорастущей опухоли, лишенной сосудов, находятся в условиях голодания, что может влиять как на профиль гликозилирования белков, так и на уровень их синтеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 16-34-60233 и 19-04-00891).

АНТИГЛИКАНОВЫЕ АНТИТЕЛА В ДИАГНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.А. Тихонов[1], В.И. Бутвиловская[1], Г.У. Фейзханова[1], Н.Е. Кушлинский[2], А.Ю. Рубина[1]
[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; [2]НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия

Абберантное гликозилирование опухолевых клеток часто происходит на ранних стадиях рака, изменяя паттерн гликановых структур, что может быть использовано в диагностических целях. Анализ непосредственно опухолеассоциированных гликанов с помощью хроматографии и масс-спектрометрии довольно сложен и не используется в рутинной практике. Альтернативным подходом для изучения спектра гликозилирования при онкологической трансформации может являться использование антител к гликанам. Антитела различных изотипов к опухолеассоциированным гликанам обнаруживаются в циркуляции с помощью различных методов, основным из которых является анализ с использованием гликочипов. Гликочипы представляют собой матрицу иммобилизованных гликанов, с которыми специфично взаимодействуют антитела из крови пациентов. Эти взаимодействия можно детектировать с помощью конъюгированных с красителями вторичных антител и, таким образом, получить избирательный профиль антител к онкоассоциированным гликанам. Исследования с использованием подобного подхода были проведены для изучения пула антигликановых антител для различных опухолей, в результате чего были найдены гликаны с высоким диагностическим потенциалом. Наиболее изученными являются антитела к небольшому числу опухоль ассоциированных гликанов – O-гликанам Tn, TF, SiaTn, антигенам Lewis, ганглиозидами и Globo H; именно они, а также антитела к их сиалилированным, сульфатированным и фукозилированным производным исследуются в качестве маркеров для диагностики. Так, для рака яичников были найдены гликаны, антитела к которым способны различить больных и здоровых доноров с чувствительностью и специфичностью, сравнимыми с традиционным маркером CA 125. Причем в качестве биомаркера может выступать как индивидуальное антитело, так и комбинация антител, увеличивая при этом диагностическую точность определения. Подобные комбинации были найдены также для рака поджелудочной железы, колоректального рака, мезотелиомы и рака легкого. В данном докладе будут рассмотрены примеры использования антител к гликанам в качестве биомаркеров, их ограничения и перспективы практического использования.

НАСЫЩАЮЩИЙ ЭФФЕКТ ГЕЛЕВЫХ МИКРОЧАСТИЦ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ КАЛЛУСНЫХ ПЕКТИНОВ

Д.С. Храмова[1], Е.А. Гюнтер[1], П.А. Марков[1], О.В. Попейко[1], А.К. Мелехин[1], В.С. Белозеров[2], Е.А. Мартинсон[2], С.Г. Литвинец[2], С.В. Попов[1]
[1]Институт физиологии КомиНЦ УрО РАН; [2]Вятский государственный университет, Киров, Россия

Пектины, образующие вязкие растворы и гели в кислой среде желудка, усиливают ощущение сытости и снижают потребление пищи. Однако насыщающий эффект изученных к настоящему времени пектинов не высок (5–12%) [1]. Гели, образованные из пектинов, состоящих преимущественно из остатков галактуроновой кислоты, не устойчивы в кислой среде желудка, поэтому чувство сытости наблюдается преимущественно в первые часы после приема пищи, содержащей пектины [2–3]. Очевидно, увеличение способности пектинового геля набухать и удерживать воду в кислой среде желудка является перспективной стратегией повышения эффективности функциональных пищевых продуктов, снижающих аппетит. Гелевые микрочастицы, использованные в работе, были получены из пектинов каллусных культур смолевки обыкновенной (SVC) и ряски малой (LMC), а также из яблочного пектина (AU701, Herbstreith & Fox, Германия) методом диспергирования пектиновых растворов (2%) в масляную эмульсию. В результате были получены микрочастицы, диаметр которых составляет 180±30, 250±40 и 300±30 мкм для частиц из SVC, LMC и AU701, соответственно. Эксперименты *in vitro* показали, что микрочастицы из SVC и LMC набухают в искусственной гастральной среде в большей степени (на 83% и 98% для частиц из SVC, LMC, соответственно; $p<0,05$, $n=40$), чем частицы из AU701. Суспензию микрочастиц вводили мышам перорально (доза 40 мг/кг, 200 мкл/мышь) за два часа до кормления, контрольные животные получали эквивалентный объем дистиллированной воды или раствора AU701. Показано, что суточное потребление корма и масса тела снижается на 32% и 3%, соответственно, у мышей, получавших гелевые микрочастицы из SVC по сравнению с контролем (вода) ($p<0,05$, $n=10$). Микрочастицы из LMC снижают потребление корма мышами на 25% только в течение первых 5 часов после введения гелей ($p<0,05$, $n=10$). Раствор яблочного пектина, а также гелевые микрочастицы, полученные на его основе, не влияют на потребление пищи лабораторными мышами. Таким образом, насыщающий эффект пектиновых гелей выше, чем у растворов, что, вероятно, обусловлено их способностью набухать в гастральной среде.

[1] Wanders A. et al. // *Obes. Rev.*, 2011. Vol. 12. P. 724–739.

[2] Perrigue M. et al. // *J. Food Sci*., 2010. Vol.75. H300–H305.
[3] Logan K. et al. // *Food Funct*. 2014. Vol.6. P. 63–71.

СТРУКТУРА УГЛЕВОД-СВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕКТИНОВ НОВОГО СЕМЕЙСТВА

И.В. Чикаловец, А.П. Фильштейн, В.И. Молчанова, О.В.Черников
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Углевод-связывающие белки – лектины, оказались в центре биологических исследований только в последние годы, когда было показано, что углевод-белковое взаимодействие является важным механизмом передачи биологической информации на уровне клетки. Благодаря способности распознавать углеводные структуры, а также влиять на клеточные процессы лектины нашли широкое применение в биологии и медицине. Из морских мидий *Crenomytilus grayanus* и *Mytilus trossulus* нами выделены лектины CGL и MTL – представители нового класса, в который входит еще MytiLec, лектин, выделенный японскими учеными из мидии *Mytilus galloprovincialis*. Все три лектина проявляют высокую степень гомологии (88%), но содержат точечные замены в углевод-связывающих сайтах. Большинство лектинов, которые исследуются как потенциальные медицинские агенты, специфичны к β-связанным олигосахаридам, поэтому CGL, MTL и MytiLec представляют интерес из-за их необычной лигандной специфичности, а также эффекта против определенных опухолевых клеточных линий. Установление тонкой углеводной специфичности показало, что CGL и MytiLec проявляют аффинность к углеводным цепям с терминальной галактозой, связанной гликозидной связью в α-положении. MTL специфичен к концевой галактозе с β-конфигурацией гликозидной связи, структурой, обнаруженной в TF-антигене (антиген Thomsen–Friedenreich), известном опухолевым маркере. Исследование цитотоксического действия лектинов показало, что CGL и MytiLec уменьшают выживаемость клеток лимфомы Raji, взаимодействуя с глоботриозой (Gb3, Galα1-4Galβ1-4Glc), клеточно-поверхностным маркером, найденным в нескольких опухолевых клеточных линиях, в то время как MTL не оказывает никакого влияния на эти клетки, но проявляет цитотоксическую активность по отношению к клеткам MDA-231 и Daudi. CGL и MTL уменьшают выживаемость клеток MCF-7, которые содержат на клеточной поверхности как Gb3, так и TF- и Tn-антигены. На основании кристаллических структур CGL и MytiLec показано, что мультивалентные димерные формы лектинов являются критическими для цитотоксического эффекта, т. к. MytiLec, полученный в виде мономера, не связывается с Gb3. *Работа выполнена при финансовой поддержке программы ДВО РАН «Дальний Восток» 2018-2020 (грант № 18-4-007).*

МАТРИКС БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЙ РОДА AZOSPIRILLUM: ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ

С.С. Евстигнеева, Ю.П. Федоненко, А.А. Широков
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Непатогенные диазотрофные ризобактерии рода Azospirillum, стимулирующие рост и развитие растений, при колонизации корневой системы формируют определенным образом организованные сообщества, называемые биопленками. Клетки в биопленках погружены в продуцируемый ими внеклеточный полимерный матрикс (ВПМ). Функции ВПМ чрезвычайно важны для жизнедеятельности биопленок и сводятся к поддержанию трехмерной «архитектуры», адгезии к различным поверхностям, защитной, а в критические моменты и питательной функции и т.д. В последние годы проводится изучение особенностей формирования биопленок бактериями Azospirillum, однако сведения о компонентном составе ВПМ практически отсутствуют. Цель работы состояла в выделении и характеристике основных составляющих ВПМ биопленок бактерий типового *A. brasilense* Sp7 и эндофитного Sp245 штаммов, сформированных на границе раздела фаз «жидкость–воздух». Биопленки получали культивированием бактерий без перемешивания в колбах Эрленмейера на синтетической среде с малатом натрия в течение 7 суток. Компоненты ВПМ азоспирилл дифференцировали конфокальной микроскопией с использованием родоспецифических антител к основным белкам поверхности бактериальных клеток и к липополисахаридам (ЛПС), меченных ФИТЦ и ТРИТЦ. Показано преобладание в ВПМ биопленок исследуемых штаммов белковых молекул, а также присутствие экстраклеточной формы ЛПС. Ультразвуковой дезинтеграцией биопленок бактерий *A. brasilense* Sp7 и Sp245 с последующим осаждением клеток центрифугированием были получены ВПМ, выходы которых составили 7 и 10% от массы сухих клеток биопленок соответственно. Электрофорезом в ПААГ во ВПМ обоих штаммов было идентифицировано около 30 полипептидов с молекулярными массами в диапазоне 14–110 кДа с преобладанием мономера в области соответствующей массам 40–45 кДа. Гликополимерную фракцию ВПМ, содержание которой не превышало 25%, получали депротеинизацией, с последующей очисткой гель-хроматографией. По химическому составу и электрофоретической подвижности гликаны ВПМ демонстрировали сходство с ЛПС внешних мембран гомологичных штаммов. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00089.*

НОВЫЙ МАННАН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ЛЕКТИН ИЗ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *GLYCYMERIS YESSOENSIS*

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

Защитные механизмы двустворчатых моллюсков, у которых отсутствует адаптивная иммунная система, полностью зависят от врожденного иммунитета. Ведущая роль в системе биозащиты беспозвоночных от микробного вторжения отводится лектинам С-типа, которые представляют собой Ca^{2+}-зависимые белки, распознающие углеводы и углеводные компоненты гликоконъюгатов различной природы и обладающие способностью агглютинировать различные микроорганизмы, лишая последних возможности дальнейшего рассеивания и внедрения в ткани животного. Методами ионообменной и аффинной хроматографий из гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis* был выделен новый высокомолекулярный Ca^{2+}-

зависимый лектин (GYLman), обладающий аффинностью к высокоразветвленным гомополисахаридам – маннанам, построенным из α1,2 и α1,6-связанных остатков D – маннозы, а также к манноолигосахаридам, ингибирующая способность которых возрастала с увеличением их степени полимеризации. Узнавание образов патогенности ПАМП (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) – группы молекул, характерных для патогенов, но отсутствующих в организме хозяина, является основой распознавания во врожденном иммунитете. Белки, взаимодействующие с ПАМП, объединяют в группу, получившую название паттерн распознающие рецепторы (ПРР). Для определения принадлежности GYLman к ПРР, нами была изучена его способность связываться с основными видами ПАМП. Методом ТЛФА (твердофазного лектин-ферментного анализа) выявлено, что GYLman проявляет концентрационно-зависимое связывание со всеми исследуемыми ПАМП в следующей зависимости: маннан>пептидогликан>ЛПС>β-1,3-глюкан. Кроме того, методом ТЛФА было изучено действия лектина уже не на компоненты клеточных мембран бактерий, а на сами бактерии, и показано, что GYLman специфично связывает как грамположительные (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*), так и грамотрицательные (*Escherichia coli, Vibrio proteolyticus*) бактерии. Эти данные согласуются с результатами экспериментов по изучению способности лектина агглютинировать бактерии в растворе, и ингибировать образование ими биопленок. Полученные данные позволяют отнести GYLman к ПРР и предположить его роль, как фактора иммунной системы моллюска, участвующего в защите организма беспозвоночного от воздействия внешних патогенов.

ИЗМЕНЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК, СОПРОВОЖДАЮЩИЕ РОСТ РАСТЯЖЕНИЕМ МЕЗОКОТИЛЕЙ КУКУРУЗЫ

А.Р. Назипова[1], Л.В. Козлова[1], Н.Н. Ибрагимова[1], Е.В. Энейская[2], А.А Кульминская[2], Т.А. Горшкова[1]
[1]Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань; [2]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

Одним из ключевых процессов, характерных для растений, является рост их клеток растяжением. Увеличение объема растительной клетки сопровождается интенсивной вакуолизацией и осуществляется под действием тургора в пределах, которые, предположительно, определяются свойствами ее клеточной стенки. В ходе роста клетки ее клеточная стенка претерпевает определенные модификации, основными мишенями которых могут служить составляющие ее полисахариды. Полисахариды клеточных стенок злаковых растений представлены целлюлозой, гемицеллюлозами (преимущественно глюканом со смешанным типом связей и глюкуроноарабиноксиланом), а также небольшим количеством пектинов. Удобным объектом для исследования клеточных стенок злаков и изменений полисахаридного состава, сопровождающих рост растяжением, служат этиолированные проростки кукурузы, а именно их зародышевый стебель – мезокотиль, где зона растяжения клеток и зона клеток, завершивших растяжение, удалены друг от друга. Из клеточных стенок двух зон мезокотилей с помощью специфических ферментов гликан-гидролаз и концентрированного гидроксида калия (в различных комбинациях) были выделены доступные для их действия гемицеллюлозы. Матриксные полисахариды, не извлеченные в ходе этих обработок, были разрушены трифторуксусной кислотой, с последующим анализом моносахаридных производных. Для полученных фракций полисахаридов были проведены исследования молекулярно-массового распределения методом гель-фильтрации и анализ моносахаридного состава. Дополнительное распознавание эпитопов отдельных полисахаридов провели с помощью дот-блот-анализа индивидуальных фракций с моноклональными антителами. Те же антитела использовали для иммуномечения клеточных стенок мезокотилей кукурузы на поперечных срезах из разных зон. Ферментативная активность эндогенных гликангидролаз, возможно осуществлявших наблюдавшиеся модификации полисахаридов клеточной стенки, была охарактеризована с помощью искусственных субстратов в растительных гомогенатах. Применение комплекса этих методов позволило отследить изменения полисахаридного состава и архитектуры клеточных стенок, происходящие в ходе роста растяжением, и выявить ферменты, потенциально участвующие в этих преобразованиях.

СТРУКТУРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЛИПИДОВ А БАКТЕРИЙ РОДА AZOSPIRILLUM

Е.Н. Сигида[1], В.С. Гринёв[1,2], П.С. Дмитренок[3], С.А. Коннова[1,2], Ю.П. Федоненко[1,2]
[1]Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов; [2]Саратовский национальный исследовательский государственный университет, Саратов ; [3]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Проведен структурный анализ липидов А, выделенных из ЛПС десяти видов азоспирилл: *A. rugosum, A. agricola, A. doebereinerae, A. brasilense* Sp7, *A. zeae, A. soli, A. thiophilum, A. halopraeferens* Au4, *A. lipoferum* SR38, *A. fermentarium*. Методом ГЖХ установлено, что преобладающими жирными кислотами в составе ЛПС являются 14:0 (3-OH) и 16:0 (3-OH), в меньшем количестве присутствуют 16:0, 16:1, 18:1 и 19:0. В составе ЛПС *A. fermentarium* идентифицированы 12:0 и 14:1, а в составе ЛПС *A. halopraeferns* Au4, наряду с 14:0 (3-OH) и 16:0 (3-OH), присутствует 18:0 (3-OH). Мягким щелочным гидролизом установлено, что первичной O-связанной жирной кислотой в составе ЛПС азоспирилл является 14:0 (3-OH). Анализ моносахаридного состава липида А методом ГЖХ ацетилированных метилгликозидов выявил присутствие во всех проанализированных образцах GlcN и GalA в соотношении ~2:1. Детальный анализ структуры липида А был осуществлен с применением МАЛДИ масс-спектрометрии. Установлено что липиды А *A. brasilense* Sp7, *A. lipoferum* SR38, *A. rugosum, A. soli, A. zeae, A. agricola, A. doebereinerae* имеют схожее строение и представляют собой смесь пента-, тетра- и триацильных типов, несущие первичные N-связанные 16:0 (3-OH), O-связанные 14:0 (3-OH) и вторичные жирные кислоты (16:0, 16:1 и 18:1), ацилирующие 16:0 (3-OH), находящуюся в положении 2'. Микрогетерогенность каждого из типов липида А обусловлена различной природой вторичной жирной кислоты (16:0, 16:1, 18:1,19:0), ацилирующей остаток N-связанной 16:0 (3-OH) дистального кольца GlcN. В

липидах A *A. brasilense* Sp7, *A. lipoferum* SR38, *A. agricola* и *A. doebereinerae* также присутствовали гексаацильные типы, содержащие дополнительный остаток 16:0. Липид A *A. thiophilum* представлял собой смесь тетра-, пента- и гексаацильных типов, идентичных по составу первичных кислот, в котором вторичной кислотой являлась только 16:1. В липиде A *A. fermentarium* вторичные жирные кислоты в пентаацильных типах представлены остатками 12:0 и 14:1. Отличительной особенностью липида A A. halopraeferens Au4 являлось присутствие пентаацильных видов, содержащих остатки N-связанной 18:0 (3-OH) в положениях 2 и 2'. *Исследования поддержаны РНФ (грант № 18-74-00060).*

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ НАТИВНОГО И РЕКОМБИНАНТНОГО ЛЕКТИНОВ ИЗ МАНТИИ МИДИИ *MYTILUS TROSSULUS*

А.П. Фильштейн, В.И. Молчанова, И.В. Чикаловец
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

В последние годы морские биологические ресурсы все чаще используются как источники получения новых физиологически активных веществ и объектов для фундаментальных и прикладных медико-биологических исследований. В результате систематических изучений получены данные, подтверждающие, что одним из свойств морских беспозвоночных является продуцирование лектинов – углевод-связывающих белков или гликопротеинов. Интерес к лектинам объясняется тем, что, благодаря высокой избирательности связывания с углеводными участками клеточной мембраны, они принимают участие в самых тонких процессах на клеточном, субклеточном и органном уровнях в живых организмах. Ранее в лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН был выделен Gal/GalNAc-специфичный лектин из мидии *Mytilus trossulus* (MTL), установлена его структура, изучена биологическая активность. В целях сохранения биологических ресурсов, для дальнейшего изучения лектина была разработана схема получения рекомбинантного MTL (r-MTL). Для сравнительной характеристики нативного (n-MTL) и r-MTL были проанализированы их КД-спектры. Расчет содержания элементов вторичной структуры показал, что n-MTL и r-MTL имеют одинаковую вторичную структуру и состоят из: α-спирали, β-листа, β-поворота и неупорядоченной формы. Для подтверждения активности рекомбинантного лектина были использованы методы гемагглютинации (ГА) и иммуноферментного анализа. Было показано, что взаимодействие лектинов с адсорбированными IgGMTL является концентрационно зависимым, а связывающая способность r-MTL сравнима с активностью нативного лектина. Результаты ГА также указывают на отсутствие различий между n-MTL и r-MTL. Для сравнения биологической активности n-MTL и r-MTL был поставлен эксперимент по определению цитотоксичности лектинов на клетки рака молочной железы (MCF-7, MDA-231) и лимфобы Беркета (Daudi, Raji). В результате было установлено, что, как рекомбинантный, так и нативный лектины проявляли цитотоксическую активность в концентрации 100 мкг/мл по отношению к клеткам MCF-7, MDA-231 и Daudi, процент живых клеток через 48 часов составил 35%, 65% и 31% соответственно. Проведенный анализ позволяет сделать вывод об идентичности n-MTL и r-MTL как по структуре, так и по биологической активности. *Работа выполнена при поддержке грата РФФИ № 18-34-00210.*

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИМИДЖИНГ

Устные доклады

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ С ПОМОЩЬЮ СЕНСОРНЫХ МОЛЕКУЛ

А.А. Богданов, мл.[1,2,3], В.Г. Метелев[4], Т. Тажьян[1]; И.Д. Соловьев[3], А.Т.Н. Кумар[5], С. Жанг[1], А.П. Савицкий[3]
[1]Медицинский факультет Университета штата Массачусетс, Кембридж, США; [2]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ М.В. Ломоносова; [3]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; [4]Химический факультет МГУ М.В. Ломоносова, Москва, Россия, [5]Гарвардская медицинская школа, Бостон, Массачусетс, США

Сенсорные молекулы, предназначенные для магнитно-резонансной томографии, оптической и фото (опто) акустической визуализации воспалительных процессов в живых системах, приобретают особенную важность в контексте современных фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований. Сенсорные молекулы могут использоваться в ходе обнаружения флуоресцентного сигнала: от томографии всего тела до эндоскопии с помощью миниатюрных камер. Их применение в МРТ дает возможность получать подробную информацию о локализации специфического сигнала на фоне полной анатомической картины томографического среза тела. Молекулы сенсоров, в том числе расщепляемые ферментами макромолекулы, несущие флуорофоры ближнего инфракрасного диапазона со статическим и/или динамическим тушением флуоресцентного сигнала, обладают продолжительными временами циркуляции в кровотоке и высокой чувствительностью, что позволяет детектировать активность ферментов в течение длительных периодов времени при низких дозах. Некоторые из них, в том числе разработанные для определения каталитической активности ключевых ферментов, являющихся маркерами воспаления, становятся коммерчески доступными. В будущем ожидается появление более эффективных «активируемых» молекул-сенсоров с оптимизированной чувствительностью и ферментной специфичностью, спектральными характеристиками, подходящими для интраоперационной визуализации в хирургии, биосовместимостью и отсутствием иммунного ответа и токсичности. Новые методы оптической визуализации в живых системах, т. е. основанных на измерении времени жизни флуоресценции и фото (оптическая) акустическая визуализация, могут способствовать ранней диагностике заболеваний человека. Использование сенсорных молекул для оптической визуализации будет включать доклиническое тестирование экспериментальных терапий. В то же время, постоянное развитие и совершенствование оптических и парамагнитных сенсорных молекул, а также наличие биологически инертных и высокоспецифичных флуоресцентных зондов будут способствовать внедрению флуоресцентной визуализации в клинику.

МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКИЙ ИМИДЖИНГ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Е.В. Загайнова[1,2], А.В. Мелешина[1], Д.С. Кузнецова[1], С.В. Родимова[1], В.В. Дуденкова[1,2], Н.В. Бобров[1], Э.Б. Дашинимаев[3], Е.А. Воротеляк[3], В.И. Щеславский[4]
[1]Институт биомедицинских технологий, Приволжский исследовательский медицинский университет; [2]Институт биологии и биомедицины, Нижегородский университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; [3]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия; [4]Becker&Hickl GmbH

В регенеративной медицине развивается два основных направления: клеточная терапия и тканевая инженерия. В каждом направлении есть общие нерешенные задачи и проблемы. Так, в клеточной терапии необходимо оценить полноценность дифференцировки стволовых клеток перед трансплантацией, проводить мониторинг миграции и пролиферации клеток на уровне целого организма при изучении процесса имплантации и направленной пролиферации. В тканевой инженерии требуется проведение анализа тканевого эквивалента перед трансплантацией – оценка качества матрикса и дифференцировки клеток и неинвазивная диагностика качества формирования ткани в организме. Для выполнения поставленных задач необходимо использовать щадящие - неповреждающие методы, без дополнительных контрастов. Мы предлагаем применять оптические методы диагностики с разным принципом действия: мультифотонный имиджинг с функцией FLIM, оптическую когерентную томографию с функцией оценки микроциркуляции (ОКТ МА). Мультифотонный имиджинг с функцией FLIM использован нами для оценки степени конечных дифференцировок как мезенхимных стромальных клеток (МСК), так и индуцированных плюрипотентных клеток. Было показано, что при дифференцировке происходит метаболический переход с гликолиза на окислительное фосфорилирование, что отражается в изменении соотношения вкладов свободного и связанного НАД(Ф)Н. Этот параметр может быть использован для эффективной сортировки дифференцированных клеток. Также было показано участие подсаженных аллогенных МСК в формировании кости и сосудов с использованием модели трансгенных мышей, экспрессирующих флуоресцентный белок GFP и генетически меченных клеток. При разработке кожных эквивалентов для лечения хронических и ожоговых ран с использованием методов ОКТ МА, мультифотонного имиджинга и FLIM изучены структура и качество дермальных эквивалентов перед трансплантацией, а также ремоделирование коллагенового матрикса и восстановление микроциркуляции при заживлении ран после трансплантации. Показано, что мультифотонный имиджинг с функцией FLIM эффективен при прогностической оценке качества регенерации ремнанта печени после обширных резекций. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №19-15-00263).*

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИСТОКСОВЫХ НАНОФОСФОРОВ, ЛЕГИРОВАННЫХ ИОНАМИ ТУЛИЯ В ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

А.Б. Костюк[1], А.Д. Воротнов[1], А.В. Иванов[2], А.И. Цареградская[1], Л. Лианг[3], А.Б. Воловецкий[1], Л.М. Сенча[1], А.В. Круглов[1], В.А. Воденеев[1], Ю.Лу[3], А.В. Звягин[1,2,3]
[1]Университет Лобачевского, Нижний Новгород; [2]Сеченовский университет, Москва, Россия; [3]Университет Маккуори, Сидней, Австралия

Благодаря своим уникальным фотофизическим свойствам, антистоксовые нанофосфоры (НАФ) широко применяются в биоимиджинге. Однако вследствие фосфоресцентной природы фотолюминесценции (ФЛ) НАФ, использование их в качестве маркеров в лазерной сканирующей микроскопии остается затруднительным. Из-за длительного времени жизни ФЛ НАФ (100-1000 мкс) при быстром сканировании происходит размытие фотолюминесцентных изображений, для восстановления которых требуется деконволюция. Медленное сканирование в большинстве случаев является крайне трудозатратным и неприемлемым вариантом получения изображений. В данной работе были использованы НАФ NaYF4:Yb с высокой степенью легирования ионами Tm3+ (8%) (8Т-НАФ). По сравнению со многими фосфоресцентными метками время жизни излучения 8Т-НАФ, составляет ~ 15 мкс, что обеспечивает быстрое получение изображений без артефактов. Показано, что высокая оптическая нелинейности 8Т-НАФ (n = 4), характерная для излучательного перехода 1D2 → 3F4 при 455 нм, позволяет визуализировать 8Т-НАФ с высоким разрешением (217 ± 5 нм). Данное свойство было использовано во флуоресцентной корреляционной спектроскопии 8Т-НАФ в исследовании образования белковой короны на поверхности 8Т-НАФ при погружении их в культуральную среду с целью ограничения наблюдаемого объема. Кроме того, относительно длительное время жизни ФЛ 8Т-НАФ по сравнению с автофлуоресценцией экзогенных флуорохромов позволяет осуществлять отложенную регистрацию ФЛ с помощью системы счета фотонов с временной корреляцией. В результате излучение от 8Т-НАФ становится основным источником детектируемого сигнала, приводящего к усилению контраста в клетках (> 2,5 раза), а также в тканях лабораторных животных (> 3,5 раза). *Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (проект № RFMEFI58418X0033) и РФФИ (проекты № 18-29-01055 и № 18-34-00723).*

УЛУЧШЕННАЯ ЛЮЦИФЕРАЗА *METRIDIA LONGA*: ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ *IN VIVO*

С.В. Маркова[1,2], Д.А. Горбунова[1,2], М.Д. Ларионова[1], Е.С. Высоцкий[1]
[1]Институт биофизики СО РАН, ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН; [2]Сибирский Федеральный университет, Красноярск, Россия

Люцифераза морских копепод *Metridia longa* является небольшим секретируемым белком, катализирующим простую реакцию окисления субстрата целентеразина без каких-либо кофакторов с выделением голубого света. В геноме *M. longa* люцифераза представлена как минимум четырьмя неаллельными изоформами, различающимися размерами 16,5–22,0 кДа и некоторыми свойствами. Маленькие размеры, высокая активность и стабильность, включая экстремальную термостабильность, определили привлекательность их использования в качестве биолюминесцентных репортеров в биологических исследованиях. Первая клонированная изоформа MLuc люциферазы *M. longa* была успешно использована как репортер для визуализации ряда клеточных процессов *in vivo* как в клеточных культурах, так и в целых организмах, наряду с другой популярной копеподной люциферазой GpLuc из *Gaussia princeps*, и с тех пор сфера их применения постоянно расширяется. Но использование данных репортеров для визуализации *in vivo* в тканях и интактных животных в настоящее время ограничено, во-первых, эмиссией света с пиком около 480 нм, который имеет ограниченное проникновение через живые ткани, и, во-вторых, низкими температурными оптимумами биолюминесцентных реакций в районе 15-18°C. Настоящая работа посвящена получению улучшенных репортеров для биоимиджинга in vivo на основе изоформ люциферазы *M. longa* при использовании случайного мутагенеза и молекулярной эволюции, их характеризации и анализу возможностей применения. Получены мутантные формы люциферазы *M. longa* с температурным оптимумом биолюминесцеции, близким к температуре теплокровных организмов, с улучшенными кинетическими параметрами и небольшим спектральным сдвигом 10–15 нм в длинноволновую часть спектра для повышения проницаемости животных тканей. Показано, что больший спектральный сдвиг для люциферазы *M. l*onga возможно получить, отбирая мутантные формы, способные использовать модифицированный «красный» целентеразин v. Перспективы применения новых репортеров для визуализации клеточных процессов обсуждаются. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта: «Конструирование универсальных биолюминесцентных меток для иммунного и гибридизационного анализов на основе люцифераз копепод».*

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИМИДЖИНГ В ИССЛЕДОВАНИИ ФОТОТОКСИЧЕСКИХ И ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

Д.В. Южакова[1], М.В. Ширманова[1], М.М. Лукина[1], Л. Б. Снопова[1], Н.И. Игнатова[1], Е.О. Серебровская[3], А.И. Гаврина[1], А.В. Изосимова[1], И.В. Турчин[3], В.А. Каменский[3], Е.В. Загайнова[1]
[1]Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород; [2]Институт биоорганической химии М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; [3]Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, Россия

Генетически-кодируемые фотосенсибилизаторы являются мощным инструментом для исследования механизмов фотодинамической терапии (ФДТ) в опухолевых клетках *in vitro* и опухолевых моделях *in vivo*. На сегодняшний день фототоксические свойства продемонстрированы для двух флуоресцентных белков – красного GFP-подобного белка KillerRed и зеленого флавопротеина miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator). Целью работы является исследование фототоксических и иммуногенных

свойств генетически-кодируемых фотосенсибилизаторов KillerRed и miniSOG методом флуоресцентного имиджинга. Объектом исследования в случае KillerRed служили мыши линии Balb/c с подкожно привитым колоректальным раком CT26, в случае miniSOG – опухолевые сфероиды рака шейки матки человека HeLa Kyoto. Было проведено сравнительное исследование механизмов ФДТ с генетически-кодируемыми фотосенсибилизаторами при воздействии непрерывного и импульсного лазерного излучения. Показано, что импульсный режим способствует достижению максимального фотовыгорания белка KillerRed в опухоли при меньшей световой дозе, приводит к существенным дистрофическим изменениям в опухолевых клетках и ингибированию роста опухолей. Установлено, что при одинаковой световой дозе импульсно-периодический режим облучения за счет увеличения мощности импульса обеспечивает более эффективное фотовыгорание белка miniSOG в опухолевых сфероидах и больший процент гибели опухолевых клеток в составе сфероида. Кроме того, впервые продемонстрированы иммуногенные свойства белка KillerRed, выражающиеся в снижении прививаемости и замедленном росте KillerRed-экспрессирующих опухолей по сравнению с немодифицированными опухолями, а также в снижении прививаемости и торможении роста повторно привитых опухолей по сравнению с исходно привитыми. *Исследование фототоксических свойств генетически-кодируемых фотосенсибилизаторов выполнено при поддержке РФФИ (грант № 18-42-520027), изучение иммуногенных свойств белка KillerRed выполнено при поддержке Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 14.W03.31.0005).*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ FLIM МИКРОСКОПИИ И ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ АНГИОГРАФИИ ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ТОНКИХ МЕЛАНОМ

В.В. Елагин, Е.В. Губарькова, В.В. Дуденкова, О.Е. Гаранина, Д.А. Давыдова, Н.Ю. Орлинская, И.Л. Шливко, И.А. Клеменова, Е.В. Загайнова
Приволжский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

Меланомы являются причиной 90% летальных случаев, связанных с опухолями кожи. Традиционные подходы к диагностике, основанные на дермоскопии и визуальном осмотре, не дают 100% точности. Таким образом, существует необходимость внедрения новых методов прижизненной диагностики, обладающих высоким разрешением и коротким временем исследования. В связи с этим цель данной работы состояла в повышении точности диагностирования меланоцитарных образований путем совместного использования оптической когерентной ангиографии (ОКА), многофотонной флуоресцентной томографии (МФТ) и флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (FLIM). Исследование было проведено на 40 пациентах с меланоцитарными образованиями. Все образования были диагностированы клинически и дермоскопически, а после иссечения проведен гистологический анализ. В ходе исследования было установлено, что простое лентиго характеризовалось присутствием ярких ядросодержащих клеток в шиповатом слое. Дермо-эпидермальный переход представлен вытянутыми структурами, разделенными темными участками, имеющими вид мозга. Регулярная сосудистая сеть представлена небольшим количеством толстых и тонких прямых сосудов. Для диспластического невуса было характерно наличие небольших гнезд вытянутой формы, окруженных коллагеном. Плотная сосудистая сеть состояла из тонких извилистых сосудов. В случае меланомы наблюдалась локальная или глобальная потеря архитектуры эпидермиса. Присутствовали клетки, имеющие дендрит подобную морфологию (плеоморфные клетки с торчащими отростками), а также крупные педжетоидные клетки округлой формы. Нерегулярная сосудистая сеть состояла из извилистых сосудов в основном толстых и небольшого количества тонких. Анализ метаболического состояния клеток методом FLIM показал, что меланома характеризуется наименьшие значениями среднего времени жизни автофлуоресценции и вклада второй компоненты, что соответствует переходу на гликолиз. Также низкое значение вклада второй компоненты было характерно для диспластического невуса. В случае простого лентиго значение вклада второй компоненты было высоким, что связано с преобладанием окислительного фосфорилирования. Таким образом, совместное использование МФТ, FLIM и ОКА позволяет неинвазивно различать доброкачественные и злокачественные меланоцитарные образования.

СКРЫТАЯ ДИФФУЗИЯ МОЛЕКУЛ ОПТИЧЕСКИХ ПРОСВЕТЛЯЮЩИХ АГЕНТОВ: ДОСТОИНСТВА И НЕДОСТАТКИ ПРИ ОПТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПАТОЛОГИЙ

В.В. Тучин[1,2,3], И.Г. Меерович[3], Д.К. Тучина[1,3], О.А. Синдеева[1], Н.И. Казачкина[3], В.В. Жердева[3], А.П. Савицкий[3], А.А. Богданов[3] мл.[4,5]
[1]Саратовский национальный исследовательский государственный университет, Саратов; [2]Институт точной механики и управления РАН, Саратов; [3]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; [4]Медицинский факультет Университета штата Массачусетс, Кембридж, США; -Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Все методы биомедицинской оптической спектроскопии и визуализации страдают от малой глубины проникновения зондирующего пучка света и размытия изображения, из-за сильного рассеяния света как падающего, так и детектируемого. Одним из способов преодоления этих недостатков является использование метода оптического просветления биологических тканей, что обеспечивается за счет диффузии молекул биологически совместимого просветляющего агента в ткань [1-6]. В докладе представлены основы оптики и строения биологических тканей в контексте иммерсионного просветления, а именно количественной оценки скрытой диффузии молекул просветляющих агентов и подвижной воды, а также продемонстрировано применение технологии просветления для повышения контраста флуоресцентных (FLIM) изображений опухолей животных. Метод оптического просветления основан на таких физических явлениях, как согласование показателей преломления рассеивателей и окружающей среды за счет диффузии агента внутрь биоткани и обратимое обезвоживание ткани, вызванное гиперосмолярностью просветляющих агентов [1-6]. Обычно в качестве просветляющих агентов используется ряд гиперосмотических,

криогенных, рентгеноконтрастных и метаболических жидкостей, таких как глицерин, ПЭГ, глюкоза, фруктоза, сахароза, маннитол, декстран, пропиленгликоль, этиленгликоль, иогексол (OmnipaqueTM), альбумин, гемоглобин и некоторые другие. В докладе будет продемонстрировано улучшение оптической визуализации опухолей животных с использованием флуоресценции с временным разрешением (FLIM). Будет проанализирован перенос воды и изменение оптических свойств кожи под действием 70%-глицерина в сочетании с химическим усилителем проницаемости кожи ДМСО (5%), оценены обратимое обезвоживание и усадка ткани, баланс свободной и связанной воды. В контексте сочетания оптической и МРТ визуализации впервые будет показано, что МРТ контрастные вещества могут быть успешно использованы в качестве оптических просветляющих агентов. Будут представлены результаты экспериментальных исследований с использованием диффузионной спектроскопии и оптической когерентной томографии (ОКТ) по повышению эффективности оптической визуализации тканей с использованием МРТ контрастных агентов на основе гадолиния. Впервые измерены коэффициенты диффузии в коже мышей таких МРТ контрастных агентов, как «Гадавист» и «Магневист». Полученные данные принципиально важны для реализации нового подхода к мультимодальности, когда автоматически обеспечивается синхронизация во времени и пространстве повышения контраста оптического изображения и изображения МРТ, поскольку один и тот же агент обеспечивает оба процесса. *Исследование выполнено при поддержке Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 14.W03.31.0023).*

1. V. V. Tuchin, Optical Clearing of Tissues and Blood, Bellingham, WA: SPIE Press, 2006.
2. D. Zhu, K. V. Larin, Q. Luo, and V. V. Tuchin, “Recent progress in tissue optical clearing,” Laser Photonics Rev. 7(5), 732–757 (2013).
3. D.S. Richardson and J.W. Lichtman, “Clarifying tissue clearing,” Cell, 162, 246–257 (2015).
4. E. A. Genina, A. N. Bashkatov, Yu. P. Sinichkin, I. Yu. Yanina, V.V. Tuchin, “Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy [Review],” J. Biomed. Photonics & Eng. 1(1), 22–58, 2015.
5. A.Yu. Sdobnov, M.E. Darvin, E.A. Genina, A.N. Bashkatov, J. Lademann, V.V. Tuchin, “Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application,” Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 197, 216–229 (2018).
6. A. N. Bashkatov, et al., “Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing,” J. Biomed. Opt. 23(9), 091416 (2018).

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИМИДЖИНГ

Стендовые доклады и конкурс молодых ученых

РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРОЧАСТИЦ ТРОМБОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА С ПОДЪЕМОМ СЕГМЕНТА ST НА ФОНЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ СУПРЕССИИ АГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ

Е.Н. Лазарева[1,2], Л.И. Малинова[3], В.В. Тучин[1,2,4]
[1]Научно-образовательный институт оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет Н.Г. Чернышевского, Саратов; [2]Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск; Саратовский государственный медицинский университет В.И. Разумовского МЗ РФ, Саратов; [4]Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов, Россия

Хорошо известно, что в кровотоке могут обнаруживаться микрочастицы (МЧ), которые формируются при активации клеток путем отшнуровывания из тромбоцитов [1–2]. Повышенное образование МЧ наблюдается при различных патологических, воспалительных и иммунных процессах, тромботических осложнениях, а также сосудистых заболеваниях, включая инфаркт миокарда. Многочисленные функции, которые выполняют МЧ тромбоцитов в физиологии человека, обусловлены изменчивостью их состава и структуры, а связь с различными заболеваниями дает потенциальную возможность использования МЧ в качестве диагностических и прогностических биомаркеров [3–5]. В данном исследовании было изучено изменение МЧ, полученных из тромбоцитов плазмы крови пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST (ИМпST), и выполнена оценка возможного влияния температуры на высвобождение и характеристики МЧ. В работе проведен анализ дисперсионной и температурной зависимостей показателя преломления тромбоцитных МЧ при сердечно-сосудистых заболеваниях в спектральном диапазоне 480–1550 нм в интервале температур 25–50°C. Исследование проводилось на 7 образцах МЧ, полученных из тромбоцитов плазмы здоровых доноров, с известной концентрацией и на 8 образцах МЧ, выделенных из плазмы пациентов с ИМпS, у которых забор крови выполнялся при поступлении (группа 01) и на 2-й (группа 02) и 7-й (группа 03) день после манифестации инфаркта миокарда. Результаты экспериментов с образцами со стандартизированной концентрацией МЧ подтвердили возможность применения рефрактометрического метода для исследования их изменения. Значения показателя преломления и температурного инкремента для групп 02 и 03 были выше, по сравнению со значениями для группы 01. Полученный результат хорошо согласуется с дополнительно измеренными биохимическими данными, согласно которым в течение периода наблюдения (7 дней) наблюдалось монотонное увеличение концентрации МЧ: от 25,80 нг/мл при поступлении до 49,65 нг/мл на 7-й день (Friedman ANOVA p=0,027). Полученные результаты свидетельствуют о возможном участии МЧ в репаративных процессах в миокарде, влиянии локальной температуры на этот процесс, и представляют интерес для дальнейших исследований.

1. A.A. Ponomareva, T. A. Nevzorova, E. R. Mordakhanova, I. A. Andrianova, L. Rauova, R. I. Litvinov, and J. W. Weisel, Intracellular origin and ultrastructure of platelet-derived microparticles J Thromb Haemost. 2017 August ; 15(8): 1655–1667. doi:10.1111/jth.13745
2. Varon D, Shai E. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. J Thromb Haemost. 2015; 13:40–6.
3. Owens AP, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. Circ Res. 2011; 108:1284–97.
4. Mezouar S, Mege D, Darbousset R, Farge D, Debourdeau P, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Involvement of Platelet-Derived Microparticles in Tumor Progression and Thrombosis. Sem Oncol. 2014; 41:346–358.
5. Ayers L, Harrison P, Kohler M, Ferry B. Procoagulant and platelet-derived microvesicle absolute counts determined by flow cytometry correlates with a measurement of their functional capacity. J Extracel Ves. 2014; 3:25348.

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННОГО СЕНСОРА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ НА ОСНОВЕ BODIPY 581/591

К.Г. Лямзаев[1], А.А. Пантелеева[1], А.М. Нестеренко[1,2], Е.Г. Холина[3], Н.В. Сумбатян[4], А.Я. Мулкиджанян[1,5], Б.В. Черняк[1]

[1]НИИ физико-химической биологии А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; [3]Биологический факультет, [4]Химический факультет [5]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Митохондрии являются одним из основных источников активных форм кислорода (АФК) в клетке, а также одной из наиболее важных мишеней окислительного повреждения. Внутренняя митохондриальная мембрана особенно чувствительна к перекисному окислению липидов (ПОЛ), поскольку в ней фосфолипиды (прежде всего кардиолипин), содержащие ненасыщенные жирные кислоты находятся в прямом контакте с компонентами дыхательной цепи, которые продуцируют АФК. Исследования ПОЛ в мембранах митохондрий сильно ограничены отсутствием методов его анализа в живых клетках в реальном времени. Известные флуоресцентные красители чувствительные к ПОЛ равномерно распределяются по клеточным мембранам. Нами был синтезирован митохондриально-направленный сенсор MitoCLox на основе рациометрического зонда C11-BODIPY (581/591), широко используемого для детекции окисленных липидов. В этом сенсоре остаток C11-BODIPY был конъюгирован с помощью линкера с катионом трифенилфосфония (TPP+). Методами молекуляно-динамического моделирования было показано, что положение чувствительного к окислению участка зонда в бислое соответствует глубине расположения двойных связей в остатках жирных кислот кардиолипина. Анализ распределения зонда в плоскости мембраны указывает на преимущественное взаимодействие с кардиолипином. Свойства нового зонда были изучены на липосомах различного состава, а также на клеточных культурах с использованием методов флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. В липосомах, состоящих из кардиолипина, MitoCLox регистрирует кинетику окисления липида, не является антиоксидантом и не интерферирует с действием TPP-содержащего митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1. MitoCLox избирательно накапливается в митохондриях клеток и эффективно детектирует ПОЛ митохондриальной мембраны в условиях окислительного стресса, вызванного различными стимулами. SkQ1 блокировал окисление MitoCLox но слабо влиял на общий уровень окислительного стресса вызванного добавкой перекиси водорода. Таким образом, новый зонд избирательно регистрирует окисление липидов мембраны митохондрий. *Работа над проектом поддержана грантом РНФ №17-14-01314*

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ИМИДЖИНГ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ МЕТОДАМИ МУЛЬТИФОТОННОЙ МИКРОСКОПИИ

С.А. Родимова[1], Д.С. Кузнецова[1], Д.Г. Реунов[1], Н.В. Бобров[2], В.В. Елагин[1], Н.В. Вдовина[1], В.Е. Загайнов[2], Е.В. Загайнова[1]

[1]Приволжский исследовательский медицинский университет, МЗ РФ; [2]Приволжский окружной медицинский центр ФМБА России, Нижний Новгород, Россия

Оценка регенераторного потенциала печени с целью предотвращения возможных осложнений после резекции остается актуальной задачей. Стандартные методы оценки структуры печени не позволяют изучать процессы, происходящие в клетках при регенерации в динамике. Изменение метаболического статуса гепатоцитов, может служить критерием оценки регенераторного потенциала печени на клеточном уровне. Методы мультифотонной микроскопии в сочетании с FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) позволяют оценивать метаболический статус клеток на основе анализа времен жизни флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД. Метод генерации второй оптической гармоники (SHG) позволяет прижизненно визуализировать структуру коллагена в тканях. Эксперименты проводились на крысах линии Wistar с массой 400–500 г. Удаление левой доли печени – модель 30% гепатэктомии (30% ГЭ), удаление левой и медиальной долей печени – модель 70% гепатэктомии (70% ГЭ). Флуоресцентный имиджинг проводили на 3 и 7 сутки после операции. Образцы резецируемой печени служили в качестве контроля. Оценка структурно-функционального состояния гепатоцитов проводилась методом мультифотонной LSM микроскопии по уровню флуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД. Для оценки метаболического статуса гепатоцитов измеряли окислительно-восстановительное отношение (ФАД/НАД(Ф)Н). Для анализа метаболических путей в клетках получали значения времен жизни флуоресценции кофакторов и их вклады. Оценка структуры коллагена в паренхиме и капсуле печени проводилась методом SHG. Показано значимое увеличение ФАД/НАДН в регенерирующей печени. Наблюдается значительное увеличение вклада связанной с белком НАДН, что может свидетельствовать об усилении окислительного фосфорилирования в гепатоцитах при регенерации. Вклад НАДФН не изменялся, что может быть связано с вовлечением НАДФН в процессы неэнергетического метаболизма. В паренхиме печени значительного накопления коллагена не обнаружено. В модели 70% ГЭ наблюдается распрямление спиральной структуры коллагена капсулы печени. Полученные данные могут быть использованы для разработки новых критериев оценки регенераторного потенциала печени. *Данная работа была поддержана грантом Российского научного фонда 19-15-00263.*

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ, НА ОСНОВЕ СО-КУЛЬТИВАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Д.А. Скворцов[1], М.А. Калинина[2], И.В. Жиркина[1], О.А. Донцова[1,2]

[1]Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; [2]Сколковский институт науки и технологии, Москва, Россия

В настоящее время для значительной части онкологических заболеваний не существует адресной терапии. Размеры коллекций фармакологических препаратов, возможно пригодных для такого лечения возрастают с каждым годом. Актуальной задачей становится разработка и применение для скрининга новых систем поиска противоопухолевых соединений. В представленной работе скрининг основан на поиске препаратов, избирательно токсичных для опухолевых клеточных линий и мало

влияющих на линии, моделирующие нормальные клетки. Разработана система оценки выживаемости со-культивируемых этиологически опухолевых и нормальных клеточных линий, экспрессирующих флуоресцентные белки. Со-культивирование позволяет частично смоделировать локальное микроокружение в опухоли и увеличить производительность тестирования. Исследование проведено на двух моделях: опухолей легкого и молочной железы. В модели опухоли легкого используется пара линии рака легкого A549 и линии иммортализованных эмбриональных фибробластов легкого VA-13. В модели опухоли молочной железы — пара линий рака молочной железы MCF7 и неопухолевых клеток эпителия молочной железы MCF10A. Прижизненное наблюдение выживаемости линий в тесте построена на авторской разработке быстрой оценки количества клеток с помощью сканирования высокого разрешения [1]. Протестировано свыше двух тысяч соединений из коллекций кафедр химии природных соединений, органической химии и медицинской химии химического факультета МГУ. Верификация хитов проводилось с помощью низкопроизводительного автоматизированного протокола оценки цитотоксичности по Мосману. В числе хитов обнаружены препараты с селективностью 4–6 между клеточными линиями, моделирующими нормальные и опухолевые клетки. В их числе как аналоги известных противоопухолевых препаратов, например, производные бексаротена; так и препараты из коммерчески доступных коллекций, например, сульфоанилиден-изохинолиновые производные; и *de novo* синтезированные нашими коллегами соединения, например, бензодиазепинового ряда. *Работа выполнена при поддержке РФФИ 18-29-08060*

1. M.A.Kalinina, D.A. Skvortsov, M.P.Rubtsova, E.S.Komarova, and O.A. Dontsova, Cytotoxicity Test Based on Human Cells Labeled with Fluorescent Proteins: Fluorimetry, Photography, and Scanning for High-Throughput Assay. Mol Imaging Biol, 2018

НОВЫЕ ФОТОКОНВЕРТИРУЕМЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ И ИХ СВОЙСТВА

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

Фотоконвертируемые флуоресцентные белки (ФКФБ) являются мощным инструментом визуализации в молекулярной биологии. Их способность к фотоконверсии – батохромному сдвигу флуоресценцентного состояния в результате процесса фотоактивации – дает возможность применения ФКФБ не только в качестве генетически кодируемых флуоресцентных меток, но и их использования как pH-сенсоров. Новые флуоресцентные белки mcavFP (выделенный из *Montastraea cavernosa*) и rfloFP (выделенный из *Ricordea florida*) [1] принадлежат к белкам семейства Kaede и способны к необратимой зелено-красной фотоконверсии. Данная работа посвящена изучению свойств белков mcavFP и rfloFP. Для этого белки были наработаны и выделены в необходимых количествах. Были установлены максимумы возбуждения/эмиссии флуоресценции белков mcavFP и rfloFP до фотоконверсии (λex/λem=506/517 нм и λex/λem=504/515 нм, соответственно) и после (λex/λem=572/581 нм и λex/λem=566/575нм, соответственно). Методом гель-фильтрации было установлено, что белки существуют в виде тетрамеров. Также определены константы кислотно-основного равновесия хромофоров исследуемых белков mcavFP и rfloFP до фотоконверсии (pKA=6,66+/-0,03 и pKA=6,16+/-0,03, соответственно) и после (pKA=6,78+/-0,02 и pKA=6,66+/-0,03, соответственно). Были определены основные фотофизические параметры белков до фотоконверсии и после: коэффициенты экстинкции, квантовые выходы, времена жизни флуоресценции. Было проведено исследование скоростей фотоконверсии и фотообесцвечивания белков mcavFP и rfloFP в сравнении с другими ФКФБ. Показано, что mcavFP и rfloFP имеют большую фотостабильность, яркость и контрастность фотоконверсии, по сравнению с флуоресцентными белками DendFP и Dendra2, а rfloFP имеет самую высокую скорость фотоконверсии.

1. Y.A. Labas, N.G. Gurskaya, Y.G. Yanushevich, A.F. Fradkov, K.A. Lukyanov, S.A. Lukyanov, M.V. Matz, Diversity and evolution of the green fluorescent protein family, ProcNatlAcadSci U S A, 99 (2002) 4256–4261.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ АНТИСТОКСОВЫХ НАНОФОСФОРОВ В РАСТВОРАХ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

А.И. Цареградская[1], А.Д. Воротнов[1], Л. Лианг[3], А.В. Юдинцев[1], Е.Л. Гурьев[1], А.Б. Костюк[1], А.В. Звягин[1,2,3]
[1]Университет Лобачевского, Нижний Новгород, Россия; [2]Первый Московский государственный медицинский университет, Москва, Россия; [3]Университет Маккуори, Сидней, Австралия

В настоящее время наночастицы (НЧ) нашли широкое применение в биомедицине, однако, при их введении в организм человека они немедленно покрываются белками. Адсорбировавшиеся на поверхности НЧ белки, способны влиять на коллоидную стабильность НЧ в биологических жидкостях, которая зависит от pH раствора, концентрации и типа белков, а также поверхностного заряда НЧ. В данной работе методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии было проведено исследование стабильности антистоксовых нанофосфоров (НАФ) в растворах человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). НАФ представляют собой нанокристаллы NaYF4, легированные ионами иттербия и тулия. Для придания частицам положительного и отрицательного поверхностного заряда, они были покрыты полиэтиленимином (НАФ-ПЭИ) и полиакриловой кислотой (НАФ-ПАК), соответственно. НАФ инкубировали с водой, физиологическим раствором и растворами ЧСА, в широком диапазоне концентраций белка, в течение 10 минут при температурах 21 и 37°C. При 21°C инкубация НАФ-ПЭИ и НАФ-ПАК с ЧСА при низких концентрациях белка приводит к уменьшению числа частиц и увеличению их гидродинамического радиуса, что обусловлено агрегацией НАФ и выпадением их в осадок. В то же время при высоких концентрациях ЧСА изменений числа частиц по сравнению с водным раствором не наблюдалось, что говорит о стабильности НАФ. При этом гидродинамический радиус НАФ увеличился на 9,3 нм в случае НАФ-ПЭИ и на 6,4 нм в случае НАФ-ПАК, что вероятно связано с различной ориентацией связывания ЧСА с положительно и отрицательно заряженными НАФ. Таким образом, на поверхности обоих типов НАФ формируется монослой ЧСА. Повышение температуры окружающей среды до 37°C ускоряет агрегацию частиц, при низких концентрациях ЧСА. Увеличение концентрации НАФ-ПЭИ приводит к тому, что концентрация ЧСА при которой

наступает наибольшая агрегация, сдвигается в сторону более высоких значений, что объясняется увеличением свободной площади НАФ, для покрытия которой требуется большее количество молекул ЧСА. В то же время разбавление растворов НАФ-ПЭИ с ЧСА не приводит к восстановлению НАФ-ПЭИ из агрегатного состояния, что говорит о необратимости процесса. *Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (проект № RFMEFI58418X0033) и РФФИ (проекты № 18-29-01055 и № 18-34-00723).*

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ