

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Материалы
XX Зимней молодежной школы ПИЯФ
по биофизике и молекулярной биологии

25 февраля – 2 марта 2019 г.

Гатчина – 2019

В данном выпуске представлены материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии.

Организатор: НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ

Официальные спонсоры: ООО «Компания Хеликон» АО «ПРИБОРЫ»
Beckman Coulter ООО «Диаэм»
Merck BIOCAD

Спонсоры-участники: ООО «Компания «АЗИМУТ ФОТОНИКС»
GE Healthcare
ООО «Спектроника»

Поддержку оказали: Благотворительный фонд им. В. Н. Фомичева
ООО «СБС»
ООО «Аламед»
NanoTemper Technologies Rus LLC
ООО «ИнтерЛабСервис»

Программный комитет:

Председатели:
Саранцева С. В., д. б. н.
Коневега А. Л., к. ф.-м. н.

Вербенко В. Н., д. б. н.
Демин В. А., к. ф.-м. н.
Кириллов С. В., д. б. н.
Лебедев Д. В., к. ф.-м. н.
Пчелина С. Н., д. б. н.
Шабалин К. А., к. ф.-м. н.
Яненко А. С., д. б. н.

Организационный комитет:

Председатель Коневега А. Л.
Заместитель председателя Полесскова Е. В.
Секретарь Полтавская Н. С.

Иванова Т. А.
Лапина И. М.
Никитина Н. В.
Орлова Е. А.
Потапова Т. А.
Халяпин С. В.
Швецова С. В.
Шуленина О. В.

Сборник подготовили: *Коневега А. Л., Лапина И. М., Полесскова Е. В.,
Полтавская Н. С., Толичева О. А., Шуленина О. В.*

Обложка: *Полесскова О. В.*

Примечание: материалы напечатаны в авторской редакции.

ISBN 978-5-86763-426-1

© НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, 2019

Дорогие коллеги!

Организационный комитет рад приветствовать участников и гостей юбилейной XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, которая проходит в пригороде Санкт-Петербурга в загородном отеле «Райвола» с 25 февраля по 2 марта 2019 года.

За полувековую историю Зимних школ ПИЯФ сложилась добрая традиция проведения научной недели вдали от городской суеты, в курортном районе, что позволяет объединить плодотворную работу с интересной культурной программой и неформальным общением. Неповторимую атмосферу Школы, способствующую творческому вдохновению и началу новой дружбы и новых проектов, создают неизменно высокий уровень лекций и заинтересованные слушатели: студенты старших курсов, аспиранты, а также их преподаватели, научные руководители и научные сотрудники российских и зарубежных академических учреждений.

Особое внимание на Школе по биофизике и молекулярной биологии уделяется молодому поколению ученых. Оргкомитет Школы предоставил студентам и аспирантам российских вузов определенные финансовые привилегии, и нам приятно видеть среди участников Школы много молодых лиц.

Научную программу Школы составляют доклады приглашенных лекторов, круглые столы и Молодежная конференция, включающая в себя устные доклады и две стендовые сессии. Все доклады Молодежной конференции участвуют в конкурсе, проводимом при поддержке Благотворительного фонда им. В. Н. Фомичева.

Мы искренне надеемся, что участники и гости юбилейной Школы останутся в равной степени удовлетворены как научной, так и культурной программой, будут тронуты красотой заснеженного Карельского перешейка.

Мы верим, что каждый из участников и гостей Школы увезет с собой не только новые знания, но и творческое воодушевление, что всем нам удастся выполнить намеченную научную программу, инициировать новые проекты и найти интересные научные контакты.

Приглашенные лекторы



Абакумова Татьяна Олеговна

В 2012 г. окончила медико-биологический факультет Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н. И. Пирогова. В январе 2016 года по результатам работы была защищена кандидатская диссертация по теме «Векторные визуализирующие системы для МРТ-диагностики патологических процессов нервной системы». С 2012 по 2017 год Татьяна Олеговна работала старшим научным сотрудником в лаборатории нейрохимии отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «ФМИЦПН им. В. П. Сербского» Минздрава РФ, а также на химическом факультете МГУ им. М. В. Ломоносова. Сфера научных интересов Абакумовой Т. О. связана с направленной доставкой лекарственных и диагностических препаратов в опухолевые клетки, а также патологические очаги центральной нервной системы, созданием контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии. Татьяна Олеговна является автором 14 статей в российских и международных журналах. С 2018 года работает в Центре наук о жизни в Сколковском институте науки и технологий, в лаборатории под руководством Тимофея Зацепина.

Стимул-чувствительные наночастицы для доставки лекарственных препаратов в опухолевые клетки

Абакумова Т. О.

Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

t.abakumova@skoltech.ru

В последние десятилетия область науки, связанная с доставкой лекарств в организме, получила необычайное развитие. Проблема неселективности лекарственных препаратов стала особенно острой с появлением противоопухолевых препаратов. Высокая системная токсичность ограничивает их применение, понижая качество жизни пациента и эффективность терапии. Благодаря развитию нанотехнологий в области доставки лекарств стало возможным получать наночастицы с заданными характеристиками, такими как размер, поверхностный заряд, дисперсионная стабильность, что повышает их

уровень накопления в опухоли. Современные методы позволяют также манипулировать поверхностью наноконтейнеров, конъюгируя их с различными векторными молекулами – активными группами, позволяющими значительно увеличить специфичность контейнеров к определенному типу тканей или клеток. Одним из примеров эффективных векторов могут служить антитела – особые молекулы, специфически связывающиеся с антигеном по принципу ключ-замок. Использование антител против антигенов, характерных для опухолевых тканей, позволяет на несколько порядков увеличить накопление препарата, конъюгированного с антителами, в пораженных тканях. Также одним из способов увеличить селективность воздействия является стимул-чувствительное высвобождение лекарственного препарата из наноконтейнеров. В рамках доклада будут представлены данные, посвященные разработке различных стимул-чувствительных наноконтейнерных систем для доставки лекарственных и диагностических препаратов к патологическим очагам. На конкретных примерах исследований будет продемонстрирована эффективность данных частиц для терапии и диагностики опухолевых заболеваний.

Авдеев Михаил Васильевич

Доктор физико-математических наук. Родился в Пензе в 1972 году. В 1995 году окончил Московский инженерно-физический институт (МИФИ) по специальности «Физика твердого тела». Получил степень кандидата (2002) и доктора (2012) физико-математических наук в Объединенном институте ядерных исследований (ОИЯИ), Дубна, Россия. Исследовательские интересы охватывают различные области структурных исследований с применением методов рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей, в том числе малоуглового рассеяния на сложных многокомпонентных системах (магнитные жидкости, наноглеродные материалы, биологические растворы), рефлектометрию на границах раздела с жидкими фазами (адсорбция наночастиц из коллоидных растворов, электрохимические интерфейсы) и развитие экспериментальных установок по рассеянию нейтронов (установки по нейтронной рефлектометрии и малоугловому рассеянию на импульсном реакторе ИБР-2, ОИЯИ, Дубна). В настоящее время является начальником сектора нейтронной оптики Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка в ОИЯИ. Автор более 160 публикаций и нескольких лекционных курсов в Московском государственном университете, Санкт-Петербургском государственном университете и Государственном университете «Дубна».



Биомолекулы и наночастицы: друзья или враги?

Авдеев М. В.

*Лаборатория нейтронной физики им. И. М. Франка,
Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Московская обл., Россия*

Представлены структурные аспекты взаимодействия наночастиц с биологическими макромолекулами различных видов в жидких суспензиях. Рассмотрены общие вопросы, касающиеся разработки наночастиц для биомедицинских применений, поведения наночастиц в биологических средах и их биосовместимости. Особое внимание уделено структурной характеристике биологических растворов с наночастицами и их кластерами, в том числе с использованием методов рентгеновского и нейтронного рассеяния в рамках комплексных исследований. Даны экспериментальные примеры исследований структурных эффектов наночастиц в биологических растворах, включая углеродные нанокластеры (фуллерены, наноалмазы) и магнитные структуры (нанокристаллы и их ассоциации с белковыми молекулами).



Васильев Вадим Борисович

Доктор медицинских наук, профессор, руководитель Отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург), профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий СПбГУ.

Выпускник 1-го Ленинградского медицинского института, окончил аспирантуру НИИЭМ АМН СССР под руководством члена-корреспондента АМН СССР С. А. Нейфаха. Работал в Лаборатории биохимической генетики ИЭМ, позже вошедшей в состав Отдела молекулярной генетики. Руководит Отделом с 2000 г. В 1992–1999 гг. был приглашенным исследователем в Отделении биологии Падуанского университета (Италия). В разное время был приглашенным лектором в Университете им. Клода Бернара (Лион, Франция) и Университете г. Терамо (Италия). Входит в состав редакционных коллегий отечественных и зарубежных журналов. Область научных интересов: структура и функции белков, митохондриальная генетика, моделирование патологии на животных.

Случается ли наследование митохондриальной ДНК человека по отцовской линии?

Если да, то какие выводы следуют?

*Кидготко О. В.¹, Соколова В. А.¹, Кустова М. Е.¹, Захарова Ф. М.¹,
Рунова О. Л.¹, Васильев В. Б.^{1,2}*

¹ *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

Наследование мутантной мтДНК и ее распределение по органам в ходе пренатального развития имеет ключевое значение для возникновения болезней ОХРОС (от 'oxidative phosphorylation'), вызванных угнетением обмена энергии в пораженных тканях. Патогенез заболеваний неясен, и моделирование на животных могло бы выявить закономерности распределения мутантной мтДНК по тканям. Считается, что мтДНК наследуется только по материнской линии: сперматозоид млекопитающего может привнести в зиготу 1–5 митохондрий, тогда как яйцеклетка содержит их примерно 20000. Мы получили лабораторных мышей из зигот, в которые были инъецированы митохондрии человека. Такие трансмитохондриальные (ТМ) мыши передавали мтДНК человека по материнской линии до 6-8 поколения и далее. Поскольку инъецировались малые количества мтДНК человека, обмен энергии не нарушался, зато чужеродная мтДНК служила надежной меткой для наблюдения за распределением митохондриального генома по клеткам/тканям. В экспериментах она имитировала мутантную мтДНК, выявляя наиболее частые мишени среди органов/тканей. В дальнейшем самцы из потомства четырех ТМ самок стали основателями пяти родословных, в которых отцовское наследование мтДНК наблюдалось в 3-6 поколениях. Предпосылки к сохранению и распределению чужеродной мтДНК, получаемой от отца, были изучены на ранних стадиях эмбрионального развития, т.е. на 1-, 2-, 4- и 8-клеточных зародышах, полученных при спаривании ТМ самцов (F0-F4) с обычными самками. Процент ТМ зародышей среди 1-клеточных был $7.6 \pm 0.76\%$ (92 из 1212), среди 2-, 4- и 8-клеточных доля ТМ зародышей была, соответственно, $8.1 \pm 1.5\%$, $32.4 \pm 5.7\%$ и $30.6 \pm 2.2\%$ (132 из 411). Возрастание доли ТМ зародышей весьма достоверно при вычислении критерия Хи-квадрат с поправкой Йейтса (29.12, $p < 0.001$) и двустороннего критерия Фишера ($p < 0.001$). Это косвенно указывает на репликацию чужеродной мтДНК, начинающуюся еще до стадии бластоцисты. Наши результаты показали, что отцовская мтДНК не обязательно элиминируется из зародыша при первых 1-2 делениях или еще на стадии зиготы, но может сохраняться и передаваться потомству по отцовской линии. Действительно в каждом из поколений всех пяти родословных обнаружены ТМ мыши обоего пола. Эти результаты согласуются с данными других авторов, предложивших

механизм сохранения отцовской мтДНК в зиготе. Полученные данные имеют значение для популяционной этногенетики, судебной медицины и медико-генетического консультирования.



Габибов Александр Габибович

Родился 31 августа 1955 года. В 1977 году окончил химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, кафедру химической энзимологии. В 1977–1997 годах работал в ИМБАН им. В. А. Энгельгардта под руководством Е. С. Северина и А. Е. Браунштейна (стажер-исследователь, младший научный сотрудник, старший научный сотрудник, заведующий Лабораторией химических основ биокатализа). С 1997 года по настоящее время А. Г. Габибов работает в ИБХ РАН – заведующий лабораторией биокатализа, с 2018 года – директор ИБХ РАН.

Область научных интересов: биокатализ, ферменты метаболизма аминокислот, нуклеиновых кислот, иммунохимия, каталитические антитела, аутоиммунные нейродегенеративные заболевания, биотехнология, получение фармацевтически значимых рекомбинантных белков.

В 1982 году защитил кандидатскую и в 1992 году докторскую диссертацию по химическим наукам (специальность 03.00.03 «Молекулярная биология»). Автор более 170 научных статей и глав в книгах. Научный руководитель 6 кандидатских и одной докторской диссертации. Профессор (1996). Член-корреспондент РАН (2003). Академик РАН (2016).

Скрининг биоразнообразия

Габибов А. Г.

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

Комбинаторная химия и биология стали отличительной чертой науки о жизни в XXI веке. Для скрининга больших репертуаров белков и клеточных клонов необходимо разработать чувствительные системы обнаружения новых клонов и создать высокопроизводительные скрининг-платформы. Мы разработали микрофлюидные подходы для скрининга микробиоты, биокаталитических клонов, разнообразия антител и специфических химерных антигенных рецепторов (CAR therapy). Этот подход рассмотрен для эффективного и безопасного лечения фолликулярной лимфомы. Поскольку лимфома обладает клональной злокачественностью, каждая опухоль имеет на поверхности клетки различные специфические антитела. Мы разработали принципы комбинаторного аутокринного скрининга. Из пептидной библиотеки находятся антигенные пептиды к В-клеточным рецепторам на поверхности опухолевых клеток. Выбранные лиганды используются в формате CAR-T (химерных T рецепторов) для перепрограммирования цитолитических лимфоцитов человека (CTL). Методы сверхвысокопроизводительного скрининга могут помочь идентифицировать уникальную функциональность клеток из миллионов вариантов. В *in vivo* варианте мы разработали метод, основанный на одноклеточной инкапсуляции в каплях монодисперсной микрожидкостной двойной эмульсии, вода-масло-вода (MDE). Биосовместимый MDE метод позволяет выращивать капли, содержащие различные клоны. Комбинация капельного оборудования с проточной цитофлуориметрией FACS с последующим полногеномным секвенированием и жидкостной хроматографией-масс-спектрометрическим анализом секретов инкапсулированных организмов дала подробные описания генотипа / фенотипа ряда микроорганизмов. Эта платформа была протестирована с биофармацевтическими препаратами, экспрессированными на поверхности дрожжевых клеток. Было достигнуто обогащение, близкое к теоретическому пределу. Универсальность соединения была идентифицирована как обладающая ингибирующей активностью, включая медленно растущие виды микроорганизмов, которые подавляют рост общего патогена, *Staphylococcus aureus*. Выбор *in vitro* антител из больших репертуаров с использованием комбинаторных библиотек является мощным инструментом, обладающим большим потенциалом для создания акцепторов для токсинов. Мы предложили имитировать стадии созревания антител с помощью виртуального скрининга виртуальных библиотек. Мы достигли этой цели с помощью квантовой механики / молекулярной механики (QM / MM).

При поддержке Гранта Министерства образования и науки Российской Федерации N RFMEFI60716X0145.



Галагудза Михаил Михайлович

В 2000 г. с отличием окончил Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (далее – ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова). После окончания вуза поступил в очную аспирантуру на кафедру патофизиологии ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. В 2002 г. досрочно защитил кандидатскую диссертацию на тему «Сравнительная оценка кардиопротективной эффективности локальной и дистантной ишемической адаптации миокарда» (14.00.16 – патологическая физиология). С 2001 г. занимается педагогической работой на кафедре патофизиологии ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова последовательно в должности ассистента, доцента, профессора. В 2003–2004 гг. находился в долгосрочной научной командировке в Каролинском институте, Стокгольм, Швеция, а затем в Университете Осло, Норвегия.

С 2007 г. – заведующий Научно-исследовательской лабораторией метаболизма миокарда ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова Росмедтехнологий». В 2007 г. защитил докторскую диссертацию на тему «Пре- и посткондиционирование как способы защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения» (14.00.16 – патологическая физиология). В 2009 г. назначен директором Института экспериментальной медицины ФГУ «ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова» Минздравсоцразвития России (ныне ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России).

Научные интересы касаются защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения, клеточной терапии ишемической болезни сердца, направленной доставки лекарственных препаратов с помощью наноразмерных носителей. Участвовал в организации всероссийских и международных симпозиумов и конференций.

Женат, воспитывает дочь.

Защита миокарда от ишемического-реперфузионного повреждения: от Вирхова до наших дней

Галагудза М. М.

*Институт экспериментальной медицины НМИЦ им. В. А. Алмазова Минздрава РФ,
Санкт-Петербург, Россия*

Термин «ишемия» был предложен Р. Вирховым в 1858 г. С тех пор концепция ишемического повреждения претерпела существенную эволюцию и обогатилась множеством новых знаний. В докладе рассмотрены основные исторические вехи формирования представлений о патогенезе ишемического повреждения миокарда и способах предотвращения повреждения. Описаны механизмы пре-, пост- и перкондиционирования миокарда, а также отмечены основные трансляционные барьеры на пути внедрения новых методов кардиопротекции в клиническую практику.

Говорун Вадим Маркович



С 1987 года по настоящее время В. М. Говорун работает в ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России» (с 2015 года по настоящее время – в должности генерального директора). В 1991 году защитил кандидатскую диссертацию по специальности биохимия. В 2000 – докторскую диссертацию по специальностям «биохимия» и «молекулярная биология». В 2003 году В. М. Говоруну присвоено звание профессор по специальности «биохимия». В 2011 году был избран в члены-корреспонденты РАМН. С 2016 года является действительным членом (академиком) Российской академии наук. С 2006 г. по настоящее время – заведующий кафедрой молекулярной и трансляционной медицины МФТИ (г. Долгопрудный). Является автором более 240 научных статей в ведущих международных и отечественных журналах, а также 10 патентов на изобретения. Индекс Хирша составляет 25. Под его руководством защищено 6 докторских и 16 кандидатских диссертаций, а также 25 дипломных проектов.

Бактерии с редуцированным геномом: раскрываем тайны контроля экспрессии генов

Говорун В. М.

Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Mycoplasma gallisepticum S6 относится к бактериям класса Молликут, отличающихся значительной редукцией как самого генома, так и большинства известных систем регуляции. Однако это не мешает ей прекрасно адаптироваться к различным стрессовым воздействиям. Было проведено системное исследование функциональной организации и молекулярных механизмов адаптации бактерии *Mycoplasma gallisepticum* S6 в условиях теплового, окислительного и гиперосмотического стресса, включающее в себя получение подробной функциональной карты генома, транскрипционное, протеомное и метаболомное профилирование. Показано, что тепловой стресс в различных фазах роста бактерии *Mycoplasma gallisepticum* S6 вызывает значительные изменения транскрипционного профиля (538 генов), которые нельзя объяснить с точки зрения известных бактериальных систем регуляции. Получение подробной функциональной карты генома и измерение активности промоторов *Mycoplasma gallisepticum* S6 в условиях теплового стресса позволили установить структуру промотора *M. gallisepticum* и идентифицировать ряд слабых детерминант, совокупное воздействие которых в значительной степени определяет реакцию промотора на тепловой стресс. К таким детерминантам относятся: иницирующий нуклеотид, вариации в последовательности -10 бокса и GC-состав в районе промотора. Сравнительный качественный и количественный анализ представленности белков в условиях теплового стресса показал незначительные изменения белкового профиля, за исключением резкого снижения представленности гемагглютинина VlhA, которое четко коррелирует со снижением его транскрипции. Таким образом, с одной стороны наблюдается значительное изменение транскрипционного профиля, а с другой – отсутствие соответствующего ответа на уровне протеома. Для объяснения этого несоответствия проведено профилирование рибосомально-связанной фракции мРНК и обнаружено избирательное связывание рибосом с мРНК при тепловом стрессе: большая часть синтезируемой в процессе стресса мРНК не связывается с рибосомами, при этом увеличивается представленность мРНК, кодирующей белки, которые блокируют иммуноглобулины.

Таким образом, можно с уверенностью заключить, что *M. gallisepticum*, в которой отсутствует большая часть известных бактериальных систем регуляции экспрессии генов, обладает набором других механизмов, одним из которых является избирательное связывание рибосомы с мРНК. Наблюдаемое

увеличение представленности гемагглютинина VlhA и представленности мРНК, кодирующей белки, блокирующие иммуноглобулины, указывает на связь между ответом бактерии на тепловой стресс и ее взаимодействием с организмом хозяина, при котором она использует механизмы, позволяющие избежать влияния иммунного ответа.

Головин Андрей Викторович



Образование

МГУ им. М. В. Ломоносова.

2014 – д. х. н., биоорганическая химия.

2002 – к. х. н., биоорганическая химия.

1997 – специалист, химия.

Научная деятельность

С сентября 2004 – руководитель группы вычислительной структурной биологии ФББ МГУ им. М. В. Ломоносова.

Основные достижения

Полная структурно-динамическая аннотация минимального гуанинового квадруплекса.

Разработка перспективного лекарственного средства на основе ДНК-аптамера.

Разработка новых реализаций гибридных подходов в молекулярном моделировании.

Разработан новый метод по вычислительному дизайну ферментов из антитела.

Образовательная деятельность

С сентября 2018 – профессор факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М. В. Ломоносова.

Сентябрь 2004 – сентябрь 2018 – доцент ФББ МГУ им. М. В. Ломоносова.

Разработаны учебные курсы

Биоинформатика.

Молекулярное моделирование биополимеров.

Структурная биоинформатика.

Публикации

65 статей.

40 докладов.

Молекулярное моделирование для создания новых ферментов

Головин А. В.

Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Успехи исследования молекулярного многообразия живого порождают гигантские объемы информации. Кажется, что накопленного знания и детального понимания механизмов протекания биологических процессов достаточно для того что бы приступить к созданию полностью искусственных биополимеров с заданной функцией. Тем не менее, информации об успехе подобных инициатив немного, и они носят единичный характер. Причиной этого является высокая сложность функционирования биополимеров. С помощью методов молекулярного гибридного QM/MM моделирования на примере малоспецифичного фермента бутилхолинэстеразы было исследовано разнообразие эффектов, влияющих на эффективность протекания катализа реакции. На основании отработанных подходов моделирования было проведено рациональное улучшение каталитически активного антитела, абзима. Исследование механизма работы и последующее рациональное уменьшение комбинаторной библиотеки позволило, опираясь только на вычислительные подходы, предложить два лучших мутанта для ускорения скорости реакции. Экспериментальная проверка показала, что оба мутанта в 300 раз быстрее оригинального абзима. Примечательно, что мутанты имеют разные механизмы ускорения одной и той же реакции. Отработанная таким образом методология позволяет перейти к рациональному созданию ферментов в рамках скелета антител с заранее заданной функцией. Важной составляющей отбора кандидатных молекул будет проверка этапа нековалентного связывания лиганда. Нами был предложен способ независимого от скоринг функций ранжирования пептидных лигандов при связывании в заданном месте белка. Таким образом, становится реальным создание терапевтически значимых протеаз с заданной специфичностью на основе широко известной молекулы иммуноглобулина.

Горделий Валентин Иванович

Institute of Structural Biology (IBS), Grenoble, France
and Research Center Jülich, Jülich, Germany.



Структура и молекулярные механизмы работы мембранных белков и их импакт на медицину

Structure and mechanisms of membrane proteins and their importance for medicine

Valentin Gordeliy

Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, Université Grenoble Alpes-CEA-CNRS, Grenoble, France;

Institute of Complex Systems (ICS), ICS-6: Structural Biochemistry, Research Centre Juelich, Germany

Membrane proteins are key macromolecules of cells. Their biomedical importance makes them ideal pharmaceutical targets that are covered by about 60% of drugs currently on the market.

Functional membrane proteins are essential for life and health. Many their specific defects are associated with various severe diseases. Structure-based rational drug design and drug optimization rely on atomic resolution of three-dimensional structures of the proteins of interest.

However, some families of membrane proteins have so far resisted high-resolution structure analysis, so that their functional mechanisms have not been clarified.

A major bottleneck of research and development related to membrane proteins is a lack of structural information. It is widely accepted that the major challenges towards determining the structure of a membrane protein is their expression and the growth of well diffracting crystals. We solved some of these problems and this has led to breakthrough in the studies of several families of membrane proteins.

We will discuss two big types of membrane proteins: 1) sensors of two-component signaling system and 2) microbial rhodopsins and their application to optogenetics.

Two-component signaling systems (TCS) is the most abundant signaling system in nature. First component of TCS are membrane sensors which are a major and essential class of transmembrane (TM) receptors, present in all domains of life, such as sensor histidine kinases (HKs), chemoreceptors and sensory rhodopsins. TCS is not present in animals and therefore it is considered as a promising target for drugs against infections. A barrier for the understanding of molecular mechanisms and drug design is a lack of full-length high-resolution structures of this type of proteins. We applied considerable efforts to solve the problem¹⁻⁴, however, we have not reached the final goal yet. We will discuss current state of the field under discussion and the plans to solve the structures of major representatives of TCS transmembrane sensory proteins (including full-length) in the ground and active states.

Photochemical reaction centers and microbial rhodopsins are the only phototrophic mechanisms known to have evolved on Earth. The data suggests that microbial rhodopsin is the more abundant of the two exceeding the reaction center abundance by threefold. Microbial rhodopsins are currently considered to be universal and the most abundant biological light energy transducers. Before the year 2000, only rhodopsins from halophilic archaea have been known. A 2000 metagenomic study resulted in the discovery of a rhodopsin gene in marine Proteobacteria that was, accordingly, named proteorhodopsin (PR). Since 2000, thousands of microbial rhodopsins have been identified, in all three domains of life (bacteria, archaea and eukaryota) as well as in large viruses. The renaissance of rhodopsins as a research field has culminated in the development of optogenetics, the revolutionary method for controlling cell behavior in vivo in which microbial rhodopsins play the key role. Optogenetics is considered as one of 10 major modern technologies. It dramatically advanced neuroscience. Further progress in neuroscience and other scientific fields will be significantly influenced by the success in the discovery and engineering of new optogenetic tools (rhodopsins) to overcome three major limitations: 1) not sufficient ion selectivity of existing tools in firing neurons; 2) the absence of tools, which silence neurons via transmembrane transport of potassium ions, i.e. ions used in native neurons for this purpose; 3) the absence of reliable methods of expressing microbial rhodopsins in desirable membranes (plasma or organelle) of the cells. In several countries (e.g. within "The Brain Initiative" in the USA) new research programs have been established to fill these gaps. Among 7000 identified rhodopsin genes only a few are characterized up to now. The amazing scientific and technological potential of not yet characterized rhodopsins protein engineering and recent results in this field will be discussed in the second part of the lecture⁵⁻¹⁰.

References

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,, Willbold D., G., Büldt G., Popov A. and V. Gordeliy. Mechanism of transmembrane signaling by sensor histidine kinases. *Science* (2017) 356(6342):eaah6345
4. O. Volkov, K. Kovalev, V. Polovinkin, V. Borshchevskiy, C. Bamann, R., Astashkin, E. Marin, A. Popov, T. Balandin, D. Willbold, G. Büldt, E. Bamberg, V. Gordeliy. Structural Insights into Ion conduction by Channelrhodopsin 2. *Science* (2017), doi: 10.1126/science.aan8862.
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 Str.& Mol. Biology* (2015) doi:10.1038/nsmb.3002
6. V. Shevchenko, T. Mager, K. Kovalev, V. Polovinkin, A. Alekseev, J. Juettner, I. Chizhov, C. Bamann, I. Gushchin, V. Borshchevskiy, A. Rogachev, I. Melnikov, A. Popov, T. Balandin, F. Rodriguez-Valera, D.J. Manstein, G. Bueldt, E. Bamberg and V. Gordeliy. Inward H⁺ pump xenorhodopsin: mechanism and alternative optogenetic approach. *Science Advances* 3:e1603187, 2017.
7. 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 (author for correspondence) and A. Popov. Fast iodide-SAD phasing for high-throughput membrane protein structure determination. *Science Advances*, 3(5):e1602952, 2017.
8. 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
9. Kovalev, K, Polovinkin, V., Gushchin, I., Alekseev, A., Shevchenko, V., Borshchevskiy, V., Astashkin, R., Balandin, T., Bratanov, D., Vaganova, S., Rhyzhikov, Yu., Kuklin A., Popov A., Chupin V., Büldt G., Bamberg E., and V. Gordeliy. Structure and Mechanisms of Sodium Pumping Rhodopsin. *Science Advances* (2018) In press
10. Gushchin I. and V. Gordeliy. *Microbial Rhodopsins. Sub-cellular biochemistry* 87, 19-56, 2018 (a review)

Громыко Дарина Вячеславовна



Работает ведущим медицинским писателем в ООО «РД Фарм» с 2015 г., занимается клинической разработкой инновационных онкологических препаратов. Имеет длительный опыт работы медицинским писателем в контрактных исследовательских организациях, занимающихся планированием и проведением локальных и международных клинических исследований.

Ключевыми профессиональными навыками являются: научное консультирование и подготовка планов клинической разработки лекарственных препаратов для регистрации в России и за рубежом (Европейский Союз, США), разработка дизайнов клинических исследований (фазы I-IV), написание основной медицинской документации для проведения клинических исследований (Протокол клинического исследования, Брошюра исследователя, Отчет о клиническом исследовании и др.) в соответствии с международными принципами о «Надлежащей клинической практике» и нормативными требованиями регуляторных органов.

Основное образование – высшее медицинское: врачебный диплом получила в Белорусском государственном медицинском университете (Минск, Беларусь) по специальности «лечебно-профилактическое дело» в 2001 г., квалификацию «врач-педиатр» – в 2002 г. Дополнительное профессиональное образование – защитила степень магистра в молекулярной биологии (2005 г.) и степень PhD (2010 г.) в Университете г. Берген (Норвегия). В 2016 г. завершила 2-летнее дистанционное обучение по программе «Биостатистика» в Институте статистического образования, США.



Деев Сергей Михайлович

Выпускник химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова 1973 года. С 1975 г. работал в Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта, где защитил кандидатскую и докторскую диссертации, заведовал лабораторией инженерии антител ИМБ РАН; с 2000 г. работает заведующим лабораторией молекулярной иммунологии ИБХ РАН. В 2008 г. избран членом-корреспондентом РАН по Отделению нанотехнологий и информационных технологий РАН по специальности «нанобиотехнология». В настоящее время является также профессором МГУ им. М. В. Ломоносова.

Научные интересы С. М. Деева лежат в области физико-химической биологии, нанобиотехнологии и молекулярно-генетической иммунологии. На стыке этих дисциплин эффективно ведется получение рекомбинантных антител и их неприродных аналогов, скаффолдов (аффибоди, дарпинов), с заданными свойствами. В последние годы научным коллективом под его руководством создан ряд гибридных биосовместимых мультифункциональных структур, распознающих опухолевые клетки и несущих агенты для их визуализации и деградации. В них сочетаются материалы органического и неорганического происхождения, что обеспечивает эффективную доставку к патогенным клеткам-мишеням радиоизотопов, флуоресцентных белков, цитотоксических белков, фотосенсибилизаторов, полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек), наноалмазов, коллоидного золота, нанофосфоров, магнитных наночастиц. При этом особое внимание уделяется оптимизации физиологических характеристик создаваемых конструкций с целью увеличения времени циркуляции в кровяном русле, минимизации нежелательного накопления в почках, печени и других органах. Показана высокая эффективность созданных конструкций для диагностики и терапии рака. Включение в состав этих надмолекулярных конструкций антител и их аналогов обеспечивает высокоточное нацеливание, а действующие агенты осуществляют дополнительное воздействие на мишени с помощью внешнего лазерного, акустического и других видов электромагнитного излучения. Это новое поколение мультифункциональных конструкций обладает совокупностью свойств, которые трудно или нельзя использовать по отдельности. Такое комбинированное воздействие на опухоли с помощью нового поколения мультифункциональных конструкций позволяет реализовать принцип «целое есть больше, чем сумма составляющих его частей».

Результаты опубликованы в ~ 250 научных работах, 14 патентах.

Гибридные наноструктуры для онкотераностики

Деев С. М.

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

Развитие молекулярной медицины диктует необходимость разработки новых подходов, обеспечивающих высокочувствительную детекцию и высокоизбирательную терапию злокачественных новообразований. 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, нами был создан ряд соединений, способных специфически доставлять в раковые клетки токсические агенты различной природы – токсины, фотосенсибилизаторы, радионуклиды и др. [1–16].

Точная диагностика патогенных молекулярных мишеней и адресное воздействие на них должны обеспечивать высокую селективность противоопухолевой терапии. Этим практическим задачам отвечает новая медицинская стратегия – тераностика (**терапия+диагностика**), которая объединяет диагностику заболевания и персонифицированное лечение пациента с улучшенной эффективностью и безопасностью. Эффективный тераностический агент должен одновременно обеспечивать следующие возможности: 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.

Современные методы конструирования тераностических агентов основаны на присоединении адресной молекулы к визуализирующему и/или лекарственному компоненту. В случае, когда оба структурно-функциональных модуля представлены белковыми молекулами, они могут быть объединены в единую полипептидную цепь методами генной инженерии. Генно-инженерный подход к конструированию белковых мультифункциональных тераностических агентов позволяет преодолевать целый ряд существенных недостатков традиционных методов химической конъюгации белков: недостаточную воспроизводимость и непостоянство состава конъюгатов, возможное снижение аффинности антитела или эффективности действия токсина, а также наличие примесей неконъюгированных антител и токсина в конечном продукте.

При необходимости адресные и действующие компоненты в генетически кодируемом тераностическом агенте можно варьировать путем замены

соответствующего фрагмента гена, однако эта задача не является тривиальной и требует специальных усилий при конструировании и тщательной проверки конечного продукта. Таким образом, создание каждого тераностического агента всегда представляет собой новое самостоятельное исследование. Нами предложено решение этой проблемы путем создания универсальной модульной платформы, обеспечивающей простоту сборки мультифункциональных комплексов с заранее заданными свойствами из уже имеющегося (готового) набора модулей различной функциональности – направляющих, диагностических, терапевтических.

В лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН была разработана универсальная модульная платформа для конструирования тераностических агентов на основе самосборки гетеромерных надмолекулярных структур с помощью белковой адаптерной системы барназа:барстар [1–3]. Эти белки образуют прочный гетеродимерный комплекс со строгим соотношением компонентов 1:1. С использованием генно-инженерных методов оба белка могут быть объединены с адресными полипептидами, нацеливающими конструкцию на клетки-мишени, флуоресцентными белками, обеспечивающими визуализацию, и с белковыми противоопухолевыми агентами: токсинами, иммунофотосенсибилизаторами, ферментами [4–10]. Возможности модульного подхода к конструированию мультифункциональных гибридных структур была продемонстрирована нами также с использованием наночастиц различной природы, включая коллоидное золото, квантовые точки, магнитные наночастицы, липосомы, люминесцентные наноалмазы и апконверсионные нанофосфоры (UCNP). Последние находят все более широкое применение в оптической диагностике и терапии благодаря уникальному набору физико-химических свойств. Перспективность указанного подхода была недавно продемонстрирована нами *in vivo* на модельных животных с привитыми опухолями аденокарциномы молочной железы человека на примере создания четырехфункционального комплекса, в котором апконверсионные наночастицы (UCNP) несли в своем составе бета-излучающий радионуклид иттрий-90 (^{90}Y), а к их поверхности был присоединен фрагмент псевдомонадного экзотоксина А (PE40) и нацеливающий рекомбинантный полипептид, дарпин, специфически распознающий онкомаркер HER2 [16]. Было показано, что, хотя направленная доставка каждого из токсических агентов по отдельности, ^{90}Y и PE40, давала очень существенный эффект, их комбинация проявилась в синергическом действии (~2200 раз) по отношению к HER2-позитивным опухолевым клеткам. При этом фотофизические свойства самих апконверсионных наночастиц (UCNP) позволили прижизненно методами флуоресцентного имиджинга в «окне прозрачности» биологических тканей визуализировать опухоль. Таким образом, становится возможным в одном мультифункциональном комплексе объединить функции детекции патологического очага, селективного воздействия на него

терапевтического агента и мониторинга ответа на лечение, реализуя принцип «целое больше, чем сумма составляющих частей».

Работа поддержана грантом РФФИ КОМФИ № 17-00-00121 и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий». Работа выполнена с использованием ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018

1. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P. Plückthun A. Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V.21. P. 1486-1492.
2. Kostyukevich Y., Shulga A.A., Kononikhin A., Popov I., Nikolaev E., Deyev S. CID fragmentation, H/D exchange and supermetallization of Barnase-Barstar complex. // *Sci Rep.* 2017. V. 7(1). P. 6176.
3. Shipunova V.O., Zelepukin I.V., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Care A., Sunna A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. Versatile Platform for Nanoparticle Surface Bioengineering Based on SiO₂-Binding Peptide and Proteinaceous Barnase*Barstar Interface // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10. P. 17437-17447.
4. Sokolova E., Guryev E., Yuditsev A., Vodeneev V., Deyev S., Balalaeva I. HER2-specific recombinant immunotoxin 4D5scFv-PE40 passes through retrograde trafficking route and forces cells to enter apoptosis // *Oncotarget.* 2017. V. 8 (13). P. 22048-22058.
5. Semenova G., Stepanova D.S., Deyev S.M., Chernoff J. Medium throughput biochemical compound screening identifies novel agents for pharmacotherapy of neurofibromatosis type I. *Biochimie.* 2017. V. 135. P.1-5.
6. Prokofjeva M.M., Proshkina G.M., Lebedev T.D., Shulgin A.A., Spirin P.V., Prassolov V.S., Deyev S.M. Lentiviral gene delivery to plasmalipin-expressing cells using *Mus caroli* endogenous retrovirus envelope protein // *Biochimie.* 2017. V. 142. P. 226-233.
7. Liang L, Lu Y, Zhang R, Care A, Ortega TA, Deyev SM, Qian Y, Zvyagin AV. Deep-penetrating photodynamic therapy with KillerRed mediated by upconversion nanoparticles // *Acta Biomater.* 2017. V. 51. P. 461-470.
8. Souslova E.A., Mironova K.E., Deyev S.M. Applications of genetically encoded photosensitizer miniSOG: from correlative light electron microscopy to immunophotosensitizing // *J. Biophotonics.* 2017. V. 10(3). P. 338-352.
9. Shilova O.N., Shilov E.S., Deyev S.M. The effect of trypan blue treatment on autofluorescence of fixed cells // *Cytometry A.* 2017. V. 91(9). P. 917-925.
10. Semenova G., Stepanova D.S., Dubyk C., Handorf E., Deyev S.M., Lazar A. J., Chernoff J. Targeting Group I p21-Activated Kinases to Control Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Growth and Metastasis // *Oncogene.* 2017. V. 36. P. 5421-5431.
11. Deyev S., Proshkina G., Ryabova A., Tavanti F., Menziani M.C., Eidelstein G., Avishai G., Kotlyar A. Synthesis, Characterization, and Selective Delivery of DARPIn-Gold Nanoparticle Conjugates to Cancer Cells // *Bioconjug Chem.* 2017. V. 28 (10). P. 2569-2574.
12. Shilova O.N., Shilov E.S., Lieber A., Deyev S.M. Disassembling a cancer puzzle: Cell junctions and plasma membrane as targets for anticancer therapy // *J. Control. Release.* 2018. V. 286. P. 125-136.

13. Mironova K., Khochenkov D.A., Generalova A.N., Rocheva V.V., Sholina N.V., Nechaev A., Semchishen V., Deyev S.M., Zvyagin A.V., Khaydukov E. Ultraviolet phototoxicity of upconversion nanoparticles illuminated with near-infrared light // *Nanoscale*. 2017. V. 9 (39). P. 14921-14928.
14. Vorobyeva A., Bragina O., Altai M., Mitran B., Orlova A., Shulga A., Proshkina G., Chernov V., Tolmachev V., Deyev S. Comparative Evaluation of Radioiodine and Technetium-Labeled DARPIn 9_29 for Radionuclide Molecular Imaging of HER2 Expression in Malignant Tumors // *Contrast Media Mol Imaging*. 2018. V. 2018. P. 6930425. doi: 10.1155/2018/6930425.
15. Deyev S, Proshkina G, Baryshnikova O, Ryabova A, Avishai G, Katrivas L, Giannini C, Levi-Kalisman Y, Kotlyar A. Selective staining and eradication of cancer cells by protein-carrying DARPIn-functionalized liposomes // *Eur J Pharm Biopharm*. 2018. V. 130. P. 296-305.
16. E. Guryev, N. Volodina, N. Shilyagina, S. Gudkov, I. Balalaeva, A. Volovetskiy, A. Lyubeshkin, A. Sen', S. Ermilov, V. Vodeneev, R. Petrov, A. Zvyagin, Zh. Alfërov, S. Deyev Radioactive (90Y) upconversion nanoparticles conjugated with recombinant targeted toxin for synergistic nanotheranostics of cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2018; 115 (39): 9690-9695. doi: 10.1073/pnas.1809258115.



Демиденко Артем Владимирович

Родился в 1979 г. в г. Элиста Калмыцкой ССР. В 1997 г. окончил Элистинский государственный лицей по химико-биологическому направлению. В 2003 г. окончил кафедру физиологии растений биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, по специальности «физиология». Кандидатская диссертация защищена

в ИФР им. К. А. Тимирязева РАН в 2010 г.

Стаж работы в области молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии более 15 лет.

В 2003–2004 гг. работал сотрудником компании ООО «ЛМД» (Лаборатория молекулярной диагностики).

В 2005–2006 и 2010–2011 гг. работал научным сотрудником компании «Институт системной биологии СПб», где принимал участие в проектах по мат. моделированию PK/PD для различных фармкомпаний (GlaxoSmithKline, Pfizer, AstraZeneca и др.).

В 2004–2006 гг. работал научным сотрудником в клинике доктора Волкова (ООО «Эколабмедтест»), в отделе разработки методов определения скрытой пищевой аллергии (IgG4-опосредованная реакция на белковые пищевые аллергены).

В 2006–2007 гг. в рамках гранта Фона содействия малым формам предприятий в научно-технической сфере создал и руководил компанией ООО «Иммунет», производившей ИФА-наборы для определения пищевой аллергии на корма домашних животных.

В 2012–2013 гг. работал научным сотрудником лаборатории регуляции транскрипции и репликации биологического факультета МГУ, созданной проф. В. М. Студитским в рамках «мегагранта» (Приказ правительства РФ № 220 от 9 апреля 2010 года).

С 2013–2014 гг. занимал позицию Postdoc Associate в лаборатории проф. В. М. Студитского в University of Medicine and Dentistry of New Jersey (часть Rutgers University, NJ, USA), затем в Fox Chase Cancer Center (часть Temple University, PA, USA).

С 2014–2017 гг. работал в ФНИЦ ЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, руководил группой по очистке и формуляции препаратов на основе рекомбинантных белков (вакцин, антител, ферментов, гормонов и др.).

В 2017–2018 гг. совмещал должности заведующего лаборатории SkBioLab в технопарке «Сколково» и руководство RnD-группой в одной из инновационных компаний технопарка, ООО «Кномикс» (генотипирование микробиоты человека и пищевых продуктов).

Демиденко А. В. имеет значительный опыт преподавательской деятельности, им были подготовлены и прочитаны курсы лекций в МГУ им. М. В. Ломоносова (в 2010 и 2011 годах) и Томском государственном университете (в 2011 году). Также он неоднократно являлся приглашенным лектором на различных конференциях, школах молодых ученых и семинарах, освещая различные вопросы в области биоинформатики и биотехнологии. Демиденко А. В. автор около 30 научных работ и 2 патентов.

Применение современных хроматографических подходов при выделении и очистке интегральных мембранных белков

Демиденко А. В.

Московский офис GE Healthcare Life Sciences (GE HCLS), Москва, Россия

Artem.Demidenko@ge.com

Мембранные белки играют ключевую роль в фундаментальных биологических процессах, таких как транспорт молекул, передача сигналов,

производство и накопление энергии в виде АТФ/НАД(Ф), а также в поддержании клеточных и тканевых структур. Около 30 % генов, определенных с помощью секвенирования генома, кодируют мембранные белки, и эти белки на сегодняшний день составляют более 50 % мишеней для лекарств. Несмотря на их важность, наши знания о структуре и функции мембранных белков на молекулярном уровне значительно отстают от таковых для растворимых белков [1].

Интегральные мембранные белки существуют в липидной среде биологических мембран (биомембран), но доступные методы их очистки, обработки и анализа были оптимизированы для растворимых белков с использованием водных растворов. Таким образом, чтобы иметь возможность работать с мембранными белками и изучать их, они должны быть диспергированы в водном растворе. Обычно это достигается добавлением детергента, который растворяет биомембрану и образует растворимый в воде комплекс с липидами и мембранными белками [1].

Доклад посвящен сравнению подходов для очистки рекомбинантных интегральных мембранных белков с различными аффинными метками (6His и GST) с использованием 96-луночных фильтр-планшетов – His MultiTrap FF (28400990) или HP (28400989) и GST MultiTrap 4B. (28405500) – для воспроизводимого, высокопроизводительного подбора детергентов и быстрого параллельного скрининга условий очистки [2, 3]. С помощью этой технологии широкий спектр условий хроматографии может быть оценен параллельно для одного или нескольких белков, что оказывает значительное влияние на ускорение разработки или оптимизации протокола очистки. Этот подход может быть полезен как для фундаментальных исследований в области протеомики (в частности, кристаллографии), так и для стадии разработки в фармацевтике или биотехнологии. В исследовании GE HCLS (www.gelifesciences.com) этот подход был успешно использован для оптимизации Capture-стадии для шести различных меченных гистидином мембранных белков [2]. На следующем этапе была проведена масштабная многоэтапная хроматография с использованием хроматографических систем, сорбентов и реагентов GE HCLS [2]. В другом исследовании компании была проведена оценка сохранения ферментативной активности при скрининге детергентов с использованием этого подхода для GST-меченого интегрального мембранного белка E. coli [3].

1. GE Healthcare Handbook "Purifying Challenging Proteins Principles and Methods" 28-9095-31 AA.
2. His MultiTrap FF and His MultiTrap HP. GE Healthcare Data file 11-0036-63 AB.
3. Glutathione S-transferase (GST) Gene Fusion System. GE Healthcare Data file 28-9622-84 AA.

Демин

Вячеслав Александрович



Директор-координатор по направлению «природоподобные технологии» НИЦ «Курчатовский институт».

В начале 2016 г. сформировал коллектив и на его основе организовал создание в Курчатовском комплексе НБИКС-технологий Лаборатории нейроморфных систем, занимающейся разработкой элементной базы нейроморфных систем и аппаратных средств искусственного интеллекта на их основе с использованием комбинаций органических и неорганических материалов и структур.

Летом 2015 г. при участии Демина В. А. в Курчатовском комплексе НБИКС-технологий сформирована Лаборатория безопасности нанотехнологий и наноматериалов, которой В. А. Демин руководил по январь 2016 г.

Ответственный исполнитель или руководитель более 10 научных гос. контрактов, соглашений, грантов.

Область научных интересов: искусственный интеллект, нейроморфные вычислительные системы, мемристоры, импульсные (спайковые) нейронные сети, транспорт наночастиц в биологических и других средах, низкоразмерные структуры.

Количество публикаций в рецензируемых журналах: более 30 (из них 23 – WoS). Количество публикаций в сборниках тезисов докладов конференций: более 40 – в сборниках отечественных и зарубежных конференций.

В. А. Демин является автором лекций учебного курса «Физические методы получения наноструктур», которые он читает в Институте НБИКС-технологий МФТИ.

Лауреат премии им. И. В. Курчатова 2015 г. в номинации «Работы молодых научных сотрудников и инженеров-исследователей» по теме «Разработка, создание и исследование нейроморфных систем на основе органических и неорганических мемристивных устройств».

Диплом II степени Конкурса молодых ученых физического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Искусственный интеллект как основа природоподобной ноосферы

Демин В. А.

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

Искусственный интеллект (ИИ) представлен как основа наступающей качественно новой технологической эпохи – эры «умных» устройств, в плане подражания способам обработки информации человеком. Такие устройства объединяются в единую сеть за счет использования интернет-коммуникаций и современных информационных технологий, в том числе в части обработки «больших данных». Объем данных возрастает экспоненциально, человек принципиально не способен к эффективной обработке такого количества информации, поэтому он вынужден привлечь ИИ к выделению семантически значимой информации из растущего потока данных. Такая концепция образует уже не просто систему «интернета вещей» или «интернета всего», но формирует глобальную систему интеллектуальной обработки и управления информацией, механизированными устройствами, во главе которой стоит человек, принимающий решения на основе делегированной ИИ автономной предобработки больших данных. Предположительно, этот новый способ управления информацией, научными и индустриальными процессами приведет к принципиально новым энерго- и ресурсоэффективности, появлению инновационных товаров и услуг. Эту синергетическую кооперацию человеческого мышления и ИИ можно с полным правом назвать природоподобной ноосферой, о которой говорил В. И. Вернадский.

Будет проанализировано текущее состояние разработок в области ИИ, представлены потенциальные способы достижения уровня развития ИИ, при которых станет возможна указанная глобальная кооперация человеческого и искусственного интеллекта, знаменующая становление новой технологической эпохи – природоподобной ноосферы.

Донцова

Ольга Анатольевна



Окончила химический факультет МГУ. Кандидат химических наук по специальности «биоорганическая химия» с 1991 г. Доктор наук (по той же специальности) с 1997 г. С 1999 г. – профессор биоорганической химии на кафедре химии природных соединений (ХПС) химического факультета МГУ. С 2003 г. – заведующая лабораторией нуклеопротеинов на кафедре ХПС. С 2009 года – заведующая кафедрой ХПС, с 2011 г. – заведующая отделом структуры и функций РНК. С 2016 г. – академик РАН.

С 1999 г. – член кандидатских и докторских советов МГУ; совета РФФИ; орг. комитетов международных конференций в России, русско-французских и русско-немецких конференций, конференций “Ribosome”; сопредседатель секции “RNA World” на конференции FEBS 2013. Член редакционных советов журналов: Biochimie, Acta Naturae, Molek. Biol. (Mosc).

Научные интересы

Лаборатория профессора О. Донцовой изучает структуру и функции РНК-содержащих клеточных машин. Для исследования динамических контактов, образуемых молекулами мРНК и 5S рРНК в ходе трансляции, был разработан метод химических сшивок. Комбинирование технологии химических сшивок, химического «футпринтинга» и методов молекулярной биологии позволило исследовать новые функции E-сайта рибосомы, идентифицировать взаимодействия между функциональными центрами рибосомы, а также проследить за судьбой тмРНК внутри рибосомы. В ходе исследований химических модификаций РНК в рибосоме были обнаружены и описаны несколько новых метилтрансфераз. Это позволило разработать уникальную высокопроизводительную систему скрининга новых рибосомальных антибиотиков. Под руководством О. Донцовой исследуются функциональные свойства и механизмы регуляции теломеразных рибонуклеопротеиновых комплексов, а также роль некодирующей РНК в организации хроматина.

Премии

1994 – премия Европейской академии молодым ученым.

1999, 2000 – Соросовский профессор.

1998–2000 – специальный грант Президента РФ для ученых.

Теломераза и теломеры

*Рубцова М.^{1,2}, Зверева М.¹, Малявко А.^{1,2}, Нарайкина Ю.¹,
Василькова Д.¹, Говорун В.³, Донцова О.^{1,2,4}*

¹ *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия*

³ *Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия*

⁴ *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Теломераза является ключевым элементом системы поддержания длины теломер. В состав теломеразы входит теломеразная РНК, содержащая матрицу для синтеза теломер, обратная транскриптаза, а также вспомогательные белки.

Термотолерантные дрожжи являются модельной системой для изучения теломеразы. Показана способность теломеразы этих переключаться в непротективный режим, что необходимо для поддержания длины теломер, наряду с традиционным, механизмом с помощью теломерных белков. Особенностью данных дрожжей является дупликация гена теломерного белка RAP1, с появлением функции связывания не только с теломерными областями, но и с G-богатыми элементами в промоторах компонентов рибосомы.

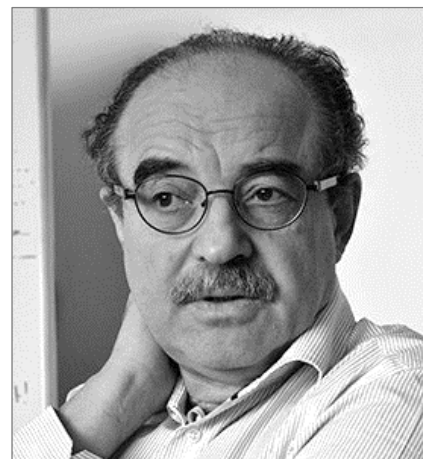
Теломераза является мишенью для поиска ингибиторов, новые ингибиторы на основе РНК позволяют блокировать сборку и функционирование теломеразы.

У человека теломеразная РНК кодирует открытую рамку считывания. Серия независимых экспериментов подтверждает, что белок hTERP экспрессируется в клетке, а gain of function/ loss of function эксперименты показывают, что данный белок защищает клетку от апоптоза, воздействуя на аутофагию.

Процессинг теломеразной РНК проходит с образованием нескольких продуктов и зависит от комплекса Integrator.

Животовский

Борис Давыдович



1989 г. – доктор биологических наук (биохимия, радиобиология). Тема диссертации: «Молекулярные механизмы радиационно-индуцированной программированной гибели лимфоидных клеток».

В 1991 г. по приглашению Шведской королевской академии наук – приглашенный исследователь, Институт медицины окружающей среды Каролинского института (Стокгольм). С 2002 г. – профессор и руководитель отдела токсикологии Каролинского института. В ноябре 2010 г. получил мегагрант Правительства России и организовал лабораторию исследования механизмов апоптоза в МГУ им. М. В. Ломоносова.

В 1987 г. награжден Государственной премией СССР в области науки и техники (золотая Медаль) «За разработку теоретических основ радиационной гибели лимфоидных клеток и их использование для выяснения патогенеза лучевой болезни». Лауреат премии Рене Декарта (Европейский союз, 2006) «За исследование механизмов апоптоза»; Премии «За важные достижения в области исследования гибели клеток» Европейской организации исследования гибели клеток (ECDO, 2012); Премии наиболее цитируемому европейскому исследователю в области токсикологии (2009, 2015) и Премии наиболее цитируемому европейскому исследователю в области клеточной биологии (2015). С 2015 г. академик Европейской академии. В 1999–2007 – генеральный секретарь; 2007–2012 – президент Европейской организации исследования гибели клеток (ECDO). Член редколлегий 16 международных журналов.

Научный интерес: исследование молекулярных механизмов гибели клеток, роль в терапии опухолевых заболеваний.

Автор более чем 340 публикаций по биохимии, радиобиологии и биологии рака. Совокупный индекс цитирования: > 29000; индекс Хирша: 79.

Взаимодействие между различными формами клеточной гибели: способ борьбы с раком

Животовский Б. Д.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия
Каролинский институт, Стокгольм, Швеция*

Программируемая гибель клетки представляет собой физиологический процесс чрезвычайно важный в процессе эмбрионального развития и в зрелом организме для поддержания тканевого гомеостаза. В настоящее время не вызывает сомнений, что клеточная популяция тщательно регулируется процессами пролиферации, дифференциации и гибели. Нарушение любого из этих процессов влечет либо неконтролируемый рост количества клеток, либо неконтролируемую их гибель. Несмотря на то, что нарушение процессов программируемой гибели опухолевых клеток является лишь одним из признаков канцерогенеза, на сегодняшний день основным способом борьбы с онкологическими заболеваниями является активация механизмов гибели клеток. На сегодняшний день научное сообщество признает наличие более десяти различных форм программируемой гибели клеток. Не все из них оперируют одновременно, но взаимопроникновение метаболических путей различных форм клеточной гибели существует, и направленная активация различных взаимодополняющих форм клеточной гибели может служить новой стратегией борьбы с различными заболеваниями, в том числе и со злокачественными новообразованиями. Как пациенты, так и клиницисты надеются на появление нового поколения терапевтических подходов, которые можно будет использовать в лечении рака.

Журавлева Галина Анатольевна



Профессор кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета СПбГУ, доктор биологических наук, член Экспертного совета ВАК по биологическим наукам, зам. редактора журнала Prion (Taylor & Francis). Специалист в области генетики, молекулярной биологии и геномной инженерии. Автор более 60 статей в иностранных и отечественных журналах.

На биологическом факультете ведет научно-преподавательскую деятельность, читая курсы «Генетика прокариот», «Биотехнология и генетическая инженерия», «Онкогенетика и пути сигнальной трансдукции», «Молекулярные основы эволюции».

Роль полногеномного секвенирования в генетике модельных организмов

Журавлева Г. А.

Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

g.zhuravleva@spbu.ru

Целью доклада является обсудить некоторые наиболее интересные данные, полученные с помощью NGS (next generation sequencing) и сопряженных технологий, у ряда модельных организмов, таких как бактерии и дрожжи.

Для бактерий характерно огромное разнообразие как по размеру генома, так и его организации. Примером минимального генома может служить геном археобактерии *Candidatus Parvarchaeum acidiphilum* (45 kB), а максимального – геном *Sorangium cellulosum* (14,7 Mb). Наиболее часто встречаются геномы с размером около 1,5 Mb у бацилл, или 5 Mb у энтеробактерий. Геном бактерий может быть представлен как кольцевыми хромосомами (одиночными или множественными), линейными хромосомами, а также комбинацией обоих типов; клетки могут содержать различное количество плазмид. Речь пойдет о минимальном и «максимальном» бактериальных геномах, механизмах экспансии генома, понятии «бактериальный пангеном». К настоящему моменту ученые успешно синтезировали бактериальный геном и получили живые бактерии, его содержащие (*Mycoplasma mycoides* JCV1-Syn3.0).

Близится к завершению проект по созданию синтетического генома дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – «the Synthetic Yeast Genome (Sc2.0) Project». Этот организм содержит 16 линейных хромосом, геном его является довольно компактным (размер ~ 12Mb, около 6000 генов). В ходе выполнения проекта ученые последовательно замещают 16 дрожжевых хромосом на синтетические хромосомы. К концу 2018 г. было синтезировано и замещено шесть хромосом, синтез оставшихся 10 хромосом практически завершен. Оба проекта (бактериальный и дрожжевой) позволят ответить на множество вопросов, таких как фундаментальные свойства хромосом, основы организации генетического материала у прокариот и эукариот, роль некодирующих последовательностей, минимальное число генов, необходимое для жизнеспособности в различных условиях окружающей среды, эволюция организации генома и т. д.

Другим подходом к изучению организации генетического материала у эукариот является проект по последовательному слиянию 16-ти дрожжевых хромосом в несколько длинных хромосом. В ходе этого проекта ученые удаляли теломерные и центромерные последовательности, что должно было приводить к изменению трехмерной структуры хромосом из-за нарушения внутривнутрихромосомных и межхромосомных взаимодействий, обусловленных теломерами и центромерами. В результате одной группе ученых удалось слить все хромосомы в одну гигантскую линейную хромосому, в то время как другая независимая группа смогла получить жизнеспособный штамм с двумя хромосомами (слить их в одну и сохранить жизнеспособность не получилось). Гигантские хромосомы могли поддерживать жизнеспособность клеток дрожжей, но такие штаммы характеризовались пониженной скоростью роста, нарушением споруляции и т. д.

Ряд современных проектов посвящен рекодированию генома или отдельных его участков. При этом может происходить как редактирование существующего генома, так и полный синтез генома *de novo*. Эти стратегии позволяют изменять существующий генетический код и включать в состав белков неканонические аминокислоты. Подобные проекты уже осуществлены или находятся в процессе выполнения на бактериях *Echerichia coli*, *Salmonella typhimurium* и дрожжах *S. cerevisiae*.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-14-00050.

Згода

Виктор Гаврилович

Заведующий отделом ИБМХ, доктор биологических наук, профессор РАН, специалист в области протеомики и системной биологии.

Основными направлениями научной деятельности Згоды В. Г. являются изучение процессов дифференцировки клеток и решение фундаментальных проблем биологии, связанных с изучением протеома человека; биохимии цитохромов P450 и монооксигеназной микросомальной системы печени.



Протеомика антител. Начало?

Згода В. Г.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва, Россия

Несмотря на то, что антитела пристально изучаются уже более 100 лет, некоторое известно о клональности, первичной структуре переменных доменов, концентрациях и связывающих свойствах моноклональных антител, которые составляют антигенспецифический пул иммуноглобулинов сыворотки крови.

Мощный методический потенциал протеомики мог бы стать хорошим подходом в изучении этого класса белков, однако, анализ литературы за последние 10 лет показывает лишь единичные работы в этой области. Связано это с тем, что необходимым условием идентификации белков анализируемого образца является знание сиквенсов белков. Применительно к антителам, для переменных доменов которых в большинстве случаев аминокислотные последовательности неизвестны, протеомика остается бессильной. Очевидным решением может стать NGS-секвенирование нуклеотидных последовательностей тяжелых и легких цепей антител в пуле выделенных В-клеток костного мозга и селезенки. Последующие создание базы данных на основе NGS секвенирования и протеомный анализ сыворотки крови позволяет идентифицировать последовательности переменных доменов тяжелых и легких цепей, циркулирующих антигенспецифических IgG. Понятно, что подобные опыты с выделением В-клеток не просты, дороги и возможны на экспериментальных животных, но для исследования гуморального иммунного ответа человека данная методика не подходит.

Другим подходом может служить метод секвенирования аминокислотной последовательности *de novo*. Так, относительно недавно с помощью масс-спектрометрического *de novo* секвенирования была идентифицирована аминокислотная последовательность очищенного моноклонального антитела. Несколько позднее были идентифицированы аминокислотные последовательности подмножества антигенспецифических моноклональных антител, тщательно очищенных с помощью аффинной хроматографии.

В докладе будут представлены все аспекты масс-спектрометрического анализа антител с неизвестной структурой переменных доменов антител. Представленные данные получены как из анализа литературы, так и в собственных экспериментах. Также в докладе будут рассмотрены возможности классического bottom up протеомного подхода, приведены протоколы и результаты масс-спектрометрического измерения целых молекул. Также будет представлен новый подход определения первичных структур белков, основанный на подходах деградации белка по Эдману в сочетании с масс-спектрометрическим *de novo* секвенированием.

Каганский Александр Маркович

Director, Principal Research Fellow, and Associate Professor, Centre for Genomic and Regenerative Medicine, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia.



Academic qualifications

Sept 1998 – April 2004: Cytology Institute RAS, St.Petersburg, Russia
Ph.D. in Molecular Biology

Sept 1996 – June 1998: from St. Petersburg Polytechnical University, Russia
MSc in Biophysics

Sept 1992 – June 1996: from St. Petersburg Polytechnical University, Russia
BSc in Biophysics

Employment

September 2017 – now

Director, Centre for Genomic and Regenerative Medicine, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

November 2012 – October 2017

Group leader, Laboratory of Synthetic Epigenetics, MRC Human Genetics Unit, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

November 2010 – October 2012

Senior Postdoctoral Research Associate, Earnshaw Lab, Wellcome Trust Centre for Cell Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

February 2005 – October 2010

Postdoctoral Research Associate, Allshire Lab, Wellcome Trust Centre for Cell Biology University of Edinburgh, Edinburgh, UK

Global Young Academy Member (2015-present)

The GYA provides a rallying point for outstanding young scientists from around the world to come together to address topics of global importance.

Bio2Bio Working Group, founding member, and a co-chair:

<https://globalyoungacademy.net/activities/biodiversity-of-survival-via-biomedicine/>

DIY-Bio Working Group, founding member:

<https://globalyoungacademy.net/activities/diy-synthetic-biology/>

Immediate former member of the GYA executive committee



Кожемякина Наталья Владимировна

Кандидат биологических наук. Доцент кафедры рекомбинантных белков СПХФА. Руководитель отдела биологических исследований компании «Биокад». Отдел отвечает за выбор стратегии аналитики и разработку, оптимизацию, автоматизацию и валидацию биологических тестов, включая тесты на специфическую

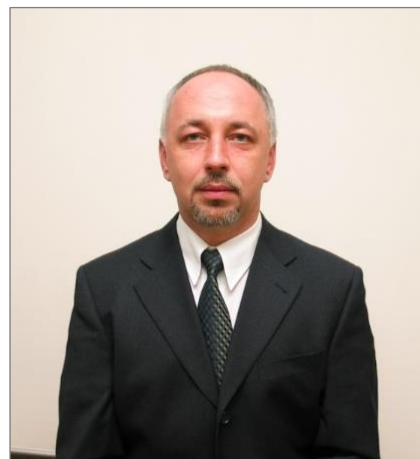
активность для терапевтических продуктов компании на всех этапах разработки.

Биологические исследования: основные подходы к разработке и оптимизации

В презентации представлены основные подходы к разработке и оптимизации биологических тестов, отражающих механизм действия инновационных терапевтических препаратов. Показаны преимущества использования автоматизированных систем при аналитике.

Колб

Вячеслав Адамович



Родился в г. Пинске, Белоруссия. В 1985 г. окончил химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова и был принят на стажировку в лабораторию механизмов биосинтеза белка (руководитель – академик А. С. Спирин) Института белка РАН. По окончании стажировки в 1987 г. принял предложение остаться в лаборатории на должности младшего научного сотрудника. С 2004 по 2018 г. – ведущий научный сотрудник, с 2018 г. – заведующий этой лабораторией. В 2015 г. назначен исполняющим обязанности директора, а в 2017 г. избран на должность директора Института белка РАН.

Преподавательская деятельность связана с биологическим факультетом МГУ им. М. В. Ломоносова. С 1987 по 2018 г. вел на кафедре молекулярной биологии курс «Энзимология трансляции», в 2017 и 2018 гг. прочел семестровый курс лекций по молекулярной биологии. С 2013 г. является заместителем председателя диссертационного совета МГУ03.01 при Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова.

Основные научные результаты

Впервые осуществлена прямая экспериментальная демонстрация котрансляционного сворачивания глобулярного белка.

Показано, что синтезируемый на рибосоме полипептид приобретает структуру биологически активного белка в момент выхода из рибосомы.

Впервые описаны условия, при которых сворачивание синтезируемого полипептида в структуру биологически активного белка может быть завершено прямо на рибосоме, до терминации трансляции и выхода белка в цитозоль.

Продемонстрирована принципиальная возможность котрансляционного сворачивания многодоменного эукариотического белка в бактериальном цитозоле.

Впервые получены количественные данные по экспонированности всех белков на поверхности бактериальной рибосомы.

Предсказан и экспериментально подтвержден механизм ингибирования трансляции антибиотиком микроцином С.

Награды

1) Государственная премия Российской Федерации для молодых ученых за выдающиеся работы в области науки и техники 1997 года (за работу «Котрансляционное сворачивание белков»).

2) Государственная премия Российской Федерации в области науки и техники 2000 года (за работу «Тритиевая планиграфия биологических макромолекул»).

Избранные работы

1. Колб В. А., Спири́н А. С. (1999) Исследование структуры рибосом. В «Тритиевая планиграфия биологических макромолекул», Баратова Л. А., Богачёва Е. Н., Гольданский В. И., Колб В. А., Спири́н А. С., Шишков А. В., ред. Шишков А. В., Наука, Москва, с. 112-129.
2. Kolb V.A., Makeyev E.V., Spirin A.S. (1994) Folding of firefly luciferase during translation in a cell-free system. *EMBO J.*, 13, 3631 – 3637.
3. Kolb V.A., Makeyev E.V., Kommer A., Spirin A.S. (1995). Cotranslational folding of proteins. *Biochem. Cell Biol.*, 73, 1217-1220.
4. Makeyev E.V., Kolb V.A., Spirin A.S. (1996). Enzymatic activity of the ribosome-bound nascent polypeptide. *FEBS Lett.* 378, 166-170.
5. Agafonov D.E., Kolb V.A., Spirin A.S. (1997). Proteins on ribosome surface: Measurements of protein exposure by hot tritium bombardment technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12892-12897.
6. Agafonov D.E., Kolb V.A., Nazimov I.V., Spirin A.S. (1999). A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 12345-12349.
7. Kolb V.A., Makeyev E.V., Spirin A.S. (2000). Co-translational folding of an eukaryotic multidomain protein in a prokaryotic translation system. *J. Biol. Chem.*, 275, 16597-16601.
8. Agafonov D.E., Kolb V.A., Spirin A.S. (2001). Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage. *EMBO Reports*, 5, 399-402.
9. Kolb V.A., Kommer A., Spirin, A.S. (2002). Co-translational protein folding in prokaryotic and eukaryotic cell-free translation systems. In “Cell-Free Translation Systems”, Ed. Spirin A.S., Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, New-York, pp. 123-132.
10. Svetlov M.S., Kommer A., Kolb V.A., Spirin, A.S. (2006). Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family. *Protein Science*, 15, 242-247.
11. Metlitskaya A., Kazakov T., Kommer A., Pavlova O., Praetorius-Ibba M., Ibba M., Krashennnikov I., Kolb V., Khmel I, Severinov K. (2006) Aspartyl-tRNA Synthetase Is the Target of Peptide Nucleotide Antibiotic Microcin C. *J. Biol. Chem.*, 281, 18033-18042.

**Ожидаемое и неожиданное в жизни растущего полипептида:
котрансляционное сворачивание и элонгация в присутствии макролидов**

Колб В. А.

Институт белка РАН, Пущино, Московская обл., Россия

Ранее нами было показано, что биологическая (ферментативная) активность синтезируемого на рибосоме белка может быть обнаружена сразу после ухода полипептидной цепи из рибосомы вследствие терминации трансляции. Поскольку ферментативная активность – свойство правильно свернутого, приобретшего свою уникальную пространственную структуру белка, ее наличие свидетельствует о том, что полипептид сворачивался по мере своего удлинения, находясь на рибосоме. Такое сворачивание называют котрансляционным. Обнаружено также, что котрансляционное сворачивание синтезируемого полипептида может быть завершено прямо на рибосоме, до терминации трансляции и выхода белка в цитозоль: для этого необходимо выдвинуть из рибосомы С-концевой участок растущей полипептидной цепи, добавив к нему дополнительные аминокислотные остатки.

Принято считать, что механизм ингибирования трансляции антибиотиками из группы макролидов состоит в стерическом препятствии, создаваемом связанной в рибосомном туннеле молекулой макролида на пути растущей полипептидной цепи. Ранее показано, что элонгация в присутствии макролидных антибиотиков останавливается на ранних стадиях и в большинстве случаев приводит к выпадению из рибосомы пептидил-тРНК с коротким (пять-десять аминокислотных остатков) олигопептидом. В соответствии с такой моделью, растущая цепь также должна служить препятствием для связывания антибиотиков в туннеле. Действительно, макролиды теряют способность связываться с рибосомой, несущей протяженные растущие полипептидные цепи.

Используя экспериментальный подход, примененный для изучения котрансляционного сворачивания, мы определили минимальную длину растущей полипептидной цепи, при которой транслирующая рибосома становится устойчивой к ингибирующему действию макролидов (способной продолжать трансляцию в их присутствии). Оказалось, что рибосома приобретает такую устойчивость только после достижения растущим полипептидом длины в 31 и более аминокислотных остатков, а не 5–10, когда происходит выбрасывание пептидил-тРНК из рибосомы, связавшей антибиотик. Полученные результаты неожиданны и противоречат принятому объяснению действия макролидов. Очевидно, что находящийся в рибосомном туннеле растущий пептид до определенного момента не является стерическим препятствием для диффузии и связывания антибиотика – растущая цепь поначалу не конкурирует за пространство внутри туннеля с макролидом. В чем же состоит истинный механизм действия макролидов?



Маргулис Борис Александрович

Окончил физический факультет Ленинградского госуниверситета, а в 1971 г. оказался в Институте биологии моря ДВНЦ АН СССР. Биологическая подготовка продолжилась в Институте цитологии РАН в котором работаю до сих пор. В 1977 г. защитил кандидатскую, а в 2001 г. – докторскую диссертации.

В 1990–1993 гг. в течение разных периодов времени работал в Отделе клеточной биологии Университета Уппсалы (Швеция), а в 1994–1997 гг. в должности профессора в Университете Северной Флуминенсы (Бразилия), где участвовал в создании Лаборатории клеточного узнавания. Научная деятельность в разные годы включала изучение функции сократительных белков, роли молекулярных шаперонов в распространенных патологиях, исследования в области молекулярной фармакологии и другие. Исследования, выполняющиеся под моим руководством, поддерживались грантами различных зарубежных фондов, включая Wellcome Trust, INTAS, NorFa, и отечественных фондов, РФФИ и РНФ. Всего опубликовал около 120 статей в международных и российских рецензируемых изданиях. Преподавательская деятельность включала руководство бакалаврских, магистерских и кандидатских диссертаций, число которых за прошедшие годы превысило 50.

Как обычные клеточные белки становятся фармакологическими мишенями?

Маргулис Б. А.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Большинство клеточных белков можно считать потенциальными мишенями для терапевтических средств, и в данном сообщении приводятся несколько примеров того, как ингибирование синтеза или функции шаперонов приводит к снижению опухолевой прогрессии. Другим примером терапевтических мишеней стала глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, фермент, подавление агрегации которого вызывает улучшение признаков таких социально опасных патологий, как болезнь Альцгеймера и Хантингтона. В докладе будут приведены данные о традиционных лекарственных препаратах, области применения которых могут быть расширены в результате дополнительной проверки их эффектов на молекулярные мишени, отличные от ранее выявленных.

Мизгирев Игорь Викторович



В 1979 году окончил биологический факультет Государственного педагогического университета им. А. И. Герцена.

1984 – кандидатская диссертация по специальности 14.00.14 «онкология». НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова Минздрава СССР.

Профессиональный опыт

1981–1991 – НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова Минздрава СССР, младший научный сотрудник.

1991–2007 – НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова Минздрава СССР, старший научный сотрудник.

2007–2013 – Northwestern University, Feinberg School of Medicine, visiting scholar.

2013 – наст. время – НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова, старший научный сотрудник лаборатории канцерогенеза и старения.

Область научных интересов

Экспериментальная онкология, моделирование онкологических заболеваний с использованием рыб *Danio rerio* (зебрафиш), разработка тест-систем для высокопроизводительного скрининга противоопухолевых таргетных препаратов, разработка моделей для доклинического исследования лекарственных препаратов, ксенотрансплантация опухолевых клеток.

Новые *in vivo* модели в онкологии: способны ли рыбы заменить мышей в исследовании рака?

Мизгурев И. В.

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Петрова
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

В последние годы популярной моделью биомедицинских исследований стала пресноводная рыба *Danio rerio*, известная в англоязычной литературе как зебрафиш (zebrafish). Это обусловлено такими биологическими особенностями данного организма, как небольшие размеры (2.5–4 см), короткий жизненный цикл, развитие эмбрионов *ex utero*, прозрачность рыб на ранних этапах онтогенеза, легкость содержания и разведения, а также наличие большого количества мутантных и трансгенных линий. Эти особенности сделали зебрафиш уникальным инструментом для моделирования широко спектра заболеваний человека в диапазоне от редких орфанных генетических болезней до таких социально значимых нозологий, как сердечно-сосудистые, нейро-дегенеративные и онкологические заболевания. В частности, на *D. rerio* создано множество моделей опухолевого роста, основанных как на использовании химических канцерогенов, так и на получении опухолей генноинженерным путем, посредством введения в зиготы рыб векторной ДНК, содержащей различные онкогены под управлением тканеспецифических промоторов. Таким способом были получены эмбриональные рабдомиосаркомы, меланомы, гепатоцеллюлярные карциномы, различные лейкомии и другие типы опухолей. Кроме того, на *D. rerio* были созданы трансплантабельные опухолевые штаммы, ведущие свое происхождение от опухолей, индуцированных у клональных гомозиготных рыб, являющихся генетическими аналогами инбредных линий грызунов. На этой модели было показано, что новообразования рыб имеют все признаки, присущие злокачественным опухолям млекопитающих. В частности, эти опухоли обладали морфологическим сходством с опухолями человека, проявляли способность к инвазивному росту и к образованию отдаленных метастазов, а также демонстрировали чувствительность к химиотерапевтическим препаратам, применяемым в клинической практике. Также в опухолях рыб активировались те же онкогены и контролируемые ими сигнальные каскады, что и в злокачественных новообразованиях млекопитающих и человека. Таким образом онкологические модели, основанные на использовании зебрафиш в качестве экспериментального организма, являются по своим биологическим характеристикам и клиническому течению полными аналогами моделей, разработанных на грызунах. При этом, стоимость экспериментов на зебрафиш существенно ниже стоимости аналогичных исследований на млекопитающих, по причине небольшого размера этого

организма, возможности выполнения многих манипуляций не на взрослых животных, а на эмбрионах и личинках с использованием планшетных технологий, а также меньшей трудоемкости стандартных операций по поддержания рыб в лабораторных условиях.

Минашкин Михаил Михайлович

Окончил медико-биологический факультет РГМУ в 1995 году.

С 1995 по 2008 год работал в лаборатории геной инженерии Института экспериментальной кардиологии, с 2009 по 2015 год – в центре инновационных биотехнологий «Аллель», с 2015 года – специалист по молекулярной биологии в ООО «Диаэм».



Нанопоровое секвенирование и его применение

Диаэм – крупнейший поставщик с 1988 года на рынке лабораторного оборудования и расходных материалов в области молекулярной биологии

Наборы diaGene для выделения ДНК и РНК из биологических образцов на спин-колонках, для очистки фрагментов ДНК после ПЦР. для экстракции ДНК после разделения фрагментов в геле; стоимость выделения – **от 35 руб./образец!**

Реагенты для ПЦР DiaGene – компоненты для ПЦР, наборы и экстра-миксы для ПЦР, маркеры молекулярного веса, ферменты, микробиологические среды для молекулярной биологии, магнитные штативы, репликаторы; отличное качество и привлекательная цена.

Нанопоровые секвенаторы Oxford Nanopore – прямое, быстрое, онлайн секвенирование оцДНК, дцДНК, РНК. Портативный секвенатор **MinION** – одна проточная ячейка, до 512 нанопоровых каналов, простая пробоподготовка 10 мин. Самый высокопроизводительный секвенатор **PromethION** – 48 проточных ячеек по 3000 каналов в одном приборе – более 7 Гб данных.

Высокопроизводительные секвенаторы Ion GeneStudio S5/Plus/Prime, Ion Torrent – простейшая процедура таргетного секвенирования, высокая скорость

и экономичность; от небольших панелей генов или бактериальных геномов до экзоменов и транскриптомов; инсталляция, обучение.

Новый капиллярный секвенатор SeqStudio, Applied Biosystems – золотой стандарт секвенирования по Сэнгеру; 4 капилляра, капилляры теперь в удобном картридже со встроенной помпой, полимером и контейнером с анодным буфером; запуск прибора за считанные минуты; самая привлекательная цена среди капиллярников.

Система для создания нанокapель Nadia, Dolomite Microfluidics позволяет инкапсулировать единичные клетки в нанокapли с зондами и реагентикой для ПЦР; для РНК-секвенирования единичных клеток (scRNA-Seq). **48000 капель за 15 минут, от 1 до 8 образцов.**

Наборы Lexogene для анализа транскриптома – **полнотранскриптомное секвенирование**, построение экспрессионного профиля, амплификация полноразмерной кДНК, выделение РНК, обогащение фракции мРНК и удаление нецелевых фракций РНК, софт для анализа данных RNA-Seq, контрольные РНК – доступные цены и хорошее качество.

96-канальная дозаторы для дозирования в 96-/384-луночные планшеты за считанные секунды; не нуждается в программировании, быстрее многих роботов, легко помещается в ламинарный бокс. **Platemaster, Gilson** – полностью механическая 96-канальная «пипетка». **BenchSmart, Mettler Toledo** – полуавтоматический дозатор с электронным дисплеем.

Экстракторы НК FastPrep MP Bio и TissueLyser Qiagen для извлечения чистых НК из **сложных** образцов – лучший выход неповрежденных НК и белков; до **48** образцов одновременно; возможно охлаждение образцов сухим льдом.

Гомогенизатор ультразвуковой Q800R, QSonica специально для фрагментации НК и хроматина в заданном диапазоне значений длин фрагментов; до **24** проб одновременно в «**обычных**» микропробирках!

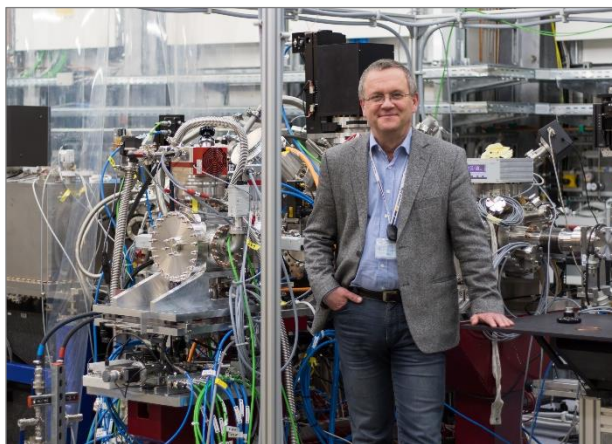
Электрофоретическая системы Qsep, BiOptic – автоматическая платформа для быстрого фрагментного анализа нуклеиновых кислот. Все этапы электрофореза – заливка геля, нанесение образцов, разделение фрагментов, визуализация и анализ результатов, делаются в одном приборе в одну стадию. **От 15 руб. за образец!**

Препаративный электрофорез Sage Science для анализа качества НК и подготовки библиотек – разделение и автоматическое фракционирование фрагментов НК (50–50 000 п. н.) в изолированные ячейки.



Молодцов Сергей Львович

Since 2010 Serguei L. Molodtsov is Scientific Director of the European XFEL. In 1987 he obtained his PhD on “Photoemission Study of Electron-Phonon Scattering in Insulators” at the Leningrad State University and received an Alexander-von-Humboldt



Fellowship for a research stay at the Free University Berlin. This cooperation led to the foundation of the Russian-German Laboratory at BESSY – a highly successful bilateral project that is already in operation for almost 17 years, for the benefits of both countries. After having been research associate at St. Petersburg State University, he moved in 1997 to the Institute for Surface and Microstructure Physics at the Dresden University of Technology, where he became Associate Professor in 2000. In 2001, he also became Leading Scientist at the Russian-German Laboratory at BESSY II. Since 2013, Serguei Molodtsov also holds professorships at the Freiberg University of Technology and the St. Petersburg University ITMO as well as an honorary professorship at the Dresden University of Technology.

<https://www.xfel.eu>

<http://tu-freiberg.de>

European XFEL: Status and Bio-Applications

Molodtsov S.

European X-ray Free Electron Laser, Schenefeld, Germany

serguei.molodtsov@xfel.eu

The European X-ray Free Electron Laser (XFEL) is a new international research installation that is currently under construction and in part in operation in the Hamburg area in Germany. The facility will generate new knowledge in almost all the technical and scientific disciplines that are shaping our daily life - including nanotechnology, medicine, pharmaceuticals, chemistry, materials science, power engineering and electronics. The ultra-high brilliance femtosecond X-ray flashes of coherent radiation are produced in a 3.4-kilometre long European XFEL facility. Most of it is housed in tunnels deep below ground. In its start-up configuration, the European XFEL will comprise 3 self-amplified spontaneous emission (SASE) light sources – undulators operating in energy ranges 3–25 keV (SASE 1 and SASE 2) and 0.2–3 keV (SASE 3), respectively. The world-unique feature of this XFEL is the possibility to provide up to 27.000 ultra-short flashes (10–100 fs) that makes the facility particular suitable for scattering and imaging studies including time-resolved experiments in the range of moderate and hard X-ray photons.

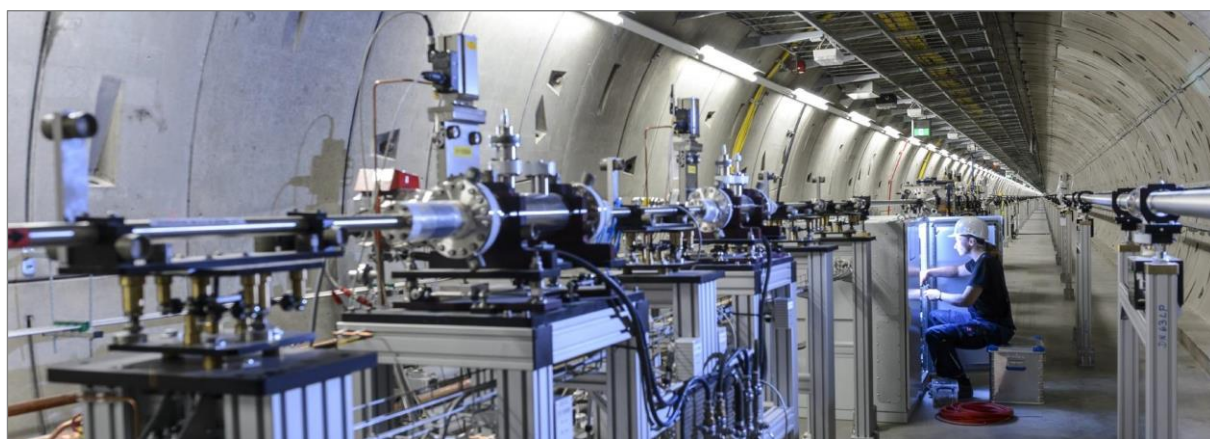


Figure: European XFEL beamline

In this talk an overview of the European XFEL project will be provided and a review of possible bio-applications will be given.

Мягкова Вера Витальевна



Окончила МПГУ им. В. И. Ленина в 2006 г. по специальности «биология» с дополнительной специальностью «химия».

К. б. н. НИИ питания РАМН, 2013 г.

2002–2005 – Московский педагогический государственный университет им. В. И. Ленина / старший лаборант кафедры органической и биологической химии.

2005–2014 – ООО «Сигма-Алдрич Рус».

2014 – по настоящее время – ООО «Мерк».

Продукты и решения компании Мерк для культуральных работ

Мягкова В. В.

ООО «Мерк», Москва, Россия

Компания «Мерк» не только производит классические и инновационные культуральные продукты, но и гарантирует доставку такого важного звена культивирования, как клеточные линии Европейской коллекции аутентифицированных клеточных культур (ECACC). Доставка осуществляется всего за 4-5 дней при строгом соблюдении выбранного Вами температурного режима (сухой лед/жидкий азот), что гарантирует сохранение жизнеспособности. Сайт компании является не только коммерческим (с указанием наличия на складе и цены в рублях с учетом доставки), но пользовательским, поскольку предоставляет необходимую техническую документацию и многочисленные научные статьи, ранее опубликованные на искомую тему, что позволяет учесть нюансы и спланировать свой эксперимент.



Недолужко Артем Валерьевич

Недолужко Артем Валерьевич родился 23 января 1984 года в городе Владивостоке. В 2005 году он успешно окончил биологический факультет Дальневосточного федерального университета (ДФУ), после чего поступил в аспирантуру ФИЦ «Биотехнологии» РАН (Москва). В 2008 году Недолужко А. В. защитил кандидатскую диссертацию.

С 2002 по 2009 год Недолужко А. В. работал в области популяционной генетики диких растений. Начиная с 2009 по конец 2018 года он проводил исследования в области эволюционной геномики и палеогеномики в НИЦ «Курчатовский институт».

В настоящее время Недолужко А. В. занимается изучением роли эпигенетических факторов в эволюции позвоночных, в частности ролью метилирования ДНК при доместикации рыб в Нурландском университете (Норвегия).

Современная геномика для палеобиологии и археологии

Недолужко А. В.

Университет Норд, Норвегия

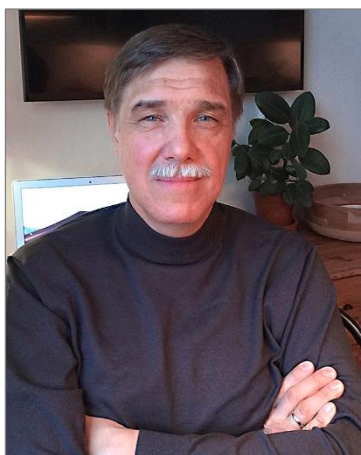
Разнообразие животного мира до сих пор существенно недоизучено, о чем свидетельствует продолжающееся описание новых видов. Тем временем рост хозяйственной деятельности человека зачастую приводит к деградации экосистем, местообитаний и прямому уничтожению множества видов. Появление «черных» книг, куда помещены исчезнувшие животные, а также красных книг – одна из попыток привлечь внимание к этой проблеме, выработать меры охраны редких и исчезающих животных. По данным Всемирного фонда дикой природы (WWF) ежегодно на Земле вымирают порядка 10 000 видов организмов. Кроме того, что такое уменьшение биоразнообразия дестабилизирует экологическое состояние на планете, человечество теряет возможность использовать ресурсы, которые представляли собой вымершие организмы.

С развитием технологий, музейные образцы все чаще привлекаются исследователями для решения ряда фундаментальных и прикладных задач с применением арсенала молекулярно-генетических методов. Выделение и секвенирование ДНК из музейных проб открывает новые возможности,

связанные с прояснением эволюции и филогении уже вымерших или исчезающих видов, собрать пробы, от которых в природе крайне затруднительно. Современные геномные технологии открыли дополнительные возможности для изучения популяционной истории и демографической структуры видов животных. Накопленный опыт в этой области позволяет проводить не только фундаментальные, но и прикладные исследования, направленные на сохранение хозяйственно ценных видов животных, находящихся под угрозой исчезновения, разрабатывая на базе полученных данных селекционные программы для восстановления популяций.

Настоящее исследование показало, что чешуя, плавники, костные останки и даже перья, хранившиеся в музейных коллекциях при комнатной температуре в течение 50–300 лет, являются подходящим источником ДНК для высокопроизводительного секвенирования и для реконструкции митохондриальных и ядерных геномов.

Современные методы экстракции, секвенирования и анализа исторической ДНК позволили реконструировать митохондриальную филогению вымерших и исчезающих форм севанской форели (*Salmo ischchan*), определить филогенетический статус вымерших тонкоклювого кроншнепа (*Numenius tenuirostris*), стеллеровой коровы (*Hydrodamalis gigas*) и сырдарьинского осетра (*Pseudoscaphirhynchus fedtschenkoi*).



Пантелеев Андрей Александрович

Руководитель лаборатории биосовместимых матриц и тканевой инженерии Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт».

Область исследований

Механизмы регенерации тканей млекопитающих и человека; биология кожных покровов (механизмы контроля дифференцировки эпидермиса, барьерная функция, рост волоса и кинетика кожных стволовых клеток, старение кожи, заживление ран, ожогов и трофических язв); биоинженерия эпителиальных тканей.

Область особых интересов

Влияние факторов среды (как специфической тканевой ниши, так и внешних стресс-факторов) на регенеративные способности и механизмы поддержания гомеостаза кожных покровов. Цель исследований – понять, как локальные и внешние факторы среды влияют на регенеративные процессы в коже, и научиться управлять этими процессами. В качестве ключевых факторов микросреды рассматриваются гипоксия (градиент кислорода) и клеточные взаимодействия с межклеточным матриксом (в том числе с искусственным). Зависимость клеточных функций от физико-химических и механических свойств искусственного матрикса используется для создания объемных тканевых эквивалентов на полимерной основе для регенеративной терапии и пластической хирургии.

Индекс Хирша – 30, цитирований (в индексируемых англоязычных журналах) – более 3000.

Образование

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет (1979). Кандидатская диссертация: «Кожная токсикология 2,3,7,8-тетрахлородибензо-р-диоксина» (Институт токсикологии, Санкт-Петербург).

Профессиональный опыт

1979–1984 – младший научный сотрудник Научного отдела Московского зоопарка.

1985–1994 – научный сотрудник Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, Москва.

1989–1991 – работа в составе Совместного Российско-Вьетнамского Тропического центра (Хошимин, Вьетнам) – исследование кожных эффектов действия диоксина.

1994–1995 – научный сотрудник в отделе дерматологии Вирховской клиники, Свободный университет, Берлин.

1996–1997 – научный сотрудник Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, Москва.

1998–2000 – научный сотрудник отдела дерматологии Колумбийского университета, Нью-Йорк, США.

2001–2007 – профессор отдела дерматологии Колумбийского университета, Нью-Йорк, США. Руководитель лаборатории.

2008–2012 – ведущий исследователь и руководитель научной части группы по исследованию рака кожи в Медицинском колледже Университета Данди, Шотландия.

С 2013 года – начальник Лаборатории тканевой инженерии НБИКС-центра НИЦ «Курчатовский институт», Москва.

Награды

1997 – премия фармацевтической компании Stiefel (Мюнхен, Германия) за вклад в изучение кожной токсикологии диоксина и молекулярных механизмов хлоракне.
1997 – стипендия им. Альберта Клигмана для участия в ежегодном съезде Американского общества исследовательской дерматологии (Вашингтон, США).
1998 – премия фармацевтической компании Hermal Corp. за лучшую презентацию на международном конгрессе Обществ исследовательской дерматологии Европы, США и Японии (Кельн, Германия). 1998 – премия за лучшую научную презентацию на Втором всемирном съезде по биологии волоса (Вашингтон, США). 1999 – научная стипендия им. Пола Джанссена от Дерматологического фонда (США) за вклад в развитие исследовательской дерматологии. 1999 – премия Японского общества исследования волоса за работу, представленную на Третьем всемирном съезде по биологии волоса (Токио, Япония). 2003, 2005 – исследовательские стипендии от Дерматологического фонда (США) за вклад в развитие знаний в области биологии и регенерации кожи.

Членство в научных обществах

Society for Investigative Dermatology (USA).

European Society for Dermatological Research (EU).

European Hair Research Society (EU).

Русское общество исследования волос (вице-президент).

Членство в редакционных коллегиях журналов: Journal of Investigative Dermatology, USA (Associate Editor); импакт-фактор журнала – 6.37.

Микроструктура стержня волоса и методы ее оценки

Пантелеев А. А.

*Лаборатория биосовместимых матриц и тканевой инженерии
Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий
НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

Биологии волосяного фолликула человека посвящено значительное количество научных публикаций, оценивающих различные аспекты функционирования этого миниоргана с разных точек зрения – клинической (количество патологий волоса, в том числе, генетических, неисчислимо), биологической (стволовые клетки, морфогенез) и, конечно, косметологической. Однако о продукте волосяного фолликула, собственно о волосе, известно относительно немного. С клинической точки зрения, волосом занимается наука трихология, задачей которой является постановка клинического диагноза и определение методов лечения различных патологий волос человека, при этом механизмы контроля формирования здорового волоса и его тонкая структура не входят в компетенцию этого направления дерматологии. Что касается фундаментальной науки, волосом она практически не интересуется, хотя волос млекопитающих, представляя собой уникальное структурное образование, чрезвычайно интересен с точки зрения биомеханики. Вместе с тем, косметологический (коммерческий) интерес к волосу огромен. С одной стороны, это обуславливает активные исследования волоса научными подразделениями крупнейших косметологических компаний. С другой стороны, коммерческая значимость изучения структуры волоса является причиной того, что большая часть результатов этих исследований остается закрытой для научного сообщества.

В докладе обсуждаются клеточные и молекулярные механизмы формирования стержня волоса и факторы, определяющие основные особенности его формы – длину, толщину и характер его изгибания. Особое внимание уделяется микроструктуре стержня волоса и его кутикулы и современным методам их исследования, включая электронную микроскопию, а также малоугловое рентгеновское и нейтронное рассеяние.

Патрушев Максим Владимирович



К. б. н., заместитель руководителя
Курчатовского комплекса НБИКС-
природоподобных технологий.

Окончил аспирантуру и защитил диссертацию
в ИТЭБ РАН (г. Пущино). Руководил
лабораторией геномных и протеомных
исследований БФУ им. И. Канта (г. Калининград).

Работал директором Института живых систем БФУ им. И. Канта.

Синтетическая биология – можно ли создать искусственную жизнь?

Патрушев М. В.

*Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий
НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

Сегодня мы переживаем едва заметный, но существенный перелом в самой концепции развития биологии: с одной стороны, продолжается реализация биологии как науки наблюдения за живыми системами, а с другой – интенсивно развивается инженерная биология. Все больше работ посвящено конструированию функций в живых системах, главным образом через создание искусственных генетических сетей. Синтетическая биология, зародившаяся в начале 2000-х, суммирует в себе принципы и технологии конструирования таких сетей. За последние годы получена масса интересных результатов, дальнейшее развитие которых может способствовать огромным изменениям не только в фундаментальной биологии, но и в биотехнологии. В рамках доклада будет обсуждено современное состояние исследований в области синтетической биологии, затронуты как фундаментальные, так и прикладные аспекты развития данной области.



Польшаков Владимир Иванович

Ведущий научный сотрудник Лаборатории магнитной томографии и спектроскопии Факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Researcher ID: B-7462-2009

ORCID: 0000-0002-3216-5737

Образование

1981 – МГУ им. М. В. Ломоносова, химический факультет.

1988 – кандидат химических наук, специальность 02.00.03 (органическая химия).

2000 – доктор химических наук, специальность 03.01.04 (биохимия).

Профессиональный опыт

1981–2008 – Лаборатория физических методов, ФГУП «Центр по химии лекарственных средств», от младшего до ведущего научного сотрудника.

1992–1994 – Laboratory of Molecular Structure, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, researcher.

2005–2008 – кафедра химической энзимологии, химический факультет МГУ, профессор.

2008–2010 – Лаборатория молекулярных структур, ОАО «Центр по химии лекарственных средств», зав. лабораторией.

2010 – наст. время – Лаборатория магнитной томографии и спектроскопии, факультет фундаментальной медицины МГУ, ведущий научный сотрудник, зам. зав. лабораторией, профессор.

Педагогический опыт

Руководитель 10 дипломных проектов студентов Московского физико-технического института, химического факультета МГУ и факультета биоинформатики и биоинженерии МГУ. Научный руководитель 4 кандидатских диссертаций.

2000 – наст. время – циклы лекций для студентов и аспирантов химического и физического факультетов МГУ «Спектроскопия ЯМР биомолекул», «Структура белков и нуклеиновых кислот».

2013 – наст. время – курс лекций и семинаров «Принципы конструирования лекарств и создания новых препаратов» для студентов факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова.

Научные гранты

Руководитель 9 проектов РФФИ, проекта РФФ, 2 проектов Министерства образования и науки РФ, 2 грантов на поддержку научной школы от Медицинского института Ховарда Хьюза (США) и международного гранта Wellcome Trust (Великобритания).

Профессиональная деятельность

Автор 21 структуры белков и их комплексов в банке белковых структур PDB, автор 85 статей из списка WoS (Scopus). Индекс Хирша – 17.

Редактор по направлению «молекулярная фармакология» журнала Central European Journal of Medicine, Springer (с 2015 г. Open Medicine, De Gruyter), член редколлегии журнала Frontiers in Molecular Biosciences, член дис. совета Д 002.235.01 при ИМБ РАН и дис. совета МГУ.01.01, эксперт РАН, РФФИ, РФФ, Федеральных целевых программ Миннауки и Чешского научного фонда, член Американского химического общества.

Область научных интересов

Структура и динамика биомолекул, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, белок-лигандные взаимодействия, молекулярная фармакология, ЯМР-скрининг биологически активных соединений.

Спектроскопия ЯМР – инструмент структурной биологии

Польшаков В. И.

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

vpolsha@mail.ru

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса с конца XX века прочно утвердилась в арсенале биофизических методов качестве инструмента определения структуры биомолекул наряду с рентгеноструктурным анализом и криоэлектронной микроскопией. Каждый из методов структурной биологии имеет свои достоинства и ограничения. Современные методы спектроскопии ЯМР позволяют получать информацию о структуре биомолекул, как в растворе, так и в твердом состоянии. Однако спектроскопия ЯМР позволяет получить не только структурные данные, но и информацию о динамике макромолекул с разрешением до отдельных атомов, а также детектировать специфические межмолекулярные взаимодействия. Эти возможности делают спектроскопию ЯМР незаменимым биофизическим инструментом для функциональных исследований белков и нуклеиновых кислот. Возможности спектроскопии ЯМР будут проиллюстрированы в докладе результатами структурно-функциональных

исследований белка Est3 и TEN домена основной каталитической субъединицы теломеразы термофильных дрожжей *Hansenula polymorpha*, а также фактора терминации трансляции eRF1 человека. В докладе будут также рассмотрены основные ограничения метода ЯМР и перспективные направления развития этого метода, расширяющие его потенциал.



Рубцов Николай Борисович

Рубцов Николай Борисович (24.07.1953) с отличием окончил Новосибирский государственный университет (1970–1975). Работал во Всесоюзном научно-исследовательском институте молекулярной биологии (1975–1977). С 1977 по 1980 год учился в аспирантуре Института цитологии и генетики

СО АН СССР. После окончания аспирантуры работал в ИЦиГ СО АН СССР (с 1991 года ИЦиГ СО РАН) в должности младшего научного сотрудника, старшего научного сотрудника, заведующего лабораторией, заместителя директора института по науке. С января 2018 года главный научный сотрудник. Им организован Центр коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. В феврале 1982 года защитил кандидатскую диссертацию, в декабре 1996 года – докторскую диссертации. В 1989 году присвоено ученое звание старшего научного сотрудника, в 2010 году – профессора. С января 1993 по март 1995 года, являясь стипендиатом фонда Александра фон Гумбольдта, работал в Институте генетики человека в Нюрнберге (ФРГ) и в Институте генетики человека и антропологии в Йене (ФРГ). С 2002 года преподает в Новосибирском государственном университете. В настоящее время является заведующим кафедрой цитологии и генетики факультета естественных наук НГУ.

Является членом редколлегии журналов *Molecular Cytogenetics*, «Генетика», «Медицинская генетика», «Вавиловский журнал генетики и селекции», членом Центрального совета ВОГиС им. Н. И. Вавилова, членом специализированных докторских советов при ИЦиГ СО РАН и ГУ ИКИ СО РАН, членом Объединенного ученого совета СО РАН по биологическим наукам.

Разнообразие эукариотических геномов, их полные и сокращенные варианты

Рубцов Н. Б.

*Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии
и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия*

rubt@bionet.nsc.ru

Развитие новых методов анализа генома и организации хромосом эукариот позволило провести сравнительные исследования геномов на межвидовом и внутри видовом уровне, показать, что у некоторых видов значительные изменения генома происходят в ходе онтогенеза. Сравнительный анализ персональных геномов человека выявил миллионы однонуклеотидных замен и вариаций по числу копий участков ДНК как в гетерохроматиновых, так и эухроматиновых участках генома. Показано, что вариации размера генома, обусловленные наличием В-хромосом, у некоторых видов измеряются сотнями миллионов пар нуклеотидов, а направленная элиминация генетического материала в ходе онтогенеза может затрагивать хромосомы, размер которых превышает 100 МВ. Одним из ключевых этапов эволюции генома является полногеномная дупликация, которая у животных обычно сопровождается интенсивной реорганизацией генома, приводящей к его редиплоидизации.

В настоящем докладе рассмотрены механизмы формирования и поддержания геномного на различных таксономических уровнях, а также в онтогенезе, обсуждается его значение для видообразования и макроэволюционных преобразований. В качестве примеров формирования геномного разнообразия рассмотрены результаты наших исследований, посвященных изучению системы В-хромосом животных [1–3], редиплоидизация генома после полногеномной дупликации у свободно живущих червей рода *Macrostomum* [4, 5], и организации хромосом певчих птиц, присутствующих в клетках зародышевой линии, но отсутствующих в соматических клетках [6]. При рассмотрении концепции динамического генома эукариот рассмотрены особенности кариотипической эволюции партеногенетический линий палочников [7].

1. Rubtsov N. B., Borisov Yu.M. *Genes* 9(10), 490 (2018).
2. Jetybayev I. E., et al., *Genes* 9(10), 509 (2018).
3. Makunin A.I., et al., *Chromosome* 127(3), 301 (2018).
4. Zadesenets K.S., et al., *Genes* 8(11), 298 (2018).
5. Zadesenets K.S., et al., *Scientific Reports* 7, 6066 (2017).
6. Torgasheva A.A., et al., <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/09/17/414276>
7. Liehr T., et al., *Genes* 8(11), 327 (2017).



Тоукач Филипп Владимирович

Окончил РХТУ им. Д. И. Менделеева (1998), к. х. н. (2001) в области компьютерной обработки данных ЯМР, доцент (2010), с. н. с. лаб. химии углеводов, Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, руководитель группы разработчиков компьютерного продукта в биоорганической химии.

Основные научные интересы: создание платформы для информатизации гликомики, автоматическая интерпретация спектров ЯМР, база данных природных углеводов как универсальный проект гликоинформатики.

Около 80 статей, индекс Хирша 22, собственный образовательный курс (ЯМР).

Личный сайт: <http://toukach.ru/rus>

Подробный curriculum vitae: http://toukach.ru/files/cv_2018_RUS.pdf

Спектроскопия ЯМР в исследовании структуры биомолекул

Тоукач Ф. В.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

netbox@toukach.ru

Спектроскопия ЯМР является одним из наиболее часто используемых аналитических методов в химии природных соединений. Опыт Всероссийских молодежных школ-конференций по биохимии и биофизике показал, что несмотря на востребованность информации по применению спектроскопии ЯМР для исследования молекулярной структуры, слушатели имеют недостаточно информации по этому вопросу и не могут самостоятельно интерпретировать данные ЯМР в структурном аспекте. Предлагаемая лекция направлена на восполнение этого пробела и является частью цикла лекций, посвященных установлению строения природных полимерных соединений, обладающих регулярной структурой и построенных из остатков (моносахаридов, аминокислот, полиолов и др.).

Лекция посвящена современным методам спектроскопии ЯМР в применении к установлению строения бактериального гликополимера, как характерного примера сложной природной структуры. Дается обзор по наиболее востребованным экспериментам одномерного и двумерного ЯМР [1] (COSY,

TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC и др. на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{31}P), с особым упором на интерпретацию спектров и визуализацию процесса отнесения сигналов. Отдельное внимание уделяется компьютерным инструментам, разработанным на платформе Carbohydrate Structure Database [2] и упрощающим анализ ЯМР данных углеводов. Возможности спектроскопии ЯМР рассматриваются как на примере простого модельного объекта, так и на примере реального проведенного исследования: полного установления строения разветвленного тетрасахаридного повторяющегося звена О-антигена бактерии *Citrobacter freundii* O22 [3]. За время лекции строение этого полимера (мономерный состав, аномерные и абсолютные конфигурации остатков, позиции образования связей, последовательность остатков, модификации остатков и их стехиометрия) устанавливается с применением нескольких разнородных спектров ЯМР.

Предлагаемый материал является обзором образовательной направленности и не содержит новых научных данных. Он включает в себя информацию по существующим методам, активное использование которых стало возможным в последние 10 лет. С иллюстративными материалами можно ознакомиться на странице лекции в Интернете: <http://toukach.ru/rus/nmrglyco.htm>.

1. Claridge T.D.W. "High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry", ed. Claridge T.D.W. – Boston: Elsevier, 2016.
2. Toukach Ph.V., Egorova K.S. - Nucl Acids Res 2016, 44(D1): D1229-D1236.
3. Katzenellenbogen E., Kocharova N.A., Toukach F.V., Górska S., Korzeniowska-Kowal A., Bogulska M., Gamian A., Knirel Y.A. - *Carbohydr Res* 2009, 344(13): 1724-1728.



Шевцов Максим Алексеевич

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории защитных механизмов клетки Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Окончил Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова. М. А. Шевцов занимается разработкой новых подходов в лечении онкологических заболеваний с применением нанотехнологий, методов молекулярной биологии и иммунотерапии. Является членом Европейской ассоциации лечения рака (EACR), Европейского нейро-онкологического общества (EANO) и Общества иммунотерапии рака (SITC).

Мебрано-связанный белок теплового шока Hsp70 в качестве мишени для диагностики и терапии злокачественных опухолей

Шевцов М. А.¹⁻⁴, Николаев Б. П.⁵, Яковлева Л. Ю.⁵, Марченко Я. Ю.⁵, Рыжов В. А.⁶, Мультхофф Г.⁴, Гужова И. В.¹, Маргулис Б. А.¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Российский нейрохирургический институт им. проф. А. Л. Поленова – филиал НМИЦ им. В. А. Алмазова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Технический университет Мюнхена, Мюнхен, Германия

⁵ Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

⁶ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

shevtsov-max@mail.ru

70 кДа белок теплового шока (Hsp70) часто экспрессирован на поверхности мембраны раковых клеток (но не трансформированных клеток), что делает его потенциальной мишенью для разработки современных диагностических и терапевтических подходов в онкологии [1]. Полученные приведены данные о традиционных лекарственных препаратах, области применения которых могут быть расширены в результате дополнительной проверки их эффектов на молекулярные мишени к Hsp70, которые включают в

себя моноклональные антитела, пептид TPP (tumor-penetrating peptide) и рекомбинантный белок гранзим В, продемонстрировали специфичность распознавания Hsp70-положительных раковых клеток [2]. Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (SPIONs) в силу своих уникальных физико-химических свойств могут выступать в качестве контрастных агентов, с одной стороны, для раннего выявления новообразований, а с другой стороны – для доставки противоопухолевых препаратов [3, 4]. Системное введение конъюгатов таргетных агентов к Hsp70 с магнитными наночастицами позволило добиться ранней диагностики новообразований с применением магнитно-резонансной томографии (МРТ) в доклинических моделях опухолей (опухоль головного мозга человека U87, рак легкого человека A549, и т.д.) [5]. В свою очередь, применение конъюгатов гранзима В с наночастицами (GrB-SPIONs) приводило к замедлению прогрессии опухолей и, как следствие, к увеличению выживаемости животных за счет про-апоптотической активности гранзима. Комбинация наночастиц направленных к Hsp70 (в частности, GrB-SPIONs) с иммунотерапевтическими антителами (анти-PD-1, анти-CTLA-4) приводила к выраженному терапевтическому эффекту в клинически-значимых моделях раковых заболеваний у животных. Дальнейшая разработка мишеных препаратов против Hsp70-положительных опухолей является перспективным направлением в трансляционной и клинической онкологии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-08-00024.

1. Shevtsov M., et al., *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1738,373 (2018).
2. Stangl S., et al., *Cancer Res.* 6268-6281,78 (2018).
3. Shevtsov M., Multhoff G. *Curr Drug Metab.* 737-744,17 (2016).
4. Shevtsov M., Multhoff G. *Nanotechnologies in preventive and regenerative medicine: an emerging big picture.* Elsevier. Book Chapter. P. 487-511 (2017).
5. Shevtsov M., et al., *Nanoscale.* 20652-20664,7 (2015).



Фирсов Михаил Леонидович

1985 – окончил физико-механический факультет Ленинградского политехнического института.

1985–1988 – обучение в аспирантуре ИЭФБ им. И. М. Сеченова РАН, с 1988 – научный сотрудник ИЭФБ РАН.

1991–1994 – postdoctoral training, University of Michigan.

1998 – visiting professor, University of Boston Medical School.

2001–2003 – visiting professor, Helsinki University of Technology (Aalto University).

С 2013 г. – заведующий Лабораторией эволюции органов чувств ИЭФБ РАН.

С 2015 г. – директор ИЭФБ РАН.

И слепые прозреют: успехи и провалы в протезировании сетчатки оптогенетическими методами

Фирсов М. Л.

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

Тяжелые дегенеративные заболевания сетчатки, такие как пигментный ретинит и другие, в большинстве случаев приводят к полной слепоте и почти не поддаются лечению. В результате относительно медленно протекающих дегенеративных процессов, фоторецепторные клетки сетчатки погибают, в то время как вторые и третьи нейроны остаются относительно интактными и функциональными. К настоящему времени разработано несколько стратегий протезирования такой дегенерирующей сетчатки с использованием оптогенетических методик. Основная идея такого протезирования состоит в превращении либо вторых, либо третьих нейронов в псевдофоторецепторы путем придания им свойства светочувствительности.

За прошедшее десятилетие на мышинных моделях с дегенерированной сетчаткой была показана принципиальная возможность такого протезирования всех клеточных типов сетчатки и создания в этих клетках устойчивой, на интервале многих месяцев, чувствительности к свету. Настоящая лекция будет посвящена как описанию этих несомненных успехов, так и серьезным проблемам, с которыми сталкивается идеология оптогенетического протезирования сетчатки, среди которых низкая чувствительность к свету

протезируемых клеток, низкая селективность и эффективность вирусных конструкторов, различная специфичность вирусных конструкторов к здоровой и дегенерированной сетчатке, к мышинной и человеческой сетчатке, и другие.

Ralf Biehl

Senior Scientist at the Jülich Centre for Neutron Science & Institute for Complex Systems.

Research Interests

Protein large scale structure and dynamics using neutron scattering techniques.

Proteins are the molecular machinery of life.

As nanomachines of metabolism, they are in every cell of our body tirelessly active, transport, synthesize, divide and transform substances. To perform protein function structural changes are often important.

Neutron Spin Echo Spectroscopy (NSE) is a versatile tool to investigate large-scale movements on the 1 to 200 nanosecond timescale on different length scales with the ability to determine the relaxation time and amplitude of the motions. In combination with other inelastic NS techniques, SANS/SAXS and NMR structure and function of proteins can be enlightened on the natural size- and time-scale of these macromolecules.

The general interest is to identify functional domain motion and characterize timescale and amplitudes by combining SANS/SAXS with NSE. In recent studies we found large-scale collective motions of domains in yeast alcohol dehydrogenase and phosphoglycerate kinase or the immunoglobulins IgG, observed protein dynamics in crowded environment with a trapped motion on short length scales, that polymer conjugates have no influence on protein structure and domain motion or that confinement in SBA-15 stabilizes protein solutions.

Curriculum Vitae

1990–1997 – study physics at the University of Kaiserslautern.

1996 – Diploma with Prof. H. Oechsner, Institute for Surface and Thin Film Analysis, University Kaiserslautern.

1997–2002 – Ph.D. with Prof. T. Palberg, University Mainz, Colloidal physics.

2002–2008 – PostDoc with Prof. D. Richter, Institute for Neutron Scattering, Science Center Jülich, Germany.

2008 – Staff scientist at the Jülich Centre for Neutron Science.

2014–2018 – Member and Chair Subcommittee 8 “Biology”, ILL, Grenoble.



Small Angle Neutron Scattering and Neutron Spin Echo Spectroscopy: Accessing Protein Shape and Internal Dynamics

Ralf Biehl

*Jülich Centre for Neutron Science JCNS (JCNS-1) & Institute of Complex Systems (ICS-1),
Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Germany*

ra.biehl@fz-juelich.de

The biological function of proteins is often related to configurational changes and large-scale domain motions, which are induced or suppressed by the binding of a substrate or due to cosolvents. Domain motions can be related to soft hinges, flexible linker regions or -as in the case of intrinsic unfolded proteins- be native to the unfolded protein structure. These large-scale domain motions in solution cannot be observed by X-ray crystallography or NMR spectroscopy. Small angle scattering (SAS) by X-rays or neutrons in combination with neutron spin echo spectroscopy (NSE) in solution can be used to observe configurational changes and equilibrium dynamics between functional domains on 1-100 nanosecond timescale.

After a short introduction to SANS and NSE I present here examples for different types of motions related to the structure of proteins and bioconjugates. Thermal unfolded Ribonuclease A shows polymer like dynamics despite the 4 disulfide bonds restricting the degrees of freedom. Phosphoglycerate kinase shows a clear hinge motion between the main domains. PEGylation seems not to influence domain motion but adds additional internal dynamics in the protein-polymer complex. Immunoglobulin 1 (IGG1) presents a strong dynamics due to the short linkers connecting the Fc with the Fab domains.

1. Inoue, R.; Biehl, R.; Rosenkranz, T.; Fitter, J.; Monkenbusch, M.; Radulescu, A.; Farago, B.; Richter, D. *Biophys J.* 99, 2309 (2010).
2. Ciepluch K., Radulescu, A., Hoffmann I., Raba, A., Allgaier, J., Richter D., Biehl R., *Bioconjugate Chemistry*, 29, 1950 (2018).
3. Stingaciu, L. R.; Ivanova, O.; Ohl, M.; Biehl, R.; Richter, D. *Sci. Rep.* 2016, 6, 22148.

Tobias Schrader

Senior Scientist at the Jülich Centre for Neutron Science,
Outstation at MLZ in Garching, Germany.



Research Interests

High resolution protein structures.

Knowing the three dimensional structure of a protein is a pre-requisite for understanding its function. Protein x-ray crystallography is a well established tool to obtain structural information on proteins. However, with x-rays as probes the position of hydrogen atoms can hardly be seen. Here, neutron scattering on protein crystals opens up the possibility to locate hydrogen atoms even at moderate resolutions of 2 Å. Therefore, in collaboration with the FRM II in Garching the BIODIFF, a dedicated instrument for neutron protein crystallography is operated in the framework of the MLZ (Heinz Maier-Leibnitz Zentrum). The additional information gained with neutron protein crystallography is for example the identification of unusual hydrogen bonds, the protonation state of side chains and the solvent structure around the protein, just to name a few.

Investigation of protein crystallisation with respect to the growth of large (mm³) sized protein crystals.

Unfortunately, large protein crystals are required for the method of neutron protein crystallography. In order to grow these large crystals, detailed knowledge on the phase diagram of the corresponding protein is required. Also, more understanding of the processes involved in crystallization is desired. Among other techniques, neutron small angle scattering in combination with in-situ dynamic light scattering and quasi-in-situ static light scattering is especially well suited to follow the crystallization process in real time.

Dedicated effort is put into the development of such techniques to provide more information on the crystal nucleation and growth process of large protein crystals.

Curriculum Vitae

1972 – born in Kaufbeuren, Germany.

1993–2000 – Study of Physics at the Ludwig-Maximilians-University of Munich.

1999–2000 – Diploma Thesis “Kraftspektroskopie an polymeren Farbstoffsystemen” with Prof. Dr. H. E. Gaub.

2001–2008 – Ph.D. with Prof. Dr. W. Zinth, Ludwig-Maximilians-University of Munich: “Structural Dynamics of a Photo-switchable β -Hairpin Model Peptide”.

2008–2009 – Post-Doc position at the Chair for BioMolecular Optics: Ultrafast X-ray structural analysis of dynamics in molecular crystals. (Supervisor: Dr. M. Braun).

2009 – now – Staff scientist at the Jülich Centre for Neutron Science, Instrument Responsible for the instrument BIODIFF, Lab responsible for the Biology Lab.

Neutron Protein Crystallography: New Developments and Recent Application Examples

Schrader T. E.

*Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich Centre for Neutron Science at MLZ,
Garching, Germany*

t.schrader@fz-juelich.de

With the advent of new instruments (e. g. Imagine at HFIR, MANDI at SNS and BIODIFF at FRMII) neutron protein crystallography has seen a resurrection from the past pioneering work by Goldstein. New sample environment options at the instruments and a growing user community have greatly enhanced the outcome of the existing neutron diffractometers optimized for large unit cells. Measurements at 100 K in a nitrogen gas stream (cryostream) are now routinely possible at neutron diffractometers. Efforts to increase the flux at the sample position and to reduce the background at the detector enables one to measure smaller and smaller protein crystals down to 0.1 mm³ in volume.

The neutron single crystal diffractometer BIODIFF at the research reactor Heinz Maier-Leibnitz (FRM II) is especially designed to collect data from crystals with large unit cells. The main field of its application is the structural analysis of proteins, especially the determination of hydrogen atom positions. BIODIFF is a joint project of the Jülich Centre for Neutron Science (JCNS) and the FRM II. BIODIFF is designed as a monochromatic instrument with a narrow wavelength spread of less than 3 %. To cover a large solid angle the main detector of BIODIFF consists of a neutron imaging plate in a cylindrical geometry with online read-out capability. With a radius of 200 mm and a height of 450 mm it covers a solid angle of approximately 2π with a spatial resolution of up to 125 μm . An optical CCD-camera pointing at the sample position is used to quickly align the sample with respect to the neutron beam. The main advantage of BIODIFF is the possibility to adapt the wavelength to the size of the unit cell of the sample crystal while operating with a clean monochromatic beam that keeps the background level low. BIODIFF is equipped with a standard Oxford Cryosystem “Cryostream 700+” which allows measurements in the temperature range from 90 K up to 500 K. A new kappa goniometer head was added recently. This allows an automated tilting of the crystal in order to increase the completeness of the data set when recording another set of frames in the tilted geometry without the need to take the crystal off from the goniometer head. Typical scientific questions addressed are the determination of protonation states of amino acid side chains in proteins and the

characterization of the hydrogen bonding networks between the protein active centre and an inhibitor or substrate.

One application example is the improvement of antibiotic drugs. Many bacteria secrete a protein called β -lactamase into their environment. This protein is able to hydrolyse the four membered carbon atom ring in β -lactam antibiotics. These antibiotics are thereby destroyed and are not harmful to the bacteria any more. This mechanism causes great problems in hospitals. With neutron protein crystallography we were able to find a deuterium atom at the amino acid side chain glutamate 166 in the β -lactamase protein carrying a transition state analogue. This transition state analogue stops the enzymatic reaction in its first acylation step. Thereby one could identify glutamate 166 as the important base taking over the hydrogen atom in the acylation step. Improved antibiotics should find ways to bind to this side chain in order to prevent its action as a base. Or, an additional drug has to be given which blocks the β -lactamase protein efficiently such the antibiotics can work effectively.

Jens Waldeck

Dr. Jens Waldeck is working for Bruker BioSpin MRI GmbH as EIMEA Application and Sales Manager in the field of PreClinical Imaging (PCI).

As Application Manger in the field of the *in vivo* optical and PET/SPECT/CT imaging he leads and coordinates imaging trainings, workshops, seminars and research projects. Before joining Bruker he was holding a Senior Application Manager position at Carestream Molecular Imaging/Carestream Health to give support to the European and global market for both *in vivo* and *in vitro* optical and nuclear (preclinical) imaging products as well as Head of the lab at the University Hospital Muenster, Germany.



The Beauty and the Beast: *In Vivo* Applications Vs. Animal Radiation Dose Limitations

Jens Waldeck

Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Germany

Radiation doses in animals and tissues due to the usage of X-rays or beta/gamma rays can seriously effect biology and thus hamper scientific conclusions. What is true for (ancient) DNA during the evaluation of sub-fossil bones [1], stays relevant when using *in vivo* imaging approaches [2, 3].

Both Computed Tomographic (CT) as well as Nuclear Molecular Imaging (NMI) methods offer non-destructive imaging capabilities, allowing to longitudinally follow-up disease, therapeutic and theragnostic animal models *in vivo* and in a biological relevant environment without having the need to sacrifice animals at every given and needed timepoint. Following at least the paradigm of the 3Rs by reducing the amount of used animals by a factor of 60-95% should not be hampered by the fact that these animals are exposed to radiation doses [4]. Thus, “refining” the dose is not only in line with the 3Rs, but also a needed consequence to obtain biological relevant and unshakable scientific results.

In the past, high resolution micro-CT (μ CT) often exceeded the recommended radiation dose (Gray) per day (< 1 Gy/d), while *ex vivo* μ CT applications often applied several hundreds or even thousands Gray to the scanned specimens leading to DNA degradations. However, the usage of specialized cameras [5], specially designed low does X-ray filters [6], and highly precise capturing methods [7], in combination with optimized scanning protocols allow the usage of μ CT *in vivo* and *ex vivo* without limitations to the Signal-to-Noise Ratio (SNR) but at a reduces dose, and thus subsequently no limitations in the image quality and image analysis capabilities.

Next to μ CT animals obtain radiation doses in Nuclear Molecular Imaging applications due to usage of SPECT (Gamma) and PET (Beta, Gamma) emitting tracers. While SPECT is limited to higher doses due to the presence of collimators, PET applications severely benefited in the past years from the implementation of high-sensitive and high-resolution silicon Photomultiplier (siPM) techniques [8]. Animals benefit from the application of low and ultra-low PET doses during scans without sacrificing the relevant information. In addition, siPMs are MRI compatible (Magnetic Resonance Imaging) [9], and thus replacing standard CT techniques more and more often, and thus eliminating the CT dose. Next to this, the uniquely used monolithic crystal silicon PET (siPET) detector design allow for measuring real-time on the chip Depth of Interaction (DOI) measurements, which results in full field accuracy PET data readouts [8, 9]. Subsequently, this allow the uncompromised usage of multiple animals in simultaneous PET/MR applications [10,11]. This unique functionality not only fosters high-throughput, low dose applications but offers also the ability to compensate for

motion artefacts by the patented self-gating navigation technique called IntraGate/PolyGate [12]. This breakthrough in technology and software clearly open up the possibilities how animals could be imaged faster with lower doses by gaining more relevant information than ever before, and thus turning finally the beast into a beauty.

1. Immel A, Le Cabec A, Bonazzi M, Herbig A, Temming H, Schuenemann VJ, Bos KI, Langbein F, Harvati K, Bridault A, Pion G, Julien MA, Krotova O, Conard NJ, Münzel SC, Drucker DG, Viola B, Hublin JJ, Tafforeau P, Krause J. Effect of X-ray irradiation on ancient DNA in sub-fossil bones - Guidelines for safe X-ray imaging. *Nature Sci Rep.* 2016 Sep 12;6:32969. doi: 10.1038/srep32969.
2. Laperre K, Depypere M, van Gastel N, Torrekens S, Moermans K, Bogaerts R, Maes F, Carmeliet G. Development of micro-CT protocols for in vivo follow-up of mouse bone architecture without major radiation side effects. *Bone.* 2011 Oct;49(4):613-22. doi: 10.1016/j.bone.2011.06.031.
3. Marien E, Hillen A, Vanderhoydonc F, Swinnen JV, Vande Velde G. Longitudinal microcomputed tomography-derived biomarkers for lung metastasis detection in a syngeneic mouse model: added value to bioluminescence imaging. *Lab Invest.* 2017 Jan;97(1):24-33. doi: 10.1038/labinvest.2016.114.
4. Molinos C, Sasser T, Viertl D, Berr S, Kundu B, Gsell W, Bahadur A, Stark S, Correcher S, van Wyk S, Prior J, Himmelreich U, Heidenreich M. Performance of a new preclinical PET/CT system for quantitative total-body dynamic imaging with low tracer doses. *ISRS.* 2019.
5. Laperre K, Salmon P, Sasov A. Characterization of 3D spatial resolution of the Skyscan 1276 *in-vivo* MicroCT System. 2018 Bruker microCT Method Note.
6. Sasov A, Hostens J. X-ray CT apparatus with a filtering element exhibiting a maximum absorption at its center. 2016. EP 2997899A1. Patent.
7. Laperre K, Salmon P, Sasov A. Spiral Scanning. Bruker microCT Method Note MN106.
8. Gonzalez AJ, Aguilar A, Conde P, Hernandez L, Sanchez F, Moliner L, Vidal FL, Barbera J, Correcher C, Molinos C, Morera C, Lankes K, Junge S, Bruckbauer T, Benlloch J. Next generation of the Albira small animal PET based on high density SiPM arrays. 2015. 1-4. 10.1109/ NSSMIC.2015.7582085.
9. Gonzalez AJ, Aguilar A, González A, Correcher C, Conde P, Molinos C, Lankes K, Junge S, Benlloch MJ. A PET detector ring with homogenous spatial resolution in the presence of a magnetic field. 2015. 1-4. 10.1109/ NSSMIC.2015.7582090.
10. Sasser T, Attarwala A, Frederick E, Molinos C, Heidenreich M. General Considerations and Applications Strengths of Preclinical PET/MR in Oncology Research. Bruker Application Note. 2018.
11. Waldeck J, Molinos C, Gsell W, Prior J, Himmelreich U, Viertl D. Coincidence High Resolution and High Sensitivity PET Imaging of Cardiovascular Disease. Bruker Application Note. 2017.
12. Molinos C, Gsell W, Nauwerth A, Correcher C, Himmelreich U, Sasser T, Deroose C, van Wyk S, Heidenreich M. A Novel Method for MRI-derived PET Gating for Cardiac Imaging and Motion Correction. 2018 WMIC.

Компания более 16 лет осуществляет оснащение клинико-диагностических, научно-исследовательских, ветеринарных и криминалистических лабораторий современным оборудованием, наборами реагентов и расходными материалами для молекулярно-биологических исследований, медицинской генетики и полногеномного секвенирования.

► КОМАНДА

высококвалифицированных специалистов

► ШИРОКАЯ СЕТЬ ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВ

в России, СНГ и странах дальнего зарубежья

► СЛУЖБА КЛИЕНТСКОЙ ПОДДЕРЖКИ

и сервисного обслуживания в России и странах СНГ

► ОБУЧЕНИЕ

на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора с выдачей государственных документов о повышении квалификации

Продуктовый портфель компании представлен ведущими российскими и мировыми брендами: **AmpliSens™ (Россия), Hamilton (Швейцария), Thermo Fisher Scientific (США), BioRad (США), MGI (Китай/США), Agena Bioscience (США), Axxygen (США), AmpliPrime™ (Россия), Artaka (Италия).**

ООО "ИЛС"

Россия, 115035, г. Москва, ул.Садовническая, д.20/13, стр.2

Тел.: +7 (495) 664 28 84; факс: +7 (495) 664 28 89

www.interlabservice.ru

**Тезисы докладов
молодежной конференции**

**Гетерологичный синтез ксилоглюканазы Xgh12B из *Aspergillus cervinus*
в высокопродуктивном штамме *Pichia pastoris*
и очистка рекомбинантного белка**

Акентьев Ф.И., Черноморова Н.О., Серкина А.В., Полякова А.К.,
Рыков С.В., Березина О.В. ¹

¹ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Akentyevfil@gmail.com

Растительная биомасса - дешевый возобновляемый источник сахаров для промышленной биотехнологии. Гидролиз с помощью карбогидраз - эффективный и экологически безопасный способ конверсии полисахаридов растительной биомассы в ферментируемые сахара. Природными продуцентами карбогидраз являются штаммы грибов и бактерий – деструкторов растительной биомассы. Однако уровень продукции ферментов природными штаммами часто недостаточен для их эффективного использования.

Целью данной работы является гетерологичный синтез ксилоглюканазы Xgh12B из *Aspergillus cervinus* в высокопродуктивном штамме *Pichia pastoris*, наработка и очистка рекомбинантного фермента для последующей биохимической характеристики и структурных исследований.

Материалы и методы. В работе использовали полученный ранее рекомбинантный штамм *P. pastoris* [1], секретирующий ксилоглюканазу Xgh12B в культивационную жидкость (КЖ) в процессе метанол-индуцируемой ферментации.

Культуру штамма выращивали в биореакторе объемом 0,5 л (Applikon Biotechnology, the Netherlands), в течение 96 ч при температуре 30 °С на двух различных средах: 1) пептон – 2%, дрожжевой экстракт – 1%; 2) минеральная синтетическая среда для экспрессии в *Pichia*, составленная согласно методике Invitrogen [2]. В обоих случаях в качестве единственного источника углерода использовали глицерин во время стадии роста, и метанол во время экспрессии.

Результаты. Культивирование с использованием синтетической среды позволило получить 2,5 – 2,7 г целевого белка Xgh12B в литре КЖ, или 2,2 млн единиц активности ксилоглюканазы на литр. В результате ферментации на пептонной среде уровень биосинтеза составил 200 мг/л, что более чем на порядок меньше, чем на синтетической. Содержание Xgh12B в КЖ составило не менее 75% от общего количества внеклеточного белка. Рекомбинантный белок был очищен из КЖ с помощью металл-аффинной хроматографии. Чистота полученного препарата составила 97%.

Выводы. Использование минеральной синтетической среды для биосинтеза Xgh12B в *P. pastoris* позволило повысить выход целевого фермента

более чем на порядок по сравнению с пептонной средой. Дополнительным преимуществом минеральной среды в крупномасштабном производстве ферментов является ее более низкая по сравнению с пептонной средой стоимость.

Высокое содержание рекомбинантного белка в КЖ *P. pastoris* и отсутствие токсичных примесей позволит использовать ферментный препарат на основе ксилоглюканазы Xgh12В в промышленности и сельском хозяйстве без дальнейшей очистки.

Высокая гомогенность препарата белка, достигнутая в результате очистки с помощью металл-аффинной хроматографии позволит использовать его для биохимических и структурных исследований. Культивирование на минеральной среде существенно облегчает процесс очистки белка.

1. Завьялов с соавт. Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии 17-22 февраля 2018 г. Сборник тезисов и список участников, стр. 119.
2. tools.thermofisher.com/content/sts/manuals/pich_man.pdf

Изучение взаимодействия молекулы ДНК с новыми фенантроцианиновыми комплексами Zn(II)

Акуленкова Е. В., Пастон С. В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

akulenkova.lena@mail.ru

Металлокомплексы широко используются как противоопухолевые, противомикробные и противогрибковые препараты, искусственные нуклеазы, фотосенсибилизаторы. Их связывание с молекулой ДНК приводит к ингибированию синтеза макромолекулы в клетке. Этим обусловлена актуальность разработки новых комплексных соединений и исследования их взаимодействия с ДНК. В настоящее время наибольший интерес представляют фенантролин и его производные, содержащие ионы переходных металлов. Известно, что такие металлокомплексы проявляют наибольшую активность против различных вирусов и бактерий [1, 2].

В данной работе изучены два новых соединения — комплексы Zn(II) с производными 1,10-фенантролина: бис-(1,10-фенантролин)-(1,10-фенантроцианин)-дицинк(II) ацетат (Zn₇) и его предшественник – бис-(1,10-

фенантролин)-дицинк(II) ацетат (Zn₈). Изменения спектральных свойств соединений при pH 3–1,5 могут быть вызваны диссоциацией одной из молекул фенантролина из металлокомплекса и ее протонированием, а при pH 8–12 – замещением молекул воды в составе металлокомплекса ионами OH⁻.

Спектральные данные свидетельствуют о комплексообразовании исследуемых соединений с ДНК. Один из предполагаемых типов связывания — интеркаляция. Известно, что фенантролиновый лиганд интеркалирует в двойную спираль ДНК [3]. Насыщения связывания не происходит при $0,1 < r < 18,4$ для Zn₈ и при $0,1 < r < 1,67$ для Zn₇ (r — молярное отношение концентрации металлокомплекса к концентрации ДНК). Это может говорить о том, что при больших концентрациях осуществляется вторичное связывание молекул соединения с молекулами, уже связанными с ДНК, с образованием димеров (или n-меров) [4].

Металлокомплексы Zn₇ и Zn₈ являются флуорофорами, чувствительными к изменению pH. Образование ими комплекса с ДНК приводит к тушению флуоресценции Zn₇ и Zn₈.

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ "Методы анализа состава вещества", "Оптические и лазерные методы исследования вещества".

1. N. Raman, R. Mahalakshmi. Bio active mixed ligand complexes of Cu(II), Ni(II) and Zn(II): Synthesis, spectral, XRD, DNA binding and cleavage properties - *Inorganic Chemistry Communications* 40 (2014), pp. 157–163.
2. Демидов В. Н. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук. Электрон-избыточные 1,10-фенантроцианиновые комплексы d-элементов: закономерности образования, спектральные свойства, структурно-термодинамическое подобие – СПб (2010) – с. 30-31.
3. Bolhuis, Janice. DNA as a target for antimicrobials - *Bioorganic Chemistry* 55 (2014), pp. 51–59.
4. Осинникова Д.Н. Взаимодействие молекулы ДНК с синтетическими аналогами антибиотиков и алкалоидов различной структуры. Диссертация на соискание ученой степени канд. физ.-мат.наук, СПбГУ (2016).

Нейротоксичность наночастиц диоксида титана

Алеева А. А.¹, Валиуллин В.В.¹, Шарафутдинова Л.А.²

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

² Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

ainazzza@gmail.com

Широкое применение наночастиц (НЧ) оксидов металлов с размерами от 1 до 100 нм в различных сферах деятельности человека привело к появлению проблемы их негативного воздействия на организм человека. Наименее токсичным считается диоксид титана (TiO₂). Однако, есть данные, свидетельствующие о накоплении и проявлении токсического эффекта на органы и ткани при попадании его в организм даже незначительных количеств. [1, 3] Эти эффекты НЧ TiO₂ связаны со способностью проникать через гематические барьеры, повреждая жизненно важные структуры. Нервная система является наиболее уязвимой к действию любых токсикантов. [2]

Нами исследованы ультрамикроскопические характеристики гиппокампа после интраназального введения НЧ TiO₂ (10 мг/кг веса животного, ежедневно, 30 дней), экспрессия кислого глиального фибриллярного белка (GFAP) – маркера астроцитов и чувствительность клеток гиппокампа к эндотелиальному сосудистому фактору роста (VEGF) – гормону, поддерживающему ангиогенез, являющемуся мощным медиатором сосудистой проницаемости и митогеном.

При изучении ультраструктуры гиппокампа были обнаружены грубые нарушения в виде повреждении белоксинтетического и энергетического аппарата клеток и признаки вступления нейронов в апоптоз. Иммуногистохимическое типирование клеток гиппокампа крыс при помощи антител к GFAP показало существенное возрастание количества реактивных астроцитов по сравнению с контролем, что в совокупности с уменьшением числа нейронов, обнаруженном нами ранее при изучении цитоархитектоники, может указывать на изменение функционального состояния нейронов. На фоне введения НЧ TiO₂ наблюдается увеличение чувствительности к VEGF клеток макроглии и эндотелия сосудов, но уменьшение количества рецепторов к нему в нейронах.

Таким образом, нарушения, возникающие при интраназальном введении НЧ TiO₂, в гиппокампе крысы затрагивают структурные и иммуногистохимические характеристики этой области мозга и позволяют заключить о наличии компенсаторных реакций, сопровождаемых активацией процессов ангиогенеза.

1. Notter T, Aengenheister L, Weber-Stadlbauer U, et al. Prenatal exposure to TiO₂ nanoparticles in mice causes behavioral deficits with relevance to autism spectrum disorder and beyond. *Translational Psychiatry*. 8,193 (2018)

2. Rollerova E, Tulinska J, Liskova A, Kuricova M, Kovriznych J, Mlynarcikova A, Kiss A, Scsukova S. Titanium dioxide nanoparticles: some aspects of toxicity/focus on the development. *Endocr Regul.* 49, 97-112 (2015)
3. Shinohara N, Oshima Y, Kobayashi T, Imatanaka N, Nakai M, Ichinose T, et al. Dose-dependent clearance kinetics of intratracheally administered titanium dioxide nanoparticles in rat lung. *Toxicology.* 325, 1–11 (2014)

Влияние мутации в гене *RAD30* на *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Алексеева Е.А., Федоров Д.В., Евстюхина Т.А., Пешехонов В.Т., Королев В.Г.

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

alekseeva_ea@npi.nrcki.ru

Эффективная и точная репарация ДНК является важным процессом для поддержания стабильности генома клетки. Активно делящиеся клетки в ответ на повреждения генома используют в первую очередь репарационные системы, которые удаляют повреждения ДНК во всех ее участках. Повреждения ДНК, которые остались неликвидированными перед входом в S-фазу клеточного цикла, представляют серьезную проблему в течение репликации, поэтому в процессе эволюции клетки выработали уникальную систему толерантности к повреждениям ДНК. Механизмы толерантности к повреждениям ДНК играют ключевую роль в организации завершения репликации поврежденной матричной цепи ДНК. Система толерантности к повреждениям ДНК у эукариот называется пострепликативной репарацией (ПРР) [1]. ПРР подразделяется на две различные ветви репарации: ошибочную и безошибочную ветви репарации. Безошибочная ветвь репарации в свою очередь, подразделяется на два пути: 1) Rad5-зависимый и 2) Rad51-зависимый (гомологичная рекомбинация (ГР)).

На Rad5-зависимом пути безошибочной ветви ПРР, работает ДНК полимеразы η , ее кодирует ген *RAD30*. Данная полимеразы участвует в безошибочном обходе различных повреждений ДНК, вызванных ультрафиолетовым (УФ) излучением (циклобутановые димеры и др.) [2]. Дрожжевой ген *RAD30*, является гомологом человеческого гена *POLH*.

Из данных нашей лаборатории известно, что ген *HIM1*, может участвовать в регуляции ПРР. Так же известно, что мутация в гене *HIM1*, приводит к

значительному увеличению частоты УФ-индуцированных мутаций (так называемый him1-зависимый УФ-индуцированный мутагенез) [3].

Для изучения влияния мутации в гене *RAD30* на him1-зависимый УФ-индуцированный мутагенез дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, мы совместили мутацию в гене *HIM1* с мутацией в гене *RAD30*. При взаимодействии этих мутаций, наблюдается снижение частоты him1-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза до частоты УФ-индуцированного мутагенеза дикого типа (ДТ).

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00540.

1. Е.А. Алексеева, Т.А. Евстюхина и др. Ж. Цитология, Т.60, №7, с. 555-557 (2018)
2. A. Bresson, R.P.P. Fuchs. J. The EMBO, V21, №14, с. 3881-3887 (2002)
3. Kelberg E.P., Kovaltsova S.V., et al., J. Mut. Res. 578: 64-78 (2005)

A New Method for Expressing the Ribosomal Silencing Factor of *Staphylococcus Aureus*

Al Shebel A.¹, *Bikmullin A.*¹, *Fatkhullin B.*^{1,2}, *Nurullina L.*¹, *Garaeva N.*¹,
*Usachev K.*¹, *Trachtmann N.*^{1,4}, *Validov Sh.*¹, *Yusupov M.*^{1,3}

¹ *Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

² *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Puschino, Russian Federation*

³ *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg,
Illkirch, France*

⁴ *Institute of Microbiology University of Stuttgart, Stuttgart, Germany*

amr.al-shebel@hotmail.com

Staphylococcus aureus is one of the most common pathogens. It is well-known for its multi-drug resistance strains[3]. Ribosomal Silencing Factor (RsfS) associates with the protein L14 of the ribosomal large subunit L50 and prevents the formation of the functional ribosome. So, RsfS depletes the ribosomes from the translation pool and cuts down the energy expenditure[1].

Since L14 protein is very conservative[1]. The expression of staphylococcal RsfS in *E.coli* gives a little yield of this protein. Moreover, RsfS is poorly soluble in the majority of buffer systems. To produce RsfS two expression cassettes, containing rsfS and l14 genes of *S.aureus*, were constructed using pACYCDuet-1 vector and expressed in *E.coli*. The first construct was expressing RsfS tagged with 6 histidine residues on its N-terminus (RsfS- 6xhis) and intact L14, the second construct

expressed intact rsfS and L14 tagged with 6 histidine residue on its N-terminus. The constructs did not influence the growth of producing E.coli cells. In contrast, the expression of single rsfS nearly ceased the growth of E.coli culture. Both constructs demonstrated expressed RsfS-L14 complex effectively and in contrast to the construct, producing single RsfS, the complex was soluble. The stability of the complexes was confirmed using size exclusion and ion exchange chromatography methods. We also separated RsfS and L14 using the denaturation in urea. In the complex RsfS-6xhis-L14, effective dissociation was observed when 3M urea or higher concentration was used. After that pure RsfS-6xhis was recovered from affinity column.

In this report, we demonstrate that the ribosomal hibernation protein RsfS of S.aureus can influence protein synthesis machinery. Nevertheless, RsfS can be produced effectively when co-expressed with L14 without remarkable repression of producing E.coli culture growth. Since these two proteins form a stable complex, it is possible to purify them and separate them using mild denaturation conditions.

Work supported by the program of Competitive Growth of KFU

List of references:

1. Häuser, R., Pech, M., Kijek, J., Yamamoto, H., Titz, B., Naeve, F., Tovchigrechko, A., Yamamoto, K., Szaflarski, W., Takeuchi, N., Stellberger, T., Diefenbacher, M. E., Nierhaus, K. H., ... Uetz, P. (2012). RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors. *PLoS genetics*, 8(7), e1002815.
2. Starosta, A. L., Lassak, J., Jung, K., & Wilson, D. N. (2014). The bacterial translation stress response. *FEMS microbiology reviews*, 38(6), 1172-201.
3. Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus Aureus*. [Updated 2017 Oct 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>

Взаимодействие молекулы ДНК с ионами серебра и золота и сравнение результатов металлизации макромолекул с их использованием

Андреева А.А.¹, Касьяненко Н.А.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

andreeva.asya.28@gmail.com

Наночастицы благородных металлов, а именно золота и серебра, обладают уникальными физико-химическими свойствами, благодаря которым наночастицы используются в современных химиотерапевтических подходах при лечении рака. Взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами, они образуют наноструктуры, которые могут быть использованы в качестве генных векторов для доставки лекарств. Среди физико-химических параметров, влияющих на биологическую активность наночастиц золота и серебра, основными характеристиками являются их размер, форма, состав, заряд. Образование наночастиц происходит за счет уменьшения ионов в растворе. Поэтому логично исследовать возможность образования комплексов молекулы ДНК с соединениями золота и серебра в модельных системах — водно-солевых растворах.

Металлизация ДНК в растворе после образования комплексов с ионами серебра и золота получается благодаря добавлению восстанавливающего вещества. Было показано, что добавление разной концентрации реагентов, а также различная последовательность их добавления к раствору ДНК приводит к различным результатам. Спектры поглощения ДНК в комплексах с соединениями золота (KAuCl_4 , HAuCl_4) и серебра (AgNO_3) показывают сходные изменения путем связывания ионов двухвалентного переходного металла с гуанином N7 в основной канавке ДНК. Мы можем предложить преобразование координационной сферы иона Au из-за реакции аквагидратации для изменения заряда комплексного иона от 2 до 2⁺. Спектры кругового дихроизма подтверждают образование комплексов Au с ДНК, сходных с ионами двухвалентных металлов, связывающимися с основаниями ДНК. Однако спектры КД с серебряным комплексом имеют более значительные изменения. Помимо этого, для получения информации о структуре третичной ДНК использовались гидродинамические методы (низкотемпературная вискозиметрия, двулучепреломление в потоке). Определены объем молекулярного клубка и персистентная длина цепи ДНК. Было показано, что при взаимодействии с нашими соединениями объем макромолекулы уменьшается. Было проведено восстановление ионов золота и серебра после их связывания с основаниями ДНК, и был изучен результат этого восстановления.

Физико-химические и митохондриально-направленные свойства олигопептидов, модифицированных трифенилфосфониевой группой

Ахмадишина Р.А., Гарифуллин Р.И., Камалов М.И., Абдуллин Т.И

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

r.a.akhmadishina@mail.ru

Биоактивные олигопептиды – перспективный класс терапевтических молекул, обладающих высокой специфичностью и низкой токсичностью. Их направленная доставка в клетки и митохондрии представляет интерес для лечения и профилактики воспалительных, онкологических и дегенеративных заболеваний. В качестве перспективных модификаторов олигопептидов нами изучены катионы трифенилфосфония (ТФФ) с установленными векторными свойствами [1]. Методом твердофазного синтеза получено 7 тетрапептидов на основе опиоидного мотива Tyr-Arg-Phe-Lys и карбоксиалкильных производных ТФФ [2]. С использованием комплекса физико-химических методов охарактеризована вторичная структура и свойства олигопептидов [2, 3]. Среди них некоторой цитотоксической активностью в отношении фибробластов кожи человека обладали только структуры TPP-6-YrFK-NH₂ и TPP-6-KFRY-NH₂ (IC₅₀≈1.5 и 0.3 мМ), которые характеризовались повышенными протеолитической стабильностью и гидрофобными свойствами, соответственно.

По данным проточной цитометрии и микропланшетного анализа с зондом TMRE выявлены олигопептиды и условиях их применения, при которых происходило достоверное снижение трансмембранного потенциала митохондрий (ψ) опухолевых клеток, однако, эффект существенно уступал действию разобщающих агентов. С использованием зонда MitoSox установлено, что сами олигопептиды не влияют на уровень генерации супероксид-аниона в митохондриях, однако, способны усиливать прооксидантный эффект модельных митохондриальных эффекторов. Результаты представляют интерес для разработки терапевтических олигопептидов, модифицированных ТФФ группами.

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

1. Tsepaeva O.V., et al., J. Nat. Prod. 80, 8 (2017).
2. Akhmadishina R., et al., Front. Pharmacol. 9, 115 (2018).
3. Garifullin R., et al., Eur. Biophys. J. 10.1007/s00249-018-1327-x (2018).

Респираторная микрофлора как дополнительный фактор мутагенеза в соматических клетках рабочих угольной промышленности.

Баранова Е.Д., Дружинин В.Г.

Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия.

laveivana@mail.ru

Кемеровская область является одним из ведущих угледобывающих и углеперерабатывающих регионов РФ. В производственных циклах и отходах данных предприятий имеется целый комплекс мутагенных и канцерогенных факторов: угольная пыль, ПАУ, радон и продукты его распада, оксид углерода, фенол, сероводород, нафталин, бензол и др. Воздействие такого количества токсических факторов на организм человека приводит к увеличению общей геномной нестабильности [1], а также профессиональной и онкологической заболеваемости рабочих [2]. Стабильность генома может прямо (или опосредованно) зависеть от состояния бактериальных сообществ, эволюционно закрепленных в организме человека. Одним из важных (но часто игнорируемых) аспектов воздействия микробиоты является способность многих видов бактерий индуцировать мутации или модулировать мутационный процесс в клетках организма-хозяина [3]. Как правило, «агрессивное» воздействие микробиоты на организм человека сопряжено с трансформацией состава микробиоты, вызванного наличием заболевания, либо воздействием вышеперечисленными цито- и генотоксических факторов на организм человека. На базе этого можно предположить, что процессы индуцированного мутагенеза и канцерогенеза тесно взаимосвязаны с состоянием микробиоты.

Целью данной работы является проверка гипотезы о том, что стабильность генома человека в условиях профессиональной экспозиции генотоксическими факторами угольной индустрии может прямо (или опосредованно) зависеть от состава бактериальной микробиоты верхних дыхательных путей, который, в свою очередь, может быть связан с развитием профессиональной патологии органов дыхания.

В докладе будет обсуждаться взаимосвязь состава бактериальной микрофлоры верхних дыхательных путей с индивидуальной чувствительностью генома в когортах шахтеров, больных пневмокониозами, теплоэнергетиков и контрольной выборке.

«Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-14-00022)»

1. Minina VI , Sinitsky MY, Kulemin IuE, Volobaev VP, Savchenko JaA. Genotoxic Effects of Coal Dust on Kuzbass Workers. Химия в интересах устойчивого развития. 2018. 4. 545-548.

2. Minina V.I., Sinitsky M.Yu., Druzhinin V.G., Fucic A., Bakanova M.L., Ryzhkova A.V., Savchenko Y.A., Timofeeva A.A., Titov R.A., Voronina E.N., Volobaev V.P., Titov V.A. Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollution. *Eur. J. Cancer Prevention*, 2018. 27(1):6-12
3. Дружинин В.Г., Баранова Е.Д., Буслаев В.Ю., и др. Бактериальные эффекторы повреждений ДНК в клетках организма хозяина // *Экологическая генетика*. – 2018. – Т. 16. – № 3. – С. 26–36. doi: 10.17816/ecogen16326-36.

Вторичная структура РНК генного сегмента NS вируса гриппа А влияет на экспрессию рамок считывания NS1/NEP на ранней стадии вирусной инфекции

Барановская И.Л.^{1,2}, Сергеева М.В.¹, Васин А.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

irina.baranovskaja.1992@gmail.com

Вторичные структуры РНК являются важным элементом функционирования РНК-содержащих вирусов, в том числе вируса гриппа А. Так, например, консервативная структура типа шпильки, расположенная на концевых областях вирионной РНК вируса гриппа играет ключевую роль в успешном узнавании геномных сегментов вирусными белками для последующих процессов транскрипции, репликации и упаковки геномных сегментов в вирусный капсид.

В настоящее время поиску консервативных структур вирусной РНК и установлению их роли в патогенезе вирусов уделяется большое внимание, поскольку РНК, как и вирусные белки, может являться терапевтической мишенью противовирусных препаратов.

Согласно ранее опубликованным работам, консервативные вторичные структуры РНК формируются на смысловой нити РНК восьмого сегмента вируса гриппа А. Данный сегмент кодирует как минимум две рамки считывания - NS1 и NEP. Белок NS1 – это неструктурный белок вируса гриппа, который выступает ключевым антагонистом системы интерферонов, в то время как NEP- это фактор ядерного экспорта. Области со стабильной структурой РНК соответствуют положениям 82-148 и 497-564 нуклеотидной последовательности и локализованы вблизи 5' и 3' сайтов сплайсинга гена NS.

Целью настоящей работы являлась оценка влияния вторичной структуры РНК геномного сегмента NS вируса гриппа на экспрессию NS1 и NEP в процессе вирусной инфекции.

Для этого мы сконструировали 4 штамма вируса гриппа с различной вторичной структурой гена NS на основе модельного штамма A/Puerto-Rico/8/34. Различия в формировании вторичной структуры РНК NS гена мы экспериментально подтвердили методами электрофоретического разделения в нативных и денатурирующих условиях.

Далее мы количественно измерили уровень экспрессии NS1 и NEP при заражении полученными штаммами чувствительных клеток в одинаковой инфекционной дозе. Мы обнаружили различия как в экспрессии белка NS1, так и в относительном количестве мРНК NEP/NS1 на ранней стадии развития вирусной инфекции. Полученные результаты согласовываются с теоретическими предпосылками и ранее опубликованными данными и свидетельствуют о влиянии комбинации вторичных структур РНК геномного сегмента NS на переключение открытых рамок считывания между NS1/NEP.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 18-74-00130 (роль вторичной структуры РНК геномного сегмента NS вируса гриппа А в его жизнеспособности и патогенности).

**Взаимодействие сывороточного альбумина человека, быка и крысы
со специфическими ингибиторами сайтов Садлоу I и Садлоу II
по данным молекулярного моделирования**

А. А. Баталова,¹ Д. А. Белинская,¹ Н. В. Гончаров.^{1,2}

¹ *Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

² *Институт гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России,
Санкт-Петербург, Россия*

Известно, что помимо транспортной функции, альбумин обладает эстеразной активностью, в том числе по отношению к фосфорорганическим соединениям (ФОС) [1]. Предполагается, что сайт Садлоу I альбумина отвечает за истинно эстеразную активность (связывание субстрата с ферментом с последующим распадом комплекса на фермент и продукт), а сайт Садлоу II – за псевдоэстеразную (необратимое связывание субстрата с ферментом) [1,2]. В экспериментах, направленных на изучение эстеразной активности альбумина, применяются специфические ингибиторы сайтов Садлоу I и II: варфарин и ибупрофен соответственно [4]. Для биохимических экспериментов используется преимущественно бычий альбумин, токсикологические тестирования проводятся на грызунах. Влияние межвидовых различий на эффективность взаимодействия варфарина и ибупрофена с альбумином до конца не изучено. В данной работе методом молекулярного докинга было изучено взаимодействие варфарина с сайтом Садлоу I и ибупрофена с сайтом Садлоу II сывороточного альбумина человека (ЧСА), быка (БСА) и крысы (КСА). Согласно полученным данным, варфарин связывается с сайтом Садлоу I ЧСА и КСА с одинаковой эффективностью, соотношение вкладов ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий в эффективность ингибирования одинаково для обоих ферментов. По отношению к сайту Садлоу I БСА варфарин обладает лучшим сродством, чем в случае ЧСА и КСА, положение молекулы варфарина внутри сайта также иное для БСА. Ибупрофен показал меньшее сродство к сайту Садлоу II БСА по сравнению с ЧСА и КСА, причем за счет и электростатических, и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Полученный результат свидетельствует о том, что функциональные характеристики сывороточного альбумина человека и крысы отличаются между собой в меньшей степени по сравнению с функциональными характеристиками бычьего альбумина.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-015-00304.

Список литературы:

1. Гончаров Н.В., Белинская Д.А., Разыграев А.В., Уколов А.И. О ферментативной активности альбумина // Биоорг. химия. 2015. Т. 41. № 2. С. 131-144.

2. Li B., Nachon F., Froment M.T., Verdier L., Debouzy J.C., Brasme B., Gillon E., Schopfer L.M., Lockridge O., Masson P. Binding and hydrolysis of soman by human serum albumin // Chem. Res. Toxicol. 2008. V. 21. № 2. P. 421-431.
3. John, H.; Breyer, F.; Thumfart, J.O.; Höchstetter, H.; Thiermann, H. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for detection and identification of albumin phosphorylation by organophosphorus pesticides and G- and V-type nerve agents. Anal. Bioanal. Chem. 2010, 398, 2677–2691.
4. Н. В. Гончаров, М. А. Терпиловский, В. И. Шмурак, Д. А. Белинская, П. В. Авдонин. Сравнительный анализ эстерзной и парааксоназной активности различных видов альбумина. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2017. Т. 53. № 4. С. 241-250.

**Ассоциация rs6265 гена BDNF и rs4680 гена COMT
с риском и возрастом начала болезни Паркинсона в России**

*Безрукова А.И.¹, Сенкевич К.А.^{1,2}, Богданова Д.А.⁴, Николаев М.А.^{1,2},
Копытова А.Э.¹, Милюхина И.В.³, Тимофеева А.А.²,
Пчелина С.Н.^{1,2,3}, Усенко Т.С.^{1,2}*

1. *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*
2. *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*
3. *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*
4. *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

bz.nastya96@gmail.com

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) – это распространенное нейродегенеративное заболевание, обусловленное гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции. Помимо моторных проявлений клиническая картина БП в 30% случаев характеризуется когнитивными дисфункциями [1]. Ранее нами и другими авторами была показана ассоциация когнитивных дисфункций пациентов с БП с аллельными вариантами гена нейротрофического фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor, *BDNF*) (rs6265) и гена катехол-О-метилтрансферазы (catechol-O-methyl transferase, *COMT*) (rs4680), продукты которых вовлечены в дофаминергическую

нейротрансмиссию [2,3]. Проведенный мета-анализ показал ассоциацию rs6265 гена *BDNF* с риском БП и ассоциацию rs4680 гена *COMT* с возрастом начала БП [4,5].

Цель данного исследования заключалась в оценке ассоциации однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) rs6265 гена *BDNF* и rs4680 гена *COMT* с риском и возрастом начала БП в Северо-Западном регионе России.

Материалы и методы. В исследование вошло 418 пациентов с БП (239 женщин, средний возраст: 64,9±10,1 года, средний возраст начала заболевания: 58,5±11,9 лет), среди них 110 пациентов с семейной и 313 пациентов со спорадической формой БП (сБП), и 237 неврологически здоровых индивидуумов (116 женщин, средний возраст 65,2±11,8 лет). Скрининг ОНП rs6265 гена *BDNF* и rs4680 гена *COMT* осуществлялся методом аллель-специфичной ПЦР. Ассоциация исследуемых ОНП с риском БП была определена с помощью логистического регрессионного анализа, скорректированного с помощью факторов риска (пол, возраст). Ассоциацию ОНП генов *BDNF* и *COMT* с возрастом начала БП оценивали с использованием метода Каплана-Майера и регрессионного анализа Кокса. Значения $p < 0.05$ считались статистически значимыми.

Результаты. Нами выявлено увеличение риска БП в группе носителей варианта GG ОНП rs6265 гена *BDNF* (GGvsAG+AA: OR=1.79, 95%CI:1.23-2.16, $p=0.0010$), а также носителей аллеля A rs4680 гена *COMT* (AA+AGvsGG: OR=1.79, 95%CI:1.25-2.56, $p=0.020$). Носители варианта GG rs6265 гена *BDNF* и аллеля A rs4680 гена *COMT* характеризовались повышенным риском БП, как среди пациентов с отягощенным семейным анамнезом (OR=1.95, 95%CI:1.13-3.44, $p=0.0178$; OR=2.73; 95%CI:1.61-4.73, $p < 0.001$, соответственно), так и со сБП (OR=1.72, 95%CI:1.15-2.58, $p=0.008$; OR=1.68; 95%CI:1.15-2.45, $p=0.007$, соответственно). В группе со сБП показано снижение возраста начала БП среди носителей варианта AA по сравнению с носителями варианта GG rs4980 гена *COMT* на 4 года (HR=1.40, 95%CI:1.10-1.80, $p=0.009$).

Заключение. Нами была выявлена ассоциация варианта GG rs6265 гена *BDNF* и аллеля A rs4680 гена *COMT* с риском БП, а также показано снижение возраста начала БП среди носителей варианта AA rs4980 гена *COMT* в группе пациентов со сБП в Северо-Западном регионе России.

1. Janvin, C.C., Aarsland D., Larsen J.P. Cognitive predictors of dementia in Parkinson's disease: a community-based, 4-year longitudinal study. J. Geriatr. Psychiatry Neurol. 2005. - Vol. 18. - P. 149-154.
2. Senkevich K., Miliukhina I., Shadenkov I., Gracheva E., Beletskaya M., Kulabukhova D., Emelyanov A., Pchelina S. Associations of genetic variants in COMT, BDNF, SNCA, MAPT genes with cognitive impairment in Parkinson's disease Neurology Apr 2018, 90 (15 Supplement) P6.09
3. Chin-HsienLinRuey-MeeiWu Biomarkers of cognitive decline in Parkinson's disease Parkinsonism & Related Disorders 2015.-V.21 №5,P.431-443

4. Shovit R., Praveen KS. Association of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) Gene SNPs G196A and C270T with Parkinson's disease: A Meta- Analysis. Biomed J Sci & Tech Res, 2018. - V. 6, №2.
5. Jimenez-Jimenez FJ et al. COMT gene and risk for Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. Pharmacogenet Genomics, 2014. - V. 24, №7, P. 331-9.

Биосовместимые деградируемые материалы на основе модифицированных пектинов как перспективные средства для реконструктивной терапии

Белоусов А. С.¹, Малыкин Г. В.¹, Швед Н. А.^{1, 2}

¹ *Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия*

² *Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия*

В настоящее время одна из актуальных задач медицины заключается в создании и внедрении в клиническую практику имплантируемых материалов, способных замещать и восстанавливать дефекты тканей [1, 2]. Такие материалы могут быть использованы для терапии заболеваний, при которых фармакологические и другие традиционные методы оказываются неэффективны из-за нарушения целостности тканевых структур и гибели значительной части клеток. Замещающий аналог ткани должен имитировать условия, имеющиеся в здоровой неповрежденной ткани. При этом материал должен быть нетоксичным, а иммунный ответ организма на имплантат – минимальным.

В зависимости от типа реконструируемой ткани используемые материалы должны обладать различной скоростью биodeградации, чтобы обеспечивать постепенное замещение собственной тканью пациента [3].

Образцы материала в форме гидрогеля на основе модифицированного пектина были имплантированы подкожно крысам для оценки биосовместимости и биodeградации. Каждому животному имплантировали 4 образца одного типа, по 5 крыс на каждый тип матрикса на срок до 3 месяцев [4].

Было установлено, что срок полной биodeградации материалов на основе модифицированного пектина со степенью этерификации, близкой к 0% и 30% при подкожной имплантации составляет 1 месяц, а материала на основе модифицированного пектина со степенью этерификации, близкой к 50% - 2 месяца.

Анализ биохимических показателей крови иллюстрирует отсутствие достоверных признаков воспаления, в сравнении с контрольной группой.

По оригинальной методике был создан композиционный материал на основе модифицированного пектина и белков, имитирующий внеклеточный матрикс развивающейся нервной системы. В материалы в процессе их формирования вводили клетки глиомы С6; проводили прижизненное исследование их морфологии, с акцентом на их способность формировать отростки в системах трёхмерного культивирования.

Установлены соотношения компонентов, обеспечивающие формирование длинных отростков у значительной доли клеток глиомы С6.

1. Grayson, W. L., Martens, T. P., Eng, G. M., Radisic, M. and Vunjak-Novakovic, G. Biomimetic approach to tissue engineering // *Semin.Cell Dev.Biol.* – 2009. Vol. 20. – P. 665-673.
2. Stoppel, W. L., Ghezzi, C. E., McNamara, S. L., Iii, L. D. and Kaplan, D. L. Clinical Applications of Naturally Derived Biopolymer-Based Scaffolds for Regenerative Medicine // *Ann.Biomed.Eng.* Vol.1. – 2014. – P. 1-24.
3. Chan, B. P. and Leong, K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations // *Eur.Spine J.* – 2008. Vol. 17. – P. 467-479.
4. Щерблыкина, А.В., Мищенко, П.В., Кумейко, В.В. Биосовместимые деградируемые материалы на основе пектинов для тканевой инженерии: местная реакция тканей при подкожной имплантации // *Тихоокеанский медицинский журнал.* – 2013. -№2. – С. 13-17.

Взаимосвязь closed-loop структуры мРНК и функционирования PABP в терминации трансляции эукариот

Бизяев Н.С.^{1,2}, Шувалов А.В.¹, Егорова Т.В.¹, Алкалаева Е.З.¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

nikita.biz@mail.ru

В последние годы было открыто множество белков, участвующих в терминации трансляции эукариот. Часть из них принимает участие и в инициации трансляции, происходящей в другой части мРНК. В частности, поли(А)-связывающий белок (PABP) с одной стороны связывает eIF4G и стимулирует инициацию трансляции [1], а с другой, - eRF3, стимулируя терминацию трансляции [2]. Связанный с поли(А)-хвостом мРНК PABP отделен от стоп кодона 3' нетранслируемой областью (3'НТО). Соответственно, возникает вопрос, как сближаются PABP и терминирующая рибосома в пространстве. Для объяснения этого феномена были предложены модели образования closed-loop структуры мРНК, в которой поли-А хвост сближается со стоп кодоном за счет свойств самой РНК и (или) взаимодействия белков eRF3 и PABP [2,3]. Для проверки этой гипотезы мы провели эксперименты с олигонуклеотидами, комплементарными участку 3'НТО мРНК. Эти олигонуклеотиды потенциально должны подавлять образование closed-loop структур мРНК, увеличивая жесткость молекулы РНК. Мы сравнили эффективность терминации в реконструированной системе трансляции *in vitro* в зависимости от наличия PABP в присутствии и отсутствии таких олигонуклеотидов. Настоящая работа проясняет влияние пространственной структуры мРНК на процесс терминации трансляции. Полученные данные представляют дополнительный интерес в свете того, что при реинициации и рециклинге рибосом вероятно формируется closed-loop структура, объединяющая 5' и 3' концевые последовательности мРНК, что позволяет изучить взаимосвязь инициации, терминации и рециклинга трансляции в пространстве.

1. Kahvejian, A. et al., *Genes Dev.*, 19, 1 (2005) : 104–113
2. Ivanov A. et al., *NAR*, 44,16 (2016):7766-7776.
3. Hoshino S. et al., *JBC*, 274,24 (1999): 16677-16680.

**Исследование пространственной структуры белка,
ассоциированного с протеализином, —
нового ингибитора протеолитических ферментов**

Бозин Т.Н.^{1,2}, Чухонцева К.Н.², Демидюк И.В.², Бочаров Э.В.^{1,3}

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия*

² *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

³ *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

timur.bozin@gmail.com

Протеализин — 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 [1]. В бактериальных геномах за геном ППП расположен ген консервативного гипотетического белка. Эти гены, по-видимому, организованы в бицистронный оперон. Недавно нами показано, что второй продукт протеализинового оперона *S. proteamaculans* — белок, ассоциированный с протеализином (Pass, protealysin-associated protein), — играет роль ингибитора протеализина и, по-видимому, регулирует его активность [2]. В настоящее время нами проводится всестороннее изучение нового ингибитора.

Исследование структуры Pass (13 кДа) методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения проводилось с использованием образца рекомбинантного ¹³C-, ¹⁵N-меченого белка, в котором для предотвращения димеризации была произведена замена С68S. Нами был накоплен набор гетероядерных спектров ЯМР, достаточный для отнесения ¹³N, ¹³C, ¹⁵N химических сдвигов белка и определения его пространственной структуры. Из предварительного анализа данных ЯМР следует, что 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. Отсутствие структур гомологов и значимого структурного сходства с моделями белков из банка данных PDB позволяет говорить о том, что Pass является представителем новой группы белковых ингибиторов протеаз с уникальной пространственной укладкой.

1. Demidyuk I.V., Gromova T.Yu., Kostrov S.V. Handbook of Proteolytic Enzymes. Volume 1, Pages 597-602 (2013).
2. Чухонцева К.Н., Лемескина И.С. и др. Acta Naturae, спецвыпуск. С. 140 (2017).

Влияние амитриптилина на NMDA-рецепторы и внутриклеточные кальциевые ответы в кортикальных нейронах

Бойков С. И. ^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

sergei-boickov@mail.ru

Трициклический антидепрессант амитриптилин (AM) относится к неселективным блокаторам обратного захвата моноаминов, имеет сродство к мускариновым, гистаминовым и $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -адренорецепторам [1]. Также известно, что AM блокирует трансмембранные токи NMDA-рецепторов [2] и модулирует функции внутриклеточных IP3 рецепторов [3]. Целью данной работы стало исследование модуляции AM токов NMDA-рецепторов и внутриклеточных кальциевых ответов в нейронах, наблюдаемых при активации NMDA.

На первичной культуре нейронов коры крыс выполнена регистрация трансмембранных токов методом локальной фиксации потенциала, а также кальциевый имиджинг.

Показано, что IC50 токов NMDA-рецепторов AM и параметры кинетики ингибирования зависят от концентрации внеклеточного кальция. В концентрациях значительно превышающих IC50 AM является каналоблокатором с выраженной потенциал-зависимостью.

В концентрации 10 мкМ AM не блокировал вызываемые NMDA кальциевые ответы, однако в концентрации 200 мкМ подавлял вход кальция в клетку.

В концентрации 200 мкМ в безкальциевой среде AM вызывал транзиторные кальциевые ответы нейронов в результате выхода кальция из внутриклеточных депо. Тем не менее, в присутствии внеклеточного кальция блокада IP3-рецепторов при помощи 2-APB не влияла на модуляцию AM кальциевых ответов нейронов.

В высоких концентрациях AM является блокатором NMDA-рецепторов, снижающим поступление кальция внутрь клетки через пору NMDA-рецептора. Малые концентрации, характерные для терапевтических доз препарата, не оказывают существенного влияния на вход кальция через NMDA-рецепторы. Вклад IP3-зависимого выхода кальция из внутриклеточных депо при действии AM не оказывает существенного эффекта на общий вход кальция через NMDA-рецепторы. Вероятнее всего, зависимость IC50 AM от концентрации внеклеточного кальция говорит об эффектах AM на системы регуляции

примембранного внутриклеточного кальция (натрий-кальциевый обменник), которые могут влиять на кальций зависимую десенситизацию NMDA-рецепторов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 18-015-00023, в рамках госзадания АААА-А18-118012290427-7.

1. Пейдж К., Кертис М., Уокер М., Хоффман Б. Фармакология: клинический подход. Пер. с англ. под ред. Б.К. Романова. — М.: Логосфера, (2012).
2. Barygin O.I., Nagaeva E.I., Tikhonov D.B., Belinskaya D.A., Vanchakova N.P., Shestakova N.N. J. Brain research. Inhibition of the NMDA and AMPA receptor channels by antidepressants. 1660:58-66. 4(2017).
3. Shimizu M., Nishida A., Hayakawa H., Yamawaki S. Ca²⁺ Release from Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Sensitive Ca²⁺ Store by Antidepressant Drugs in Cultured Neurons of Rat Frontal Cortex. J. of Neurochemistry. Vol. 60, № 2, 4(1993).

Идентификация сайтов связывания тиофлавина Т с амилоидными фибриллами Sup35NM с помощью мультидисциплинарных подходов

Бондарев С.А.^{1,2}, Сулацкая А.И.³, Белоусов М.В.^{1,4}, Сулацкий М.И.⁵, Каява А.В.^{6,7}, Журавлева Г.А.^{1,2}

¹ *Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

² *Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Лаборатория структурной динамики, стабильности и фолдинга белков, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

⁴ *Лаборатория протеомики надорганизменных систем, ВНИИ Сельскохозяйственной Микробиологии, Пушкин, Россия*

⁵ *Лаборатория морфологии клетки, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

⁶ *Университет Монпелье, Монпелье, Франция*

⁷ *Институт компьютерной биологии, Монпелье, Франция*

stanislavspbg@gmail.com

Дрожжевой белок Sup35 является одним из наиболее исследованных амилоидогенных белков. Его агрегация обусловлена фрагментом Sup35NM, включающим N и M домены белка [1]. В составе амилоидных фибрилл этот

участок формирует суперскладчатую β -структуру, поэтому фибриллу Sup35NM можно представить как стопку из плоских молекул, каждая из которых образует β -серпантин (набор параллельных β -тяжей, объединенных небольшими участками поворотов) [2].

Одним из общих свойств всех амилоидных агрегатов является их способность связывать специфические красители, такие как Конго красный или тиофлавин Т (ThT). Методы на основе этого явления широко используются во многих исследованиях, но остается не до конца изученным вопрос о том, как именно ThT взаимодействует с амилоидами. Для решения этого вопроса мы использовали набор междисциплинарных подходов. На первом этапе нами были оценены параметры связывания ThT с фибриллами дрожжевого белка Sup35NM или набора его вариантов с заменами полярных аминокислот на заряженные. Затем эти данные были сопоставлены с расположением замен в белке и с параметрами β -серпантинов Sup35NM, предсказанных с помощью программы «BetaSerpentine»[3]. В результате мы обнаружили зависимость между количеством сайтов связывания ThT с фибриллами Sup35NM в пересчете на молекулу белка и положением аминокислотных замен в белке, а также числом поворотов, которые образует белок в составе β -серпантина. Это позволило подтвердить тот факт, что исследуемые аминокислотные замены ограничивают фрагмент белка, который может формировать амилоид. Также с использованием полученных данных мы смогли обосновать, что ThT встраивается в бороздки, которые идут вдоль фибрилл и образованы β -серпантинами.

Работа поддержана грантом грантами РФФИ (17-54-150002 и 16-04-01614) и стипендией Президента РФ (СП-841.2018.4), а также ресурсным центром «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

1. Liebman S.W., Chernoff Y.O., Genetics. 191, 4 (2012).
2. Kajava A.V., Baxa U., Wickner R.B., Steven A.C., PNAS. 101, 21 (2004).
3. Bondarev S.A., Bondareva O.V., Zhouravleva G.A., Kajava A.V., Bioinformatics. 34, 4 (2018)

Induction of the stringent response in pectobacteria upon exposure to glyphosate

Brodiazhenko T.

University of Tartu, Institute of Technology, Tartu, 50411, Estonia

N-(phosphonomethyl)glycine (Glyphosate) is a broadly used herbicide which targets EPSP enzyme in Shikimate pathway causing inhibition of aromatic amino acid biosynthesis [1]. In addition to targeting plants, Glyphosate can also cause amino acid starvation in bacteria, inducing the so-called stringent response [2]. The latter is a stress response mediated by accumulation of the alarmone nucleotide (p)ppGpp which, importantly, induces expression of virulence and stress tolerance genes [3].

In that work we studied bacterial sensitivity to glyphosate-compound with different concentration on (p)ppGpp level in *Pectobacterium* bacteria. Members of *Pectobacterium* genus are plant pathogens secreting plant cell wall-degrading enzymes (PCWDE) causing soft rotting or tissue macerating in a wide range of plants [4]. Nutrient limitation leading to accumulation of (p)ppGpp is known to induce expression of PCWDE [5]. Therefore, we test sensitivity of a panel of *Pectobacterium* species to Glyphosate, accumulation of (p)ppGpp, as well as expression PCWDE.

1. Nielsen L. N., et al. *Environ Pollut.* 233, 364-376, (2018).
2. Cruvinel G. T., Neves H. I., Spira B. *Mol. Genet. Genomics.* 1-18, (2018).
3. Gaca, A. O., et al. *Bacteriol.* 197(18), 2908-19, (2015).
4. Kõiv V., Andresen L., Mäe A. *Mol. Genet. Genomics.* 283(6), 541-9, (2010).
5. Steven D. B., et al. *Mol Microbiol.* 90(3), 457-71, (2013).

Удаление селективных маркеров из генома *Escherichia coli* с использованием оптимизированной процедуры λRed-зависимой рекомбинации

Бубнов Д. М., Выборная Т. В., Синеокий С. П.

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

bubnov.dmitrii@mail.ru

Конструирование штаммов *Escherichia coli* путем λ-Red-рекомбинации включает два этапа - введение гена устойчивости к антибиотику и последующее удаление маркера. Для этого обычно применяют методы контрселекции, большинство из которых требуют введения дополнительных мутаций в геном [1,2], использования дорогостоящих соединений для селективных сред [3], а также применения интегративных кассет большой длины, что приводит к существенному падению эффективности интеграции в геном, поскольку частота λRed-рекомбинации чрезвычайно зависима от длины молекулы-субстрата [4].

В рамках настоящей работы мы описываем процедуру удаления маркеров устойчивости к антибиотикам без использования контрселекции. Метод основан на том, что рекомбинантные клетки, потерявшие маркер, имеют явный фенотип – чувствительность к антибиотику. Поэтому их можно отобрать методом реплик. При условии, если эффективность рекомбинации превышает 3% (доля рекомбинантов среди общего числа клеток), для того, чтобы найти хотя бы один рекомбинантный клон с вероятностью >95%, достаточно проверить 100 случайных колоний. Для того, чтобы увеличить эффективность до искомого значения, мы использовали фрагменты двунитевой ДНК, состоящие из двух областей гомологии, которые фланкируют маркер в составе хромосомы. С использованием штамма MG1655 и ранее описанной системы экспрессии генов λRed [5], мы оптимизировали длину областей гомологии, условия электропорации и продолжительность последующего восстановления клеток в жидкой питательной среде. Используя найденные оптимальные параметры (длина гомологии – 350 п.н., 750 нг ДНК на 50 мкл электрокомпетентных клеток и восстановление в течение 2 часов), нам удалось достичь эффективности рекомбинации 4-6% в зависимости от локуса. Это позволило нам отбирать рекомбинантные клоны без применения контрселекции путем скрининга методом реплик 100 случайно выбранных колоний.

Работа выполнена при поддержке Министерства Образования и Науки Российской Федерации (код проекта RFMEFI61017X0011)

1. Warming S., Costantino N., et al., *Nucleic Acids Res.* 33, e36-e36 (2005).
2. Bird A.W., Erler A., et al., *Nat Methods.* 9, 103-109 (2011).
3. DeVito J.A., *Nucleic Acids Res.* 36, e4-e4 (2007) .
4. Maresca M., Erler A., et al., *BMC Mol Biol.* 11, 54 (2010).
5. Bubnov D.M., Yuzbashev T.V., et al., *J Microbiol Methods.* 151, 48-56, (2018).

Изучение структурных основ асимметричного деления клеток на примере белков HOF1 и септинов

Вахрушева А.В.¹, Станишневa-Коновaлова Т.Б., Соколова О.С.

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

Процесс асимметричного деления необходим на ранних стадиях развития организма, а также для поддержания пула стволовых клеток и тканевого гомеостаза. Нарушение тонкого баланса в асимметричном делении стволовых клеток может привести либо к уменьшению их количества, либо к увеличению, то есть, в первом случае - к тканевой дегенерации, а во втором - к опухолям [1].

Модельным объектом для изучения асимметричного деления являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. На них было показано, что этап цитокинеза происходит за счёт сокращения актомиозинового кольца и образования перегородки. Одними из главных участников данного процесса являются септины и белок HOF1. Септины собираются в месте разделения клетки, а на более поздних этапах митоза участвуют в формировании актомиозинового кольца, а также окружают его, играя роль барьера. Ухудшение функционирования септинового барьера приводит к неравномерному распределению веществ, к утрате клеточной полярности и нарушению деления клеток [2]. Основным белком, участвующим в работе сократительного кольца и образовании перегородки, является белок HOF1 [3]. Имеются биохимические данные о взаимодействиях между септиновой перегородкой и белком HOF1, а также об участии HOF1 в сокращениях актомиозинового кольца [4, 5], но до сих пор не ясно, как регулируются эти процессы.

В данном исследовании белок HOF1 и септины были наработаны в *Escherichia coli* и очищены с помощью никель-аффинной хроматографии. Далее были сформированы септиновые филаменты и подобраны условия для кросс-сшивок. Комплексы септиновых филаментов, кросс-сшитых *in vitro* белком HOF1, были исследованы с помощью электронной микроскопии. Полученные результаты помогли выявить участки взаимодействия белка HOF1 с септинами, что послужит основой для изучения комплекса PSTPIP1 (гомолог HOF1 у млекопитающих) с септинами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00347.

1. Gómez-López S., Lerner R.G. et al., J. Cell Mol Life Sci. 71, 4 (2014).
2. McMurray M.A., Thorner J., J. Cell Div. 4, 18 (2009).
3. Oh Y., Schreiter J. et al., J. Mol Biol Cell. 24, 9 (2013).
4. Meitinger F., Boehm M.E. et al. J. Genes Dev. 25, 8 (2011).
5. Nkosi P.J., Targosz B.S. et al., J. PLoS One. (2013).

РНК-связывающий белок FXR1 – новый функциональный амилоид в мозге крысы *Rattus norvegicus*

Велижанина М. Е. ¹, Сергеева А. В. ¹, Белашова Т.А. ^{1,2}, Кошель Е.И. ³, Сопова Ю. В. ^{1,2}, Шенфельд А.А. ^{1,2}, Галкин А. П. ^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

² Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им Н.И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

velizhanina.me@gmail.com

Амилоиды - это белковые полимеры, которые формируются за счет образования упорядоченных межмолекулярных бета-слоев. Первоначальный интерес к изучению данного феномена был связан с тем, что амилоидные фибриллы ряда белков ассоциированы с нейродегенеративными заболеваниями. Кроме патологических амилоидов, известны белки, выполняющие свою биологическую функцию в амилоидной конформации – функциональные амилоиды.

В нашей лаборатории был разработан и успешно апробирован универсальный протеомный метод идентификации амилоидов – PSIA-LC-MALDI, позволяющий выявлять белки, обладающие амилоидными свойствами, в тканях различных организмов [1]. Данный метод основан на универсальном свойстве амилоидных фибрилл – их повышенной устойчивости к обработке детергентами, что позволяет выделить амилоидные фибриллы среди других высокомолекулярных белковых комплексов [2]. В числе белков, выявленных в процессе анализа головного мозга крыс, особое внимание привлёк РНК-связывающий белок FXR1, контролирующий долговременную память и эмоциональное состояние [3].

Мы показали, что FXR1 представлен в мозге молодых крыс в виде высокомолекулярных SDS-устойчивых агрегатов. Более того, с помощью иммуногистохимического анализа мы продемонстрировали, что в пирамидальных нейронах мозга агрегаты FXR1 колокализуются с амилоид-специфичным красителем Тиофлафином S, связывают молекулы РНК и предохраняют их от деградации РНКазами.

Биоинформатический анализ FXR1 выявил потенциально амилоидогенные участки в эволюционно консервативном у позвоночных N-терминальном фрагменте (1-380 а.к.) и отсутствие таковых в C-концевом фрагменте (380-568 а.к.).

Мы показали ключевую роль N-терминальной части FXR1 в способности белка образовывать SDS-устойчивые нерастворимые агрегаты в клетках S.

cerevisiae, формировать фибриллы в системе *in vitro*, а также в бактериальной системе C-DAG.

Таким образом, на основании полученных результатов можно утверждать, что белок FXR1 является новым функциональным амилоидом в мозге крысы *Rattus norvegicus*.

1. Nizhnikov, A.A., et al., (2016). PLoS genetics 12(12), e1006504
2. Kushnirov, V. V., et al., (2006). Methods, 39(1), 50-55.
3. Del'Guidice, T., et al., (2015). Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(33), E4610-E4619.

**Изучение термостабильности мутантных форм глюкоамилазы
гриба *Aspergillus awamori* методом
дифференциальной сканирующей флуориметрии**

Виноградова Д.С.^{1,3}, Шмидт А.Е.¹, Соболева Е.В.^{1,2},
Швецов А.В.^{1,2}, Сергеев В.Р.^{1,2}, Суржик М.А.¹

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

³ Нанотемпер Технолоджис, Санкт-Петербург, Россия

Vinogradova_ds@npi.nrcki.ru

Глюкоамилаза – фермент, принадлежащий к классу гидролаз GH15, который последовательно отщепляет в процессе реакции гидролиза глюкозные остатки от нередуцирующих концов крахмала и мальтоолигосахаридов. Используемая в настоящий момент в промышленности нетермостабильная глюкоамилаза из *Aspergillus awamori*, не удовлетворяет жестким требованиям современных промышленных биореакторов, так как большинство технологических процессов проходят при температурах выше 80°C. Зачастую это вынуждает производителей вести производство при пониженных температурах. Получение высокотермостабильной формы глюкоамилазы гриба *Asp. awamori* позволило бы осуществлять одностадийный комбинированный гидролиз полисахаридов при максимально высоких температурах, что привело бы к значительному увеличению скорости реакции и уменьшению себестоимости конечных продуктов.

Для получения мутантных форм глюкоамилазы с улучшенными показателями термостабильности нами использовались методы направленной эволюции. ДНК библиотеки получали с помощью случайного мутагенеза части гена, кодирующего каталитический домен глюкоамилазы, или сайт-насыщающего мутагенеза. При этом позиции для сайт-насыщающего мутагенеза определялись поиском нестабильных регионов белка с помощью молекулярного моделирования.

В результате отбора было получено несколько клонов, экспрессирующих мутантные формы глюкоамилазы с повышенной термостабильностью относительно белка дикого типа. Показатели термостабильности измерялись с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии. Данный метод позволяет за сравнительно короткое время проводить анализ, используя малые количества белка, что облегчало поиск наиболее термостабильных мутантных форм глюкоамилазы для последующих раундов мутагенеза или *in vitro* рекомбинации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-01003.

Регуляторные пептиды в системе межклеточной нейрохимической коммуникации

Вьюнова Т.В., Шевченко К.В., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

p2@list.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии» и при частичной поддержке гранта № 17-00-00104 РФФИ КОМФИ.

Регуляторные пептиды – небольшие биологически активные молекулы, относимые к отдельному классу химических регуляторов, контролирующие протекание многих биохимических, физиологических, когнитивных и иных процессов в организме млекопитающих - начиная от контроля устойчивости нормального функционирования отдельных групп клеток до управления работой целых систем и органов, включая сложные акты поведения. Лекарственные препараты на основе пептидов уже довольно давно с успехом применяют в медицинской практике [1]. Механизм биологического действия таких молекул остается, во многом, не выяснен. Предложена гипотеза, согласно которой ключевыми моментами указанного выше механизма (на молекулярном уровне) являются специфические лиганд - рецепторные взаимодействия регуляторных пептидов на плазматических мембранах клеток-мишеней, в которых пептиды могут выступать как в роли высокоселективных лигандов соответствующих им специфических рецепторов (ортостерическое связывание), так и в роли аллостерических модуляторов рецепторов иных медиаторных систем (различных нейрорецепторов, локализованных на плазматической мембране клеток-мишеней) [2]. Вторым моментом указанного выше механизма являются процессы, связанные с направленным протеолизом исходного пептида и формированием тканеспецифичного синактона – группы коротких биологически активных пептидов, характеризующихся собственным спектром молекулярно-рецепторной активности, действующих направленно и совместно [3]. В представленном исследовании методом радиолиганд - рецепторного анализа дана подробная характеристика указанных выше процессов, приведены качественная и количественная оценки влияния некоторых биологически активных пептидов, на основные параметры функционирования ряда сигнальных нейрорецепторных систем клеток головного мозга крысы. Показано существование модуляторной активности низких (пико- и нано- молярных) концентраций пептидов, а также совместное действие молекул в системе пептид + непептидный аллостерический модулятор.

1. Kolomin T.A., et al., *Neurosci & Med*, 4 (2013)
2. Bezuglov V. V.; et al., *Horizons in Neurosci Res*, 21(2015)
3. Vyunova, T.V., et al., *J Mol Rec*, 30, 5 (2017)

Роль синапса лазающее волокно-клетка Пуркинье в патогенезе заболеваний полиглутаминового тракта

Гаврилова А.В., Егорова П.А.

Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

shura.gav@gmail.com

Среди нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) полиглутаминового тракта самыми известными являются болезнь Хантингтона (БХ) и некоторые виды спиноцеребеллярных атаксий (СЦА). Как при болезни Хантингтона, так и при спиноцеребеллярной атаксии наблюдается атрофия мозжечковых структур и нарушения моторных функций [1, 2].

Клетки Пуркинье (КП) являются главным функциональным элементом коры мозжечка. Сигнал в КП поступает по двум различным афферентным путям – по системам лазающих (ЛВ) и мшистых волокон (МВ). ЛВ берут свое начало в нейронах нижней оливы и посылают информацию от коры к КП, в то время как МВ идут от нейронов в спинном мозге и стволе мозга и передают информацию к КП от периферии и коры мозга.

Исследования роли синапса лазающее волокно-клетка Пуркинье в патогенезе БХ на настоящий момент проведены не были. Электрофизиологические свойства КП в случае БХ были оценены на мозжечковых срезах *in vitro* [3], однако в этом случае не наблюдается сохранения целостности афферентных волокон и проводящих путей мозжечка. Исследования синаптической активации КП волокнами *in vivo* в области СЦА были частично проведены на мышинной модели СЦА1, но не являются достаточно полными [4].

С помощью метода внеклеточной регистрации электрофизиологической активности КП от одиночного отведения *in vivo* на мышах-моделях БХ трансгенной линии YAC128 и мышах дикого типа (ДТ) и последующего анализа формы сложных спайков КП мозжечка не было обнаружено значимых различий в основных характеристиках, однако значения частот и количества спайклетов в КП мышей YAC128 были значительно выше, чем у ДТ мышей.

Изучение роли синапса лазающее волокно-клетка Пуркинье в патогенезе НДЗ полиглутаминового тракта позволит получить новые знания об электрофизиологических особенностях нейронов и афферентных волокон в случае данных заболеваний, а также даст нам возможность определить новые терапевтические мишени для направленного лечения расстройств полиглутаминового тракта.

Работа поддержана грантом РНФ 18-75-00025.

1. Rodda, R.A. Cerebellar atrophy in Huntington's disease. Journal of the neurological sciences. 1981. 50(1): p.147-57.
2. Paulson, H. L. The spinocerebellar ataxias. J Neuroophthalmol. 2009. 29(3): p. 227-237.
3. Dougherty S.E., Reeves J.L., Lesort M., Detloff P.J., Cowell R.M. Purkinje cell dysfunction and loss in a knock-in mouse model of Huntington disease. Experimental neurology. 2013. 240: p. 96-102.
4. Barnes J.A., Ebner B.A., Duvick L.A, Gao W., Chen G., Orr H.T., et al. Abnormalities in the climbing fiber-Purkinje cell circuitry contribute to neuronal dysfunction in ATXN1[82Q] mice. J Neurosci. 2011. 31(36): p. 12778-89.

**Математическая модель,
описывающая процесс миграции заряда вдоль биомолекулы ДНК**

Галченкова М. А

Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва, Россия

galchenkova.mari@gmail.com

В данной работе были проанализированы экспериментальные работы и существующие теории о механизмах переноса носителя заряда вдоль полинуклеотидной цепочки, а также выявлены параметры, которые существенно влияют и определяют проводимость такой биологической макромолекулы как ДНК. Была предложена идея создания единой базы экспериментальных данных для дальнейшей разработки собственной модели, которая бы удовлетворяла экспериментальным измеренным значениям. Собственная математическая модель, как предполагается, будет базироваться на уже имеющихся теориях о классических и квантовых механизмах переноса заряда [1].

Проанализированные данные отражены в диаграммах, отображающие причинно-следственные связи. За основу выбранной модели была взята модель взаимодействующих классической и квантовых систем, описанных в работе [2]. Полученная система, описывающая миграцию заряда вдоль полинуклеотидной цепи, была обезразмерена и были определены начальные условия для решения системы. Были рассмотрены тривиальные случаи поведения классической и квантовой систем. Было показано, что в случае наличия диссипативных сил (т.е. при учете вязкости среды, в которую помещена исследуемая система) энергия системы перестает быть интегралом движения, а является монотонно

убывающей функцией по времени. Была предложена математическая оценка подвижности заряда, а также связь между подвижностью заряда и проводимостью среды.

1. Фиалко Н. С. Моделирование переноса заряда в ДНК. Пушино, 2007.
2. Давыдов А. С. Биология и квантовая механика. Киев, 1979.

Изучение количественного состава и размера экстраклеточных везикул плазмы крови при болезни Гоше

*Кулабухова Д.Г.^{1,2}, Гараева Л.А.¹, Сенкевич К.А.^{1,2}, Верлов Н.А.¹,
Варфоломеева Е.Ю.¹, Волницкий А.В.¹, Ланда С.Б.¹, Штам Т.А.¹,
Пчелина С.Н.^{1,2}, Емельянов А.К.^{1,2}*

¹ *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

² *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

Введение

Известно, что гомозиготные мутации в гене лизосомного фермента глюкоцереброзидазы (*GBA*) приводят к снижению активности фермента и развитию болезни Гоше (БГ) [1]. На модельных животных показано, что ингибирование глюкоцереброзидазы способствует увеличению секреции экстраклеточных везикул (ЭВ) в тканях головного мозга. Оценка количества ЭВ и их размера в биологических жидкостях пациентов с БГ ранее не проводилась [2,3].

Целью настоящего исследования являлась оценка количества ЭВ плазмы крови у пациентов с БГ, а также влияние ЭВ плазмы крови пациентов с БГ на выживаемость нейрональных клеточных линий.

Методы

В исследование включили 4 пациента с БГ с мутациями N370S, L444P в гене *GBA* (средний возраст 43±7,5 лет) и 5 представителей контрольной группы (средний возраст 64±7,5 лет). ЭВ были выделены методом последовательного ультрацентрифугирования из плазмы периферической крови и охарактеризованы с использованием анализа траекторий наночастиц (АТН); метода динамического светорассеяния (ДСР); цитометрического

анализа поверхностного маркера экзосом CD9 и методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ). Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности клеток (нейрональная клеточная линия IMR32) проведена с использованием MTS теста и проточной цитометрии с окрашиванием Аннексином V и йодидом пропидия.

Результаты

При проведении оценки размера ЭВ с помощью метода ДСР показано увеличение количества ЭВ (40-150 нм) в группе пациентов с БГ по сравнению с контролем ($p = 0,014$). Также показано увеличение уровня флуоресценции при оценке маркера CD9 экзосом в группе пациентов с БГ по сравнению с контрольной группой ($p=0,014$). При сравнении концентрации ЭВ в группе пациентов с БГ и контроля статистически значимых различий не обнаружено. Также не обнаружено влияния ЭВ плазмы крови пациентов с БГ и контрольной группы на жизнеспособность и пролиферативную активность исследуемой клеточной линии.

Таким образом, проведенное исследование позволяет предполагать повышенную секрецию ЭВ при наличии мутаций в гене *GBA*, приводящих к дисфункции глюкоцереброзидазы.

Исследование поддержано грантом РФФИ №18-015-00262

Список литературы

1. Simitsia A., Korosa C., Moraitoub M., Papagiannakisa N., Antonelloua R., Bozia M., Angelopoulou E., Stameloua M., Michelakakisb H. Phenotypic Characteristics in GBA-Associated Parkinson's Disease: A Study in a Greek Population // *Journal of Parkinson's Disease*. 2018 V 8. P. 101–105.
2. Bae E.J., Yang N.Y., Song M. et al. Glucocerebrosidase depletion enhances cell-to-cell transmission of α -synuclein // *Nat. Commun.* 2014. V.5. P. 47-55.
3. Alvarez-Erviti L., Seow Y., Schapira A.H. et al. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission // *Neurobiol. Dis.* 2011. V.42.

Гетерологичная экспрессия фактора созревания RimM рибосомы *Staphylococcus aureus*

Гараева Н.С.¹, Бикмуллин А.Г.¹, Нурулина Л.И.¹, Валидов Ш.З.¹,
Усачев К.С.¹, Юсупов М.М.^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg,
Illkirch, France

natalia_pavlova5@mail.ru

Биогенез рибосомы - это жестко регулируемый многоступенчатый процесс. Сборка рибосомных субъединиц является центральной стадией сложного процесса биогенеза на которую приходится большая часть потребляемой энергии [1]. Существует ряд белковых факторов, участвующих в сборке рибосомных субъединиц. Их специфические и переходные взаимодействия с зарождающимися пре-рРНК и рибосомными белками необходимы для сборки рибосомных частиц [2]. К факторам данного ряда относят RimM (**Ribosome maturation factor**) – фактор созревания рибосомы М.

Белки семейства RimM широко сохраняются среди бактерий, а также обнаружены, по крайней мере, у четырех эукариотических видов: паразиты малярии *P.falciparum* и *P.yoelii*, малярийные москиты *A.gambiae* и хлоропласт растения *A.thaliana* [3]. Несмотря на малую степень гомологии (менее 30%), они имеют единый механизм действия: RimM С-концевым доменом связывается с белком S19, затем, происходит выравнивание структуры комплекса RimM-S19 так, что N-концевой домен RimM оказывается в соединении нескольких спиралей, таких как h29, h30 и h42. Связывание RimM на этом интерфейсе с несколькими спиралями стабилизирует конформацию рРНК на глобальном уровне, что позволяет более быстрое и стабильное связывание 3' -доменных белков.

Объектом наших исследований стал фактор созревания рибосомы М патогенного микроорганизма *S.aureus*. Для проведения структурных исследований необходима оптимизация протокола экспрессии. В рамках данной работы подобраны условия гетерологичной экспрессии в клетках *E.coli* фактора RimM из *S.aureus* и его очистки методами аффинной и эксклюзионной хроматографии. Методом электрофореза в полиакриламидном геле было показано, что полученный образец присутствовал в двух формах: мономер и димер. Одним из объяснений данного факта может быть наличие в аминокислотной последовательности фактора RimM из *S.aureus* одного аминокислотного остатка цистеина, что в свою очередь приводит к димеризации белка за счет образования дисульфидной связи.

1. Guo Q., Nucleic Acids Research. 41, 4 (2013), 2609.
2. Comartin D. J., Current Opinion in Pharmacology. 6, 5 (2006), 453.
3. Lovgren J. M., RNA. 10, 11 (2004), 1798.

Изменения редокс-метаболизма и эпилептоформенной активности гиппокампа в условиях пренатальной гипергомоцистеинемии у крыс

Гатаулина Э.Д., Ермакова Е.Б., Курмашова Е.Д., Дмитриева С.А., Яковлев А.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

maileen2013@yandex.ru

Гомоцистеин (ГЦ) – это тиолсодержащая аминокислота, промежуточный продукт цикла метионина. Изменения метаболизма данного соединения приводят к серьёзным патологиям развития нервной системы (ЦНС) [1, 2]. Было показано, что повышенный уровень ГЦ вызывал дефицит обучения у потомства и был причиной развития судорог у пациентов с синдромом Дауна [1,3,4].

Целью данного исследования было определить чувствительность срезов гиппокампа крысы к развитию эпилептоформенных разрядов (ЭР), индуцированных 4-аминопиридином (4АП), и оценить изменения редокс-метаболизма в ЦНС в условиях пренатальной ГГЦ.

Запись электрической активности осуществлялась со срезов гиппокампа крысы внеклеточным электродом. Изменение редокс-метаболизма в головном мозге определяли по содержанию в тканях H_2O_2 и уровню перекисного окисления липидов.

В контроле наблюдалась генерация ЭР (n=15) при аппликации 4АП в концентрации 50-75 μM у 75% срезов. На срезах, полученных от крысят с ГГЦ, ЭР возникали при аппликации 15-35 μM 4АП. Что указывает на снижение порога генерации ЭР у крыс с ГГЦ.

У животных с ГГЦ наблюдалось увеличение содержания H_2O_2 до 5.4 ± 0.5 мкг/г (n=6), 1.8 ± 0.2 мкг/г (n=22) на первой и второй неделе жизни соответственно, что достоверно выше, чем в контрольной группе: 4.0 ± 0.5 (n=7), 1.1 ± 0.1 (n=8) и 3.1 ± 0.5 мкмоль/г (n=6). В течение четырех недель постнатального развития у животных с ГГЦ уровень перекисного окисления липидов увеличился до 7.6 ± 0.7 мкг/г (n=6), 10.1 ± 0.8 мкг/г (n=22) и 7.6 ± 0.7 (n=5) мкг/г, тогда как в контрольной группе он составил - 5.1 ± 0.4 мкг/г (n=7), 6.1 ± 0.3 мкг/г (n=22) и 5.2 ± 0.3 мкг/г (n=6). У крыс с ГГЦ наблюдается увеличение содержания H_2O_2 , усиление перекисного окисления липидов. Таким образом, установлено, что развитие мозга в условиях пренатальной ГГЦ происходит на фоне изменения редокс-метаболизма клеток ЦНС, связанных с гиперактивацией глутаматных рецепторов и увеличением гипервозбудимости нейрональных сетей гиппокампа.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-015-00423

1. Ansari, R. et al. Hyperhomocysteinemia and Neurologic Disorders: a Review. J Clin Neurol.10, 281-288 (2014).
2. Baydas, G. et al. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring. Int. J Dev. Neurosci. 25 133-139 (2007).
3. Brustolin, S et al. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. Braz J Med Biol Res. 43, 1–7 (2010).
4. Bleich, S et al. Plasma homocysteine is a predictor of alcohol withdrawal seizures. Neuroreport. 21;2749-52 (2000).

**Исследование влияния способа эксфолиации β -хитина
на механические свойства композитов
на основе полиакриловой кислоты**

Н.А. Глушкова, О.И. Богданова, А.П. Истомина

Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва, Россия

nata_glushkova@bk.ru

Хитин – широко распространенный в природе полисахарид, выполняющий в живых организмах армирующую функцию [1]. Фибриллы хитина состоят из аморфной и кристаллической частей и обладают большим характеристическим отношением длины к диаметру (L/d) и высокими механическими свойствами [2].

На сегодняшний день существуют разные методы выделения нанофибрилл хитина. Однако эти способы приводят к разрушению аморфной фазы, а значит к ухудшению механических свойств композитов на основе хитина.

Поэтому одной из главных задач моего исследования была разработка мягкого, не нарушающего структуру нативных волокон метода выделения нанофибрилл хитина.

Первым этапом было удаление белка из гладиуса кальмара путём депротенирования в растворе 5% NaOH при комнатной температуре в течение 24 часов.

Далее разработаны методы эксфолиации β -хитина в водном растворе с добавлением акриловой [3] или аскорбиновой кислот. С помощью

рентгеноструктурного анализа и ИК-спектроскопии на каждом этапе отслеживались структурные изменения хитина.

Для эксфолиированного хитина были проведены реологические испытания и по их результатам подобраны оптимальные концентрации акриловой и аскорбиновой кислот и время перемешивания. Морфология эксфолиированного хитина была исследована методом атомно-силовой микроскопии. Показано, что процесс эксфолиации с добавлением указанных кислот не приводит к значительному разрушению аморфной фазы нативных фибрилл хитина.

Методом полимеризационного наполнения на основе полиакриловой кислоты и β -хитина были получены нанокомпозиты с содержанием полисахарида 1–3 %мас. Цель данной работы заключалась в исследовании зависимости механических свойств композитов от способа эксфолиации. Их исследовали при контролируемых:

- 1) относительной влажности воздуха при комнатной температуре;
- 2) температуре в диапазоне 25–250 °С.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 17-73-10324.

1. Богданова О. И., Чвалун С. Н. Высокомолекулярные соединения. Серия А, 58, №5, 407-438 (2016)
2. Аутлов С.А., Базарнова Н.Г. Химия растительного сырья. 3, 33-41 (2013)
3. Богданова О. И., и др. Известия уфимского научного центра РАН. 3, 48-51 (2014)

Поиск и характеристика микроорганизмов, способных к образованию карбоната кальция

Д.А. Головкина, Е.В.Журишкина, А.А. Кульминская.

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

E-mail: darya_golovkina@mail.ru

Различные факторы окружающей среды приводят к образованию трещин в бетонированных материалах. Одним из способов восстановления является биоминерализация, т.е. процесс образования минералов живыми организмами за счет реакций их метаболизма с окружающей средой [1]. В последнее десятилетие была выявлена способность некоторых бактериальных штаммов к осаждению ионов Ca^{2+} в виде CaCO_3 , которым можно заполнять образующиеся микротрещины в стенах зданий. В процессе жизнедеятельности некоторых бактерий, способных повышать значение pH окружающей среды, образуется CO_3^{2-} из CO_2 . При наличии в среде, поблизости от бактериальной клетки, свободных ионов Ca^{2+} происходит осаждение CaCO_3 , вследствие того, что клеточная стенка несет на себе отрицательный заряд, и тем самым притягивает положительно заряженные ионы Ca^{2+} . Таким образом, поверхность бактериальных клеток играет важную роль центра зародышеобразования [2].

Целью данной работы был поиск наиболее эффективного бактериального штамма, способного к образованию кристаллов CaCO_3 . В ходе 1-ого этапа скрининга имеющейся в лаборатории бактериальной коллекции были отобраны культуры, которые смогли расти на среде с щелочным значением, так как pH свежеприготовленного бетона находится в пределах значений 8 – 11. Следующей стадией скрининга был отбор спорообразующих Грам-положительных бактериальных штаммов и проведено культивирование отобранных культур с использованием специальных твердых и жидких сред [3], содержащих мочевины и ацетат кальция, для наблюдения эффективности осаждения кристаллов CaCO_3 . Мы обнаружили, что среди 59 штаммов только 5 оказались способны к биоминерализации. Штамм *Bacillus licheniformis* 8782 после 2 недель культивирования продемонстрировал способность образовывать значимые количества кристаллов CaCO_3 разной морфологии и цветов. Наибольшее количество кристаллов образовалось на твердой среде с ацетатом кальция и в жидкой среде с мочевиной.

1. Joshi S., Goyal S., Mukherjee A., Reddy MS. Microbial healing of cracks in concrete: a review. J Ind Microbiol Biotechnol. 2017 Nov;44(11):1511-1525.
2. Seifan. M, Samani. A.K., Berenjian. A. Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. Appl Microbiol Biotechnol. 2016. 100(6):2591-2602.
3. Seifan. M, Samani. A.K., Berenjian. A. Induced calcium carbonate precipitation using Bacillus species. Appl Microbiol Biotechnol. 2016, 100(23):9895-9906.

Изменение механизма синаптической пластичности в гиппокампе ювенильных крыс при неонатальной патологии

Грифлюк А.В.^{1,2}, Постникова Т.Ю.^{1,2}, Зубарева О.Е.¹, Зайцев А.В.^{1,2}

¹ *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

Griflyuk.AI@mail.ru

Бактериальные инфекции, действующие на ранних стадиях развития, могут привести к нарушениям когнитивных функций, в частности, памяти [1]. Клеточным механизмом обучения и памяти является синаптическая пластичность, которая в гиппокампе обусловлена работой NMDA-рецепторов [2,3].

Цель работы: изучение особенностей формирования долговременной синаптической потенциации (ДВП) в поле CA1 гиппокампа ювенильных крыс после введения липополисахарида (ЛПС) (модель бактериальной инфекции).

ЛПС вводили внутривентриально однократно (25 мкг/кг) в течение третьей недели жизни (в возрасте 14, 16 и 18 дней), т.е. непосредственно в период созревания NMDA-рецепторов [3]. Переживающие срезы мозга (400 мкм) получали от животных в возрасте 21–23 дней. Полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) отводили от радиального слоя поля CA1 гиппокампа. Стимуляцию осуществляли посредством биполярного электрода, помещённого в коллатерали Шаффера на границе полей CA1 и CA2, парными импульсами до и после индукции ДВП, которую вызывали тета-стимуляцией. У каждого пВПСП измеряли величину наклона восходящей фазы. В работе использовались блокатор NMDA-рецепторов AP-5 (50 мкМ) и блокатор метаботропных глутаматных рецепторов I типа (mGluR1) FTDC (5 мкМ).

У контрольных животных тета-стимуляция приводила к выраженной ДВП, при этом AP-5 блокировал её выработку, а при использовании FTDC ДВП сохранялась, что подтверждает NMDA-зависимый характер индукции ДВП. У крыс экспериментальной группы такой же протокол стимуляции вызывал меньшую по наклону ДВП. Но в присутствии AP-5 ДВП сохранялась, вся пластичность была обусловлена работой mGluR1, т.к. ДВП не вырабатывалась при использовании FTDC.

Таким образом, бактериальный липополисахарид, введённый в период созревания NMDA-рецепторов, ослабляет клеточные механизмы обучения и памяти у ювенильных крыс. При этом меняется механизм выработки ДВП с NMDA-зависимого на обусловленный работой метаботропных глутаматных рецепторов I типа.

Исследование поддержано грантом РФФИ 17-00-00408 и Программой Президиума РАН №42.

1. Harré E. M. et al. Neonatal inflammation produces selective behavioural deficits and alters N-methyl-d-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain //European Journal of Neuroscience. – 2008. – Т.27. – № 3. – С. 644-653
2. Kandel, E.R. (2004) The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses, Biosci. Rep., 24, 475–522.
3. CullCandy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease, Curr. Opin. Neurobiol., 11, 327–335.

Исследование включения вариантного «токсичного» гистона в хроматин с помощью методов проточной цитометрии

Груничева А. А., Игнатьева М. А., Конев А. Ю.

*Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

**corneliya@mail.ru*

Нами создана генетическая модель для исследования факторов сборки хроматина. Модель основана на том, что укороченный гистон H3.3-core-GFP, в котором отсутствуют аминокислоты с 4 по 36 на N-конце, и встраивающийся в процессе независимой от репликации сборки хроматина [1], не имеет в своем составе таких аминокислот как Lys4, Lys9, ser10, Lys27 и Lys36, а потому не способен подвергаться ковалентным модификациям. Поскольку эти модификации существенны для эпигенетической регуляции экспрессии генов, встраивание в хроматин гистонов, у которых они отсутствуют, может приводить к появлению видимого фенотипа у *Drosophila melanogaster*. Эксперименты по экспрессии гистона H3.3-core-GFP под контролем нескольких GAL4-драйверов, показали, что экспрессия под контролем GAL4 – драйвера Vx[MS1096] приводит к специфическим проявлениям в крыле дрозофилы - изменению характера жилкования и формы крыла. Получена тестерная линия, в которой H3.3-core-GFP экспрессируется под действием Vx[MS1096]. Далее проводились скрещивания тестерной линии с линиями, которые генетические конструкции, инактивирующие те гены, которые могут участвовать в сборке и ремоделировании хроматина, и анализировалось влияние исследуемых генов на фенотип. В частности, инактивация *Chd1* с помощью РНК-интерференции приводит к полной супрессии H3.3-core-фенотипа. Известно, что *Chd1* участвует в независимой от репликации

сборке хроматина [2,3]. Данная генетическая модель является очень эффективной для поиска факторов сборки хроматина, но для проверки и подтверждения полученных данных необходимо исследовать включение гистонов в клетках развивающегося крылового зачатка прямыми цитогенетическими методами. Наша работа заключается в получении данных об относительном количестве экспрессируемых и встроенных в хроматин гистонов H3.3-core-GFP в клетках крыловых имагинальных дисков личинок методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Нами разработана методика подготовки тканей и клеток для наиболее эффективного и точного измерения встраивания гистона H3.3-core-GFP методами проточной цитометрии.

1. Schwartz BE, Ahmad K. Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev.* 2005, 19(7):804-14
2. Konev A. Y., M. Tribus S. Y., Park V., Podhraski C. Y. et al. CHD1 motor protein is required for deposition of histone variant H3.3 into chromatin in vivo. *Science.* 2007, 317(5841):1087-1090.
3. А.Ю. Конев, А.А. Макасе, Д.К. Покровский, М.А. Игнатъева, Ю.А. Ильина, Л.В. Котлованова. Изучение АТФ–зависимых факторов сборки и ремоделирования хроматина дрозофилы. *Цитология.* . 2013, 55 (3) : 194–197

Изучение влияния мутации *sup35-M0* на структуру прионных агрегатов [*PS^h*]

*Данилов Л.Г.¹, Рыжкова В.Е.¹, Матвеевко А.Г.¹, Барбитов Ю.А.,¹
Белоусов М.В.^{1,3}, Бондарев С.А.^{1,2}, Журавлева Г.А.^{1,2}*

¹ *Кафедра генетики и биотехнологий, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

² *Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Лаборатория протеомики надорганизменных систем, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия*

lavrentydanilov@gmail.com

Некоторые растворимые белки могут менять свою конформацию, образуя нерастворимые амилоидные агрегаты. Это может приводить к различным неизлечимым нейродегенеративным заболеваниям человека, таким как болезни

Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и др. Получившиеся агрегаты часто обладают инфекционными свойствами, так как они индуцируют агрегацию мономерного белка в клетке. Такая инфекционность характерна для прионных белков, обнаруженных как у человека, так и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Фактор $[PSI^+]$ – это прионная форма белка Sup35, одного из факторов терминации трансляции у дрожжей. Возникновение приона связано с агрегацией Sup35^r, которая приводит к снижению точности терминации трансляции, и прочтению преждевременно возникших стоп-кодонов как значащих [2].

Ранее в нашей лаборатории были охарактеризованы мутации в прионном домене белка Sup35, приводящие к существенному изменению свойств фактора $[PSI^+]$ [1]. Наблюдаемые эффекты могут объясняться как несовместимостью структуры мутантных белков с фибриллами Sup35^{wt}, так и изменениями кинетики взаимодействий фибрилл с системой молекулярных шаперонов. В ходе данной работы нами было показано, что рекомбинантный мутантный белок Sup35-M0 включается в состав амилоидных агрегатов Sup35^{wt} *in vitro* при использовании в качестве затравки предсуществующих фибрилл Sup35^{NM} или клеточных лизатов дрожжей *S. cerevisiae*, несущих прион $[PSI^+]$. Способность белка Sup35-M0 включаться в состав агрегатов Sup35^{wt} была также подтверждена при помощи экспериментов в системе *in vivo* с помощью флуоресцентной микроскопии. Вышеописанные результаты позволяют сделать предположение, что ключевую роль в опосредовании влияния мутации sup35-M0 на свойства приона $[PSI^+]$ играет именно система молекулярных шаперонов, вероятно, за счет механизмов дифференциального связывания с амилоидными агрегатами [3].

Представленные результаты показывают важность взаимодействия амилоидных агрегатов с системой молекулярных шаперонов, а также непосредственное влияние этой системы на свойства различных прионов дрожжей.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (18-34-00537), а также ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

1. Bondarev S.A., Shchepachev V.V, Kajava A.V, Zhouravleva G.A. Effect of Charged Residues in the N-domain of Sup35 Protein on Prion $[PSI^+]$ Stability and Propagation // – J Biol Chem. - 2013. - Vol. 288, no 40. - Pp 28503–28513.
2. Liebman S. W., Chernoff Y. O. Prions in yeast // Genetics. – 2012. – Vol. 191, no. 4. – Pp. 1041{1072.
3. Matveenko A.G., Barbitoff Y.A., Jay-Garcia L.M., Chernoff Y.O., Zhouravleva G.A. – Differential effects of chaperones on yeast prions: CURrent view. // – Curr Genetics – 2018. - Vol. 64, no. 2. - Pp 317–325

Экспрессия сигнальных и структурных белков в нервной ткани речного рака после аксотомии

Дзрелян В. А., Гузенко В. В., Негинская М. А.

*Лаборатория молекулярной нейробиологии, Южный федеральный университет,
Ростов-на-Дону, Россия*

dzreyan2016@mail.ru

Нейротравма – важная причина инвалидизации и смерти населения, особенно, в молодом и среднем возрасте [1].

Для изучения молекулярных механизмов нейродегенерации при перерезке нерва (аксотомии) [2] с помощью метода вестерн-блот мы исследовали изменения экспрессии ряда важнейших сигнальных и структурных белков в нервной системе беспозвоночных животных: эпигенетического регулятора биосинтеза белков гистондеацетилазы 1 (HDAC1), эффектора апоптоза каспазы 3, белка цитоскелета кофилина и белков проверки качества митохондрий PINK1 и parkin. В качестве модельного нейроглиального препарата были использованы аксотомированные ганглии брюшной нервной цепочки речного рака (БНЦ). БНЦ состоит из 6 ганглиев, содержащих по 500-1000 нейронов, соединенных между собой коннективами, состоящими из нескольких сот аксонов. Перерезка коннектив дает 6 ганглиев, аксотомированных с двух сторон. Контролем служили неперерезанные БНЦ.

Через 1 час после аксотомии экспрессия HDAC1 в ганглиях БНЦ не изменялась, но через 3 часа она повышалась в 1,5 раза по сравнению с контролем ($p < 0.05$). Повышение уровня гистондеацетилазы HDAC1 приводит к снижению транскрипционной активности и подавлению белкового синтеза [3]. Мы не наблюдали достоверных изменений уровня каспазы 3, кофилина и PINK1 в ганглиях БНЦ через 1 или 3 часа после аксотомии. Экспрессия паркина в ганглиях БНЦ повышалась почти в 3 раза через 1, но не через 3 часа после аксотомии. Так как паркин участвует в процессе митофагии, то можно предположить, что аксотомия через 1 час стимулирует митофагию, а через 3 часа повышает экспрессию HDAC1 и тем самым подавляет белковый синтез.

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации, гранты №6.6324.2017/8.9 и 6.4951.2017/6.7

1. Dzreyan VA, Guzenko VV, Berezhnaya EV, Neginskaya MA, Uzdensky AB. Neurotrauma: Expression of signaling proteins in axotomized crayfish ganglia. // Int. Conf. "Biomembranes 2018", Dolgoprudny, Moscow region, Russia, 1-5 Oct 2018.
2. Richardson P. M., Miao T., et al., J. Neurosurgery. Responses of the nerve cell body to axotomy. 65, 4 (2009).

3. Sharifulina S.A., Kolosov M. S., Bibov M. Y., Demyanenko S.V., Uzdensky A. B. Proteomic study of epigenetic changes in expression of proteins in crayfish nervous tissue under photodynamic treatment // Materials of International Summer school : «Neurogenetics. Unraveling behavior and brain mechanisms using modern technologies». Zvenigorod. 2012.

Маркеры-предикторы развития эндометриоза

Дятлова А.С. ^{1,2}, Линькова Н.С. ^{1,3}, Полякова В.О. ^{4,5}, Кветной И.М. ^{4,5}

¹ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии,
Санкт-Петербург, Россия;

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии
и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

anst.diatlova@gmail.com

Актуальной задачей молекулярной медицины является поиск молекул – предикторов развития эндометриоза и появления эндометриоидных гетеротопий [1-4].

Цель работы - изучение экспрессии молекул ARID1A (AT-rich interaction domain protein 1A), PgE2 и PgE2R (простагландин E2 и его рецептора) в эндометрии и гетеротопиях яичников, брюшины и кишечника женщин репродуктивного возраста с эндометриозом.

Исследование проведено на биопсиях эндометрия (n=14) и гетеротопиях яичника (n=14), брюшины (n=11) и кишечника (n=14) женщин 22-35 лет с эндометриозом 3 или 4 степени. Контролем явились биопсии эндометрия без патологии (n=5). Экспрессию молекул определяли иммуногистохимическим методом, используя первичные антитела к ARID1A (1:300, Abcam), PgE2 (1:100, Abcam), PgE2R (1:200, Abcam). Микрофотографии препаратов получали на конфокальном микроскопе Olympus FluoView 1000 (x400). Анализ изображений проводили в программе «ВидеоТест Морфология 5.2» по показателю относительной площади экспрессии (ОПЭ, %) [5].

ОПЭ ARID1A в эндометрии женщин с эндометриозом составила 24,53±3,07% и достоверно не отличалась от контроля (28,98±3,52%). В

гетеротопиях яичника, брюшины и кишечника ОПЭ ARID1A снижалась соответственно в 3,98, 1,69 и 1,27 раза по сравнению с контролем. ОПЭ PgE2 в эндометрии женщин с эндометриозом составила $11,70 \pm 3,03\%$ и достоверно не отличалась от контроля. При этом в гетеротопиях яичника, брюшины и кишечника ОПЭ снижалась в 5,21, 2,98 и 2,85 раза соответственно. ОПЭ PgE2R не различалась в эндометрии пациенток с эндометриозом и в контроле ($33,58 \pm 3,94\%$ и $36,37 \pm 2,49\%$), но в гетеротопиях яичника, брюшины и кишечника была соответственно в 2,13, 2,11 и 2,12 раза ниже, чем в контроле.

Таким образом, определение ОПЭ ARID1A, PgE2 и PgE2R иммуногистохимическим методом в тканях эндометриоидных гетеротопий является информативным методом оценки развития эндометриоза у женщин репродуктивного возраста.

Литература:

1. Адамян Л.В., Азнаурова Я.Б. Молекулярные аспекты патогенеза эндометриоза // Проблемы репродукции. 2015. 2. С. 66-77.
2. Маржевская В.В., Присяжная Т.С. и др. Молекулярно-генетические основы эндометриоза: диагностический потенциал наследуемых и экспрессируемых факторов. 2018. 67(3). С. 64-73.
3. Guan B., Mao T-L., Panuganti P.K. et al. ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers // Am J Surg Pathol. 2011. Vol. 35(5). P. 625–632.
4. Zhu J., Mayr D., Kuhn C. et al. Prostaglandin E2 receptor EP1 in healthy and diseased human endometrium // Histochem. Cell Biol. 2018. 149(2). P. 153-160.
5. Paltsev M.A., Polyakova V.O., Kvetnoy I.M. et al. Morphofunctional and signaling molecules overlap of the pineal gland and thymus: role and significance in aging // Oncotarget. 2016. 7 (11). P. 11972-11983.

Исследование взаимосвязи между физико-механическими свойствами полимерных матриц, полученных формованием из растворов и расплавов, и жизнеспособностью клеток человека

Евтеева М. А.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

evteevamarta@gmail.com

Новейшие разработки в области материаловедения привели к получению материалов, обладающих свойствами, сочетание которых должно позволить получить оптимальное решение конкретных задач тканевой инженерии [1, 2]. Тем не менее, до сих пор не до конца известны закономерности между клеточным ответом на полимерные матрицы и их свойствами [3]. В связи с этим в этой работе исследовались показатели жизнеспособности клеток легочных эмбриональных фибробластов человека при их культивировании на различных матрицах.

Было обнаружено, что клетки эффективно прикреплялись и сохраняли морфологию на матрицах из этилен-октенного сополимера (ЭОС) и полипропилена (ПП) с одинаковым диаметром волокна и плотностью упаковки. При длительном культивировании количество клеток на матрице из ПП было в 2 раза выше по сравнению с матрицей из ЭОС.

Исследование жизнеспособности клеток на нетканых матрицах, полученных из раствора и расплава полиамида с отжигом и без с одинаковым диаметром волокон показало, что клетки прикреплялись лучше к матрицам, полученным из расплава, при этом степень адгезии зависела от степени шероховатости поверхности матриц. Было показано, что скорость пролиферации клеток на волокнистых матрицах зависит от плотности упаковки: чем ниже плотность упаковки, тем выше скорость пролиферации клеток. При этом скорость пролиферации клеток на матрицах, полученных после отжига, была ниже как в случае их получения из раствора, так и из расплава.

Таким образом, был предложен и проведен численный эксперимент по определению влияния параметров поверхностей матриц таких, как шероховатость и плотность упаковки; была продемонстрирована зависимость скорости адгезии и пролиферации клеток от физических и химических свойств матриц. Предполагается, что полученные данные позволят создать матрицы с оптимальными характеристиками для применения в клинической практике.

1. Beachley V., Wen X. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions, Progress in polymer science, 2010
2. Wu J., Hong Y. Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration, Bioactive Materials, 2016
3. Loh Q.L., Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size, Tissue Engineering Part B: Reviews, 2013

Исследование биохимических свойств белка FtsZ микоплазм

Егорова Я.В.^{1,3}, Ведяйкин А.Д.^{2,3}, Ходорковский М.А.², Вишняков И.Е.³

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

egorovka.ya@mail.ru

Микоплазмы (класс *Mollicutes*) – бактерии, характеризующиеся разнообразием форм, самыми малыми размерами по сравнению с другими прокариотами и отсутствием клеточной стенки. От внешней среды микоплазму защищает только одинарная плазматическая мембрана. Эти бактерии являются патогенными микроорганизмами, вызывающими заболевания у растений, животных и человека. Они обладают устойчивостью к антибиотикам, воздействующим на клеточную стенку, а также довольно легко дают начало персистирующим инфекциям что затрудняет борьбу с микоплазменными инфекциями.

Белок FtsZ, кодируемый геном *ftsZ* - один из наиболее консервативных прокариотических белков деления. Его структура и функция хорошо изучена у модельного организма *Escherichia coli*. Он считается одним из ключевых элементов аппарата деления большинства бактерий, обладающих клеточной стенкой. Подобно тубулину, FtsZ способен связывать и гидролизовать ГТФ, в результате чего он полимеризуется по принципу «голова к хвосту» с образованием филаментов в условиях *in vitro*. Эти филаменты и составляют основу будущего Z-кольца [1]. В процессе деления Z-кольцо располагается на перетяжке между дочерними клетками и координирует цитокинез. С одной стороны, сила, генерируемая филаментами FtsZ *in vitro*, может быть достаточной для воздействия на мембрану – единственную оболочку микоплазм [2]. С другой стороны, в последнее время эта сила считается малозначимой для деления бактерий, обладающих клеточной стенкой, потому что эта сила слишком мала по сравнению с жесткостью бактериальной оболочки. Тем не менее, в микоплазмах, в силу отсутствия у них клеточной стенки, сократительная сила может играть важную роль в процессе деления. Однако такой механизм не может быть универсальным для всех видов микоплазм, так как есть представители класса, у которых не обнаружены гены, кодирующие как белки FtsZ, так и FtsZ-подобные белки. Например, не ясен процесс деления у *Ureaplasma parvum* – микоплазмы, не имеющей гена *ftsZ* и не обладающей подвижностью [3]. Остаются неизвестной способность белков FtsZ микоплазм к полимеризации, также неизвестно,

обладает ли белок FtsZ микоплазм ГТФазной активностью, поэтому для понимания роли FtsZ требуется изучение биохимических свойств этого белка.

Целью данного исследования является изучение биохимических свойств белков FtsZ видов *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum*, что должно помочь выяснить механизмы деления микоплазм.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-74-20065).

1. Adams, D.W. and J. Errington, Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol.* 642-53, 7(9) (2009).
2. Paez, A., et al., Simple modeling of FtsZ polymers on flat and curved surfaces: correlation with experimental in vitro observations. *PMC Biophys.* 8, 2 (2009).
3. Glass, J.I., et al., The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature.* 757-62, 407 (2000).

Анализ мотонейронов при подавлении экспрессии гена *swiss cheese* *Drosophila melanogaster*

Жмуйдина Д.Р.^{1, 2}, Рябова Е.В.², Сурина Н.В.^{1, 2}, Саранцева С.В.²

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

² Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

dasha-zhmujdina@yandex.ru

Внутриклеточный транспорт различных молекул является важным процессом для поддержания структуры и функционирования клетки. Такой механизм играет ключевую роль в жизнедеятельности нейронов из-за их сложноорганизованной морфологии – разветвленных дендритных ветвей и длинного аксона. Правильное функционирование нервной клетки обеспечивает аксонный транспорт (АТ). На данный момент показано, что многие нейродегенеративные заболевания связаны с его нарушением, в частности наследственная спастическая параплегия (НСП), представляющая собой гетерогенную по своим проявлениям группу заболеваний (более 50 типов) нервной системы [1, 2]. В его основе лежит дегенерация пирамидных трактов боковых столбов спинного мозга, следствием чего является прогрессирующая

атрофия мышц верхних или нижних конечностей. НСП типа SPG39 обусловлена мутацией в гене нейротоксичной эстеразы (*NTE*), который также вовлечён в развитие синдрома отложенной нейропатии, вызванной отравлениями фосфорорганическими соединениями (*organophosphorus compound-induced delayed neuropathy, OPIDN*) [2, 3]. Сегодня известны и другие мутации в *NTE*, приводящие к нейродегенерации. В их числе синдромы Гордона-Холмса, Баучера-Нейхаузера, Оливера-МакФарлейна и Лоуренс-Муны, в спектр клинических симптомов которых могут входить хориоретинальная дистрофия, мозжечковая атаксия, когнитивные нарушения и др [2]. Ген *NTE* консервативен и имеет ортологов среди многих видов. У дрозофилы таким ортологом является ген *swiss cheese (sws)*, мутации в котором приводят к ранней дегенерации нейронов в мозге и образованию многослойной глиальной мембраны [4].

В работе были использованы мутантная и трансгенная линии с подавлением экспрессии *sws*. Анализировали нейромышечные контакты личинки *Drosophila melanogaster* и показали изменение структуры цитоскелета и уменьшение числа митохондриальных кластеров. Также для более полного понимания роли *NTE* в развитии нейродегенерации при НСП мы провели анализ АТ мотонейронов крыла *Dr. melanogaster*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-09041.

Литература

1. Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: Opportunities for translational research? / Kurt J. De Vos; Majid Hafezparast // *Neurobiology of Disease*. – 2017. – V. 105, – P. 283-399.
2. Motor neuron disease due to neuropathy target esterase gene mutation: clinical features of the index families / S. Rainier [et al.] // *Muscle Nerve*. – 2011. – V. 43, №1. – P. 19-25.
3. Neuropathy target esterase (*NTE*): overview and future / R. J. Richardson [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2013. – V. 203, – P. 238-244.
4. The *swiss cheese* mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* / D. Kretzschmar [et al.] // *J. Neurosci*. – 1997. – V. 17. – P. 7425–7432.

**Рецепторы дофамина 1 лимфоцитов
как потенциальные маркеры периферического звена
патогенеза психических расстройств**

А.С. Журавлев^{1,2}, А.М. Заботина^{2,3}, М.Н. Грунина², А.Е. Тараскина^{2,3}

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

² Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

rigold988@mail.ru

Расстройства шизофренического спектра (РШС) - превалирующие психические расстройства, нуждающиеся в обязательной антипсихотической коррекции. Так как лимфоциты периферической крови (ЛПК) экспрессируют на мембране рецепторы дофамина (DR), вовлечены в периферическое звено патогенеза РШС и подвержены системному действию антипсихотиков, их в настоящее время рассматривают как адекватный инструмент мониторинга фармакокоррекции психически больных [1-3].

Цель представляемого исследования – оценка количества рецепторов дофамина D1 ЛПК как потенциального маркера развития психических расстройств и ответа на антипсихотическую терапию.

В исследование было включено 60 пациентов мужского пола с первично поставленным диагнозом РСШ, 48 пациентов с коморбидным течением РШС и синдрома алкогольной зависимости и 40 лиц контрольной группы. Психически больных путем рандомизации отнесли к одной из групп терапии: оланзапин / галоперидол.

Материалом служили ЛПК. Определение количество D1R проводили с использованием набора ELISA (Cloud-Clone Corp, USA), с нормировкой на общий белок клеточного лизата. Результаты представлены в нг/мг.

Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета программы SPSS версия 21.0 (IBM, USA).

Результаты. Достоверных различий в количестве DRD1 между группами психически больных до терапии (РШС и коморбидное течение заболевания) и контрольной группы выявлено не было ($p=0,254$). Показатели составили: 3,06 ($1,94 \div 4,65$); 4,0 ($1,49 \div 6,94$) и 2,29 ($1,49 \div 5,09$) для трех сравниваемых групп, соответственно. В двух группах психически больных на фоне терапии галоперидолом наблюдалось достоверное снижение количества DRD1 до 0,69 ($0,02 \div 2,03$) у пациентов с РШС и до 0,61 ($0,07 \div 1,68$) при коморбидном течении

заболевания ($p=0,001$), при терапии оланзапином статистически значимых изменений в показателях DRD1 зафиксировано не было ($p=0,248$).

Выводы: при терапии галоперидолом происходит снижение количества D1R в ЛПК, по всей видимости, ассоциированное с аффинитетом препарата терапии.

1. Beaulieu J.-M., Espinoza S., Gainetdinov R.R. Dopamine receptors – IUPHAR Review 13 // British Journal of Pharmacology – 2015. – N172 – P.1-23
2. Buttarelli Francesca R., Fanciulli Alessandra, Pellicano Clelia, Pontieri Francesco E. The Dopaminergic System in Peripheral Blood Lymphocytes: From Physiology to Pharmacology and Potential Applications to Neuropsychiatric Disorders // Current Neuropharmacology — 2011. — N 9. — P.278-288.
3. Levite M. Dopamine and T cells: dopamine receptors and potent effects on T cells, dopamine production in T cells, and abnormalities in the dopaminergic system in T cells in autoimmune, neurological and psychiatric diseases // Acta Physiol — 2016. — N 216. — P.42–89

Профиль экспрессии миРНК фракции экзосом, обогащенной транс-мембранной формой белка HSP70

Забегина Л. М.^{1,2,3}, Ковальчук А. А.^{1,2,3}, Штам Т.А.^{1,3,4}, Малек А.В.^{1,3,4}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Петрова
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

³ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

⁴ ООО «Онко-система», Москва, Россия

lidiazabegina@gmail.com

Экзосомы являются одной из форм секреции белков теплового шока (БТШ), характерной для трансформированных клеток [1]. Внутриклеточные формы большинства БТШ (Hsp27, Hsp70, Hsp90) рассматриваются в качестве потенциальных мишеней противоопухолевой терапии [2]. Основным интересом исследователей связан с влиянием внеклеточного белка Hsp70 на клетки иммунной системы. Так, Hsp70 в составе мембраны опухолевых экзосом стимулирует активацию НК-клеток, макрофагов и дендритных клеток. В

контексте этих данных, экзосомальная форма БТШ, в частности Hsp70, представляется «нативным» активатором различных звеньев противоопухолевого иммунитета и может быть использована в качестве вакцины [3].

Биологическая активность БТШ в составе экзосомальной мембраны не может рассматриваться изолированно и, вероятно, является частью комплексного эффекта, который оказывают опухолевые экзосомы на различные клетки-реципиенты в составе окружающей опухоль стромы. Исследование связи между наличием БТШ в составе экзосомальной мембраны и содержащимся экзосом представляется необходимым началом исследования роли экзосомальных форм БТШ в процессе роста и диссеминации злокачественных новообразований. Выделение Hsp70(+) экзосом из тотальной популяции везикул, секретлируемых клетками *in vitro*, являлось одной из основных задач представленного исследования, решение которой позволило бы ответить на вопросы: характерно ли наличие мембранной формы Hsp70 для всех экзосом, секретлируемых клетками одного типа, или лишь для определенной везикулярной фракции; и отличаются ли Hsp70(+) экзосомы от остальных везикул составом экзосомальных миРНК.

В ходе данного исследования показано: (1) наличие Hsp70 в составе мембраны экзосом, секретлируемых клетками КРР и РЯ; (2) выявлена гетерогенность экзосом, секретлируемых клетками КРР и РЯ, по наличию/экспрессии мембранного Hsp70; (3) идентифицированы некоторые особенности состава миРНК, характерные для Hsp70(+) экзосом.

1. Santos TG, Martins VR, Hajj GNM. *International journal of molecular sciences* 2017, 18(5).
2. Calderwood SK, Gong J. *Trends in biochemical sciences* 2016, 41(4):311-323.
3. Menay F, Herschlik L, De Toro J, Coccozza F, Tsacalian R, Gravisaco MJ, Di Sciuillo MP, Vendrell A, Waldner CI, Mongini C: Exosomes Isolated from Ascites of T-Cell Lymphoma-Bearing Mice Expressing Surface CD24 and HSP-90 Induce a Tumor-Specific Immune Response. *Frontiers in immunology* 2017, 8:286.

Изменения свойств синаптической передачи в мозге крыс при модуляции обратного захвата глутамата

Завьялов В. А.¹, Карякин В.Б.^{2,3}, Малкин С. Л.², Зайцев А. В.²

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

vlazav97@gmail.com

У больных височной эпилепсией обнаружена повышенная внеклеточная концентрация глутамата в гиппокампе и височной коре [1], [2]. Это может быть связано с ослаблением его обратного захвата, более 90% которого осуществляет астроцитарный транспортёр EAAT2 (GLT1) [3].

Цель работы: изучение влияния модуляции активности EAAT2 на глутаматергическую синаптическую передачу в гиппокампе и височной коре мозга крыс.

Антибиотик цефтриаксон предположительно активизирует экспрессию EAAT2 [4].

Задачи:

1. Сравнить характеристики ВПСП у крыс в интактном контроле и после курса введения цефтриаксона (внутрибрюшинно, 200 мг/кг, 5 дней).
2. Изучить эффект блокады обратного захвата глутамата на суммацию ВПСП (блокатор – DL-ТВОА, 25 мкМ).
3. Сравнить эффект модуляции активности транспортёра в гиппокампе и височной коре.
4. Изучить изменение синтеза мРНК EAAT2 после курса введения цефтриаксона.

Эксперименты выполнялись на срезах мозга трехнедельных крыс линии Вистар. ВПСП вызывались электростимуляцией коллатералей Шаффера в гиппокампе или близких к исследуемым нейронам областей в височной коре (по 5 стимулов с межстимульными интервалами 10, 20, 33 и 50 мс). Ответы записывались в пирамидных клетках височной коры и поля CA1 методом patch clamp в конфигурации «Целая клетка».

Определение мРНК транспортёра производили методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Анализ суммации ВПСП проводился на основе измерения соотношения амплитуд первого и последующих ответов. Суммация в гиппокампе усиливается под действием DL-ТВОА, что доказывает влияние обратного захвата глутамата

на этот процесс. В височной коре влияние блокатора незначительно, что говорит о меньшей роли транспортёров в этой области.

Введение цефтриаксона привело к повышению уровня мРНК EAAT2 в гиппокампе, но не повлияло на параметры суммации, что может объясняться незначительным повышением эффективности обратного захвата или отсутствием изменений в экспрессии транспортёра на уровне белка.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00898.

1. During M. J., Spencer D. D., Lancet. 341, 8861 (1993).
2. Thomas P. M., Phillips J. P., et al., Epilepsy Res. 54, 1 (2003).
3. Tanaka K., Watase K., et al., Science. 276, 5319 (1997).
4. Rothstein J.D., Patel S., et al., Nature. 433, 7021 (2005).

**Конструирование рекомбинантного белка
с инсерцией консервативных участков вирусов гриппа А
на основе Р-домена норовируса**

Зайцева М.В., Грищенко В.И., Фомин С.В., Цыбалова Л.М.

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия*

marina.zaitceva@influenza.spb.ru

Актуальной проблемой вакцинопрофилактики вируса гриппа является разработка «универсальных» рекомбинантных вакцин на основе консервативных эпитопов вирусных белков. Одним из таких участков является пептид M2e, который представляет собой эктодомен белка M2 вируса гриппа А. Данный пептид практически не претерпел изменений в популяции вируса гриппа человека с момента выделения первого штамма в 1933 году [1]. При этом пептид индуцирует слабый и непродолжительный ответ специфическими иммуноглобулинами [2,3]. Усиление иммуногенности возможно обеспечить несколькими путями: использованием адъюванта, применением белка-носителя и увеличением числа копий последовательности M2e в конструкции. В настоящее время на разных стадиях разработки находятся различные варианты рекомбинантных вакцин с пептидом M2e [4]. В качестве основы в этих вакцинах

используют разные белки-носители, в том числе используемый нами Р-домен белка VP1, образующего внешнюю оболочку нуклеокапсида норовируса. Р-домен является перспективным белком, так как обладает высокой иммуногенностью и позволяет конструировать многоцелевые вакцинные белки за счет трех иммунодоминантных аминокислотных петель на внешней Р2 субъединице. Показано, что включение пептида размером до 238 а.к. во вторую петлю не влияет на структуру Р-частицы. При включении цистеина на N-конец Р1 субъединицы домен способен образовывать частицу размером около 20 нм, состоящую из 24 мономеров [5]. В виде наночастицы Р-домен эффективно усиливает иммуногенность целевого антигена.

Нами было разработано две конструкции рекомбинантного белка на основе Р-домена, содержащие две и четыре копии пептида М2е вируса гриппа А. Была выбрана последовательность М2е вирусов гриппа человека (23 а.к.о. каждый). Участки были встроены между сайтами рестрикции Acc65I и BmtI в последовательности второй петли Р-домена, содержащего цистеин на N-конце. В дальнейшем планируется исследование безопасности, иммуногенности и протективности полученных рекомбинантных белков.

1. Ameghi A. et al. Protective immunity against homologous and heterologous influenza virus lethal challenge by immunization with new recombinant chimeric HA2-M2e fusion protein in balb/c mice //Viral immunology. – 2016. – Т. 29. – №. 4. – С. 228-234.
2. Black R.A., Rota P.A., Gorodkova N., Klenk H.D., Kendal A.P. Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells. J. Gen. Virol. 1993;74:143–146. doi: 10.1099/0022-1317-74-1-143.
3. Feng J., Zhang M., Mozdzanowska K., Zharikova D., Hoff H., Wunner W., Couch R.B., Gerhard W. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. Virol. J. 2006 doi: 10.1186/1743-422X-3-102.
4. Kolpe A. et al. M2-based influenza vaccines: recent advances and clinical potential //Expert review of vaccines. – 2017. – Т. 16. – №. 2. – С. 123-136.
5. Tan M., Jiang X. Norovirus P particle: a subviral nanoparticle for vaccine development against norovirus, rotavirus and influenza virus //Nanomedicine. – 2012. – Т. 7. – №. 6. – С. 889-897.

Внеклеточные протеолитические ферменты *Aspergillus terreus* 2, воздействующие на белки системы гемостаза человека

Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Котова И.Б., Осмоловский А.А.

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

zvonareva.es@gmail.com

Для микромицетов показано наличие протеолитических ферментов, способных воздействовать на белки системы гемостаза человека [1]. Обнаружены протеазы, способные осуществлять не только реакции прямого протеолиза фибрина и других белков плазмы крови, но и реакции ограниченного протеолиза, приводящие к активации протеолитических каскадов в самой системе гемостаза [2].

Препараты на основе внеклеточных протеаз микромицетов могут найти применение как в медицинской практике, так и для диагностических целей. В настоящее время для диагностики широко используют протеазы-активаторы белков гемостаза из яда змей [3]. Их замена на протеазы-активаторы микромицетов уменьшит стоимость проведения исследований и сделает их более доступными.

Перспективный продуцент таких протеаз - *Aspergillus terreus* 2, в культуральной жидкости которого были выявлены протеазы с высокой плазминоподобной и тромбиноподобной активностью.

Получен препарат внеклеточных белков, проведено его разделение методом изоэлектрофокусирования. Показано, что рI протеазы с целевой активностью составляет 4,71. Анализ фракции с рI 4,71 методом электрофореза в ПААГ по Лэммли показал наличие одного белка с молекулярной массой 34 кДа. Помимо тромбиноподобной и плазминоподобной активности, протеаза проявляет высокую активаторную активность к прекалликреину, и меньшую по значениям, к протеину С и X фактору. Ингибиторный анализ показал, что исследуемая протеаза является сериновой. Также активность протеазы ингибируется гирудином на 38,2%. Оптимальная температура работы фермента - 37°C. Оптимальный рН работы протеазы - 10.0. Исследуемая протеаза является гликопротеином.

Предположительно, выделенная протеаза способна активировать прекалликреин. Данное свойство обнаружено при проведении анализа с хромогенными пептидными субстратами факторов системы гемостаза и с различной дефицитной плазмой крови человека.

1. Чердынцева Т. А., Егоров Н.С. Образование грибами родов *Aspergillus*, *Acremonium*, *Verticillium* внеклеточных протеаз, свертывающих плазму крови и лизирующих кровяные сгустки // Микробиология. – 1988. – Т.57, No 4. - С.574-578.
2. Осмоловский А., Крейер В., Баранова Н., Пискункова Н., Кураков А., Егоров Н. Сравнение свойств протеиназ *Aspergillus ochraceus* и *Agkistrodon contortrix contortrix*, активных к белкам системы гемостаза человека // Успехи медицинской микологии. – 2014. – Т.12.– С.53-56.
3. Gempeler-Messina P., Müller C. Diagnostic use of the protein C activator from *Agkistrodon contortrix* // Toxin Reviews. – 2006. – V. 25, No 4. – P. 335 - 349.

Идентификация и характеристика новых амилоидогенных белков с использованием дрожжевой тест-системы

Зелинский А. А.¹, Романова Н. В.¹, Качкин Д. В.¹, Каява А. В.²,
Рубель А. А.¹, Чернов Ю. О.^{1,3}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier, Montpellier, France

³ School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA

andrew_zelinsky@mail.ru

Формирование самовоспроизводящихся белковых агрегатов (амилоидов) связано с более чем 40 различными заболеваниями человека. Некоторые амилоиды (так называемые прионы) инфекционны, то есть могут передаваться между клетками, или даже между организмами. В последнее время появляется всё больше данных о существовании функциональных амилоидов, играющих позитивную биологическую роль. В то же время, образование и распространение амилоидов человека трудно изучать *in vivo* из-за сложности человеческого организма. Поэтому на сегодня остаётся неизвестным, какая доля протеома человека способна к образованию амилоидов.

Существует несколько биоинформатических алгоритмов для предсказания амилоидогенного потенциала белков, но ни для одного из них предсказания пока не были проверены системно на большой выборке. В данной работе, мы проверили предсказания, выполненные при помощи алгоритма ArchCandy [1], который оценивает вероятность образования белковыми последовательностями β -арок, ключевых структурных элементов большинства амилоидов. Для проверки предсказаний ArchCandy была использована

тест-система [2]. Эта система использует химерные конструкции, в которых проверяемые белки (или домены) слиты с прионным доменом дрожжевого белка Sup35, что позволяет фенотипически детектировать нуклеацию амилоида (приона), вызванную проверяемым белком, по снижению функции белка Sup35 в терминации трансляции [3]. С помощью дрожжевой системы, мы проанализировали группу потенциально амилоидогенных белков, предсказанных алгоритмом ArchCandy, и идентифицировали новые белки (в том числе человеческие) и домены с амилоидогенными свойствами.

Литература:

1. Ahmed, A.B. et al. *Alzheimer's Dementia*. 11, 6, 681 (2015).
2. Chandramowliswaran P. et al. *J. Biol. Chem.* 293, 3436 (2018).
3. Liebman S.W. and Chernoff Y.O. *Genetics* 191, 4,1041 (2012).

Роль белка Aim23p в трансляционном аппарате митохондрий дрожжей

*Чичерин И.В.¹, Зинина В.В.¹, Левицкий С.А.¹,
Серебрякова М.В.², Каменский П.А.^{1,3}*

¹ *Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Институт физико-химической биологии, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

³ *Институт живых систем Балтийский федеральный университет им И. Канта, Калининград, Россия*

lera-zinina@yandex.ru

Несмотря на эволюционное происхождение митохондрий от древней свободноживущей α -протеобактерии [1], трансляционный аппарат митохондрий во многом отличается от бактериального. Данная работа посвящена изучению инициации трансляции в митохондриях дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Долгое время не удавалось найти гомолог третьего фактора инициации трансляции в митохондриях *S. cerevisiae*. Однако комбинация филогенетического анализа и комплементационных тестов *in vivo* позволила идентифицировать дрожжевой белок Aim23p в качестве митохондриального ортолога бактериального третьего фактора инициации трансляции (IF3) [2]. В этой работе было исследовано взаимодействие Aim23p с митохондриальными рибосомами дрожжей.

Мы использовали метод иммунопреципитации с антителами к Aim23p, чтобы определить белки, взаимодействующие с Aim23p в митохондриях дрожжей. Для этого мы получали лизаты митохондрий из двух дрожжевых штаммов *S. cerevisiae*: штамма дикого типа и делетанта по гену *AIM23*. Преципитированные белки, которые присутствовали в образце штамма дикого типа, но отсутствовали в делетанте, были проанализированы масс-спектрометрически. Оказалось, что все они соответствовали белкам малой субъединицы миторибосомы. Мы также посмотрели, сохраняется ли белок Aim23p в препаратах миторибосом, очищенных в градиенте плотности сахарозы. Вестерн-блот анализ фракций показал, что Aim23p содержится исключительно во фракциях малых субъединиц. Эти результаты демонстрируют, что Aim23p физически взаимодействует с малой субъединицей миторибосомы дрожжей *in vivo*.

Неожиданно в наших экспериментах была показана возможность взаимодействия рекомбинантного 6-His меченного Aim23p как с малыми, так и с большими субъединицами миторибосом. В пользу существования такого взаимодействия следует упомянуть недавнее исследование, в котором у бактериального IF3 был обнаружен дополнительный сайт связывания на 50S большой субъединице рибосом [3]. Однако для окончательного разрешения вопроса требуются структурные исследования.

1. Andersson S. G., Zomorodipour A., et al., Nature 396, 133 (1998).
2. Atkinson G.C., Kuzmenko A et al., Nucleic Acids Res. 40, 6122 (2012)
3. Goyal A., Belardinelli R., et al., Cell Rep 20, 3113 (2017)

Модификация генома бактериофага T7 *in vivo*

*Знобищева Е.А.*¹, *Морозова Н.Е.*^{1,2}, *Ходорковский М.А.*¹, *Северинов К.В.*^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

znobishcheva.elena@gmail.com

Вирусы бактерий (бактериофаги) – одна из самых многочисленных групп вирусов на Земле. Они эффективно уничтожают целые бактериальные популяции и, тем самым, служат перспективным антибактериальным агентом. Для разработки действенных методов лечения бактериальных инфекций

вирусами важно иметь возможность вносить изменения в конкретные места фаговых геномов. Однако, редактирование вирусных геномов классическими генетическими методами представляет собой достаточно трудоёмкий процесс [1].

В последнее время большое внимание уделяется методу генной инженерии, основанном на использовании адаптивной иммунной системы бактерий и архей, CRISPR-Cas. Однако основное его применение направлено на редактирование геномов многоклеточных организмов [2].

Визуализация инфекции одиночных бактериальных клеток вирусами необходима для успешного изучения различных систем защиты бактерий. В данной работе осуществлялась модификация генома бактериофага T7, заражающего *Escherichia coli*, для получения слияния белка капсида вируса с желтым флуоресцентным белком EYFP.

В работе использовалась система CRISPR-Cas II типа - одна из самых простых и наиболее изученных CRISPR-Cas систем, эффекторный комплекс которой образуется белком Cas9 и гидовой РНК, направляющей Cas9 к требуемой последовательности ДНК [3]. Также использовали систему λ -Red рекомбинации, позволяющей вносить изменения в геном *in vivo* за счет гомологичной рекомбинации [4].

В процессе эксперимента система CRISPR-Cas9 вносила двунитевой разрыв в выбранное место вставки гена EYFP. Далее происходила гомологичная рекомбинация с сконструированной нами матрицей, в результате чего к 3'-концу гена капсида бактериофага T7 10B добавлялся ген EYFP.

С помощью разработанного подхода нам удалось осуществить вставку гена EYFP в геном T7 непосредственно в ходе инфекции клеток *E. coli*.

1. Pires D. P., Cleto S., et al., Genetically Engineered Phages: A Review of Advances over the Last Decade, *Microbiol. Mol. Biol.* 80, P. 523-543 (2016)
2. Rath, D., Amlinger, L., Rath, A. & Lundgren, M. The CRISPR–Cas immune system: biology, mechanisms and applications, *Biochimie* 117, P. 119-128 (2015)
3. Ширяева А.А., Северинов К.В. Системы CRISPR-Cas бактерий и архей. Как компоненты адаптивной иммунной системы прокариот стали универсальным и эффективным инструментом модификации геномов, исследования эпигеномов и управления транскрипцией генов. Редактирование генов и геномов. Глава 6, 134-169 (2016).
4. Sharan S. K., Thomason L. C., Kuznetsov S. G. and Court D. L. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering, *Nat. Protoc.* 4, P. 206–223 (2009)

Экспрессия генов WNT-каскада в процессе стробилияции сцифоидной медузы *Aurelia aurita*

Зорина Н.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

natalytack@yandex.ru

Сигнальный путь Wnt является одним из важнейших молекулярных путей, регулирующих различные процессы в ходе эмбрионального и постэмбрионального развития многоклеточных животных [1]. Для того, чтобы проследить эволюцию сигнального пути и исследовать механизмы его регуляции проводится большое количество исследований на разных группах многоклеточных животных [2], [3]. Особый интерес в этой связи представляет изучение данного сигнального пути у базальных групп Metazoa, таких как Cnidaria.

Кишечнополостные - древняя группа многоклеточных животных, являющаяся сестринской группой Bilateria. Однако в регуляции их развития участвует ряд схожих молекулярных каскадов. На данный момент имеется довольно большое количество работ, посвященных изучению сигнального пути Wnt в группах Anthozoa и Hydrozoa [4]. При этом группа Scyphozoa остается практически неизученной в этом отношении [5].

Таким образом, данная работа посвящена изучению функций сигнального пути Wnt у сцифоидной медузы *Aurelia aurita* в процессе стробилияции. Нами были идентифицированы гены, отвечающие за реализацию сигнального пути Wnt и осуществлен их филогенетический анализ. Методом РНК гибридизации *in situ* было выявлено пространственное распределение мРНК в процессе стробилияции. Также была проведена экспериментальная работа, показывающая влияние активаторов и ингибиторов сигнального пути Wnt на процесс стробилияции *A. aurita*.

В результате нами было идентифицировано 6 Wnt генов, а также достоверно показана экспрессия генов Wnt1 и Wnt4 в ходе стробилияции. Зоны экспрессии гена Wnt4 были выявлены в лопастях эфир и поздних стробил. В результате экспериментальной работы было установлено влияние ингибитора iCRT и активатора BIO на процесс стробилияции сцифоидной медузы *A. aurita*.

1. Croce, Jenifer C., and David R. McClay. Evolution of the Wnt pathways. Wnt Signaling. Humana Press, Totowa, NJ. (2008): 3–18.
2. Cho, Sung Jin, Yvonne Vallès, Vincent C. Giani, Elaine C. Seaver, and David A. Weisblat, Evolutionary Dynamics of the Wnt Gene Family: A Lophotrochozoan Perspective. Molecular Biology and Evolution 27, 7 (2010):1645–58.

3. Kusserow, Arne et al., Unexpected Complexity of the Wnt Gene Family in a Sea Anemone. *Nature* 433, 7022 (2005): 156–60.
4. Guder, C. et al., The Wnt Code: Cnidarians Signal the Way. *Oncogene* 25 (2006): 7450–60.
5. Brekhman, Vera, Assaf Malik, Brian Haas, Noa Sher, and Tamar Lotan, Transcriptome Profiling of the Dynamic Life Cycle of the Scyphozoan Jellyfish *Aurelia aurita*. *BMC Genomics* 16, 1 (2015): 74.

ДНК-диагностика гемофилии А методом инвертированной ПЦР

Иванова К.В. ^{1,2}, Иващенко Т.Э. ²

¹ Санкт-Петербургский Политехнический университет им. Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

² Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

ksu0497@mail.ru

Введение. Для гемофилии типа А самой частой мутацией является инверсия интрона 22 гена *F8*, доля которой составляет от 40% до 50% среди больных с тяжелой формой течения заболевания (менее 1% активного фактора). Также идентифицирована еще одна крупная перестройка в гене *F8* - инверсия интрона 1, на долю которой приходится до 5% случаев гемофилии А.

Для детекции инверсии интрона 22 применяются методы Long-Range (полимеразная цепная реакция, ПЦР) или Саузерн-блоттинг, позволяющие визуализировать длинные участки ДНК и выявить разницу длин фрагмента, содержащего инверсию и нормального фрагмента гена *F8*, однако данные методы являются дорогостоящими и трудоемкими. В работе Rosetti L.C. с соавторами был предложен новый метод детекции инверсионных мутаций в гене *F8* - метод инвертированной ПЦР[2][4].

Метод. При обработке эндонуклеазой рестрикции Ksp22I геномной ДНК в случае нормального гена получается фрагмент ДНК длиной 21,5 т.п.н., а в случае наличия химерного гена - 20 т.п.н. Далее липкие концы фрагментов сшиваются в кольца ДНК лигазой T4. Таким образом, получается сближение интересующих участков гена, с которых далее проводится полимеразная цепная реакция, для которой используют трехпраймерную систему.

В геномной ДНК расстояние между праймерами больше 20 т.п.н. и они направлены в разные стороны, поэтому амплификация с них не происходит. При сшивании фрагментов в кольца праймеры получают так, что ограничивают начало и конец интересующего участка. Таким образом, можно получить продукт амплификации и далее с помощью электрофореза сравнить длины фрагментов.[1]

Результаты. Были подготовлены для анализа 15 образцов ДНК, полученных из лейкоцитов периферической крови больных гемофилией А и их родственников. Во всех семьях был проведен поиск инверсий интронов 1 и 22 гена *F8*.

В результате проведенной диагностики была выявлена причина заболевания.

Литература

1. ДНК–диагностика гемофилии А с использованием новой медицинской технологии “Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8* ” в группе больных из Российской Федерации. Бескоровайная Т.С., Миловидова Т.Б., Щагина О.А. , Поляков А.В. 2016г
2. Rosetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasil CD. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. Clin Chem. 2005 Jul;51(7):1154–8
3. Rosetti LC, Radic CP, Abelleyro MM et al. Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion hotspot: from south–hern blot to inverse shifting–PCR. Int. J Mol Sci. 2011;12(10):7271–85
4. Rosetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasil CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia–causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor 8 gene. Journal of Thrombosis and Haemostasis,6:830–836 Jan. 2008
5. Sauna Ze, Lozier JN, Kasper CK et al The intron 22–inverted *F8* locus permits factor 8 synthesis: explanation for low inhibitor risk and a role for pharmacogenomics. Blood. 2015 Jan;125(2):223–8

**Исследования изменений надмолекулярной
и кристаллической структуры бактериальной целлюлозы,
подвергшейся деградации целлобиогидролазой
из *Scytalidium candidum* 3С**

Иванова Л.А.¹, Копица Г.П.¹, Кульминская А.А.¹, Баранчиков А.Е.², Цвигун Н.В.³

¹ *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

² *Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва, Россия*

³ *ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, 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 [1]. Физико-химические свойства и уникальная структура нано-гель-плёнки (НГП) бактериальной целлюлозы обуславливают ее широкое использование при создании новых композитных материалов для хирургии, медицины, кулинарии и др. областей [2,3]. Известно, что при использовании традиционных медицинских средств терапии различных ран частая смена перевязочного материала влечет за собой травмирование их поверхностей [4]. Использование же БЦ в качестве раневого покрытия, для которого необходимы гигроскопичность, водо- и паропроницаемость материала, механическая прочность и биосовместимость, представляется весьма перспективной альтернативой. Однако одним из существенных ограничений применения биопленок БЦ для лечения ран является их низкая резорбция из-за отсутствия в организме человека целлюлолитических ферментов.

Целью данной работы было изучение процесса деградации целлюлозных нано-гель пленок под воздействием целлобиогидролазы из гриба *Scytalidium candidum* 3С и выбор условий для биодеградации БЦ *in vivo*. Методами РФА, СЭМ, МУРР и МУРН проведены исследования кристаллической и надмолекулярной структуры НГП БЦ на различных стадиях ферментативного гидролиза. Комплексный анализ экспериментальных данных выявил лишь незначительные изменения структуры НГП в процессе деградации, что свидетельствует о сохранении физико-химических и механических свойств бактериальной целлюлозы.

1. Malcolm, B. R. Cellulose: Molecular and Structural Biology, Selected Articles on the Synthesis, Structure, and Applications of Cellulose / B. R. Malcolm [Eds.]. – Springer, 2007. – P. 355.
2. Anton-Sales I, Beekmann U, Laromaine A, Roig A, Kralisch D., Opportunities of bacterial cellulose to treat epithelial tissues./ I Anton-Sales [Eds.] - Curr Drug Targets. 2018 Nov 28.
3. Sheikhi A, Hayashi J, Eichenbaum J, Gutin M, Kuntjoro N, Khorsandi D, Khademhosseini A., Recent advances in nanoengineering cellulose for cargo delivery/ A. Sheikhi [Eds.] - J Control Release. 2018 Nov 27;294:53-76
4. А.В.Бледнов. Перспективные направления в разработке новых перевязочных средств /Новости хирургии, №1, 2006.

Нейропротекторный эффект форсколина против нейротоксического действия гомоцистеина в нейронах мозжечка и коры головного мозга крыс *in vitro*.

Иванова М. А., Абушик П. А.

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

etrnlrddl@gmail.com

Серосодержащая аминокислота L-гомоцистеин вовлечена в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний [1]. Ранее нами было показано, что L-гомоцистеин, способен избирательно активировать рецепторы глутамата NMDA и mGluR5 типа в нейронах мозжечка и коры головного мозга крыс и чрезмерная активация данных рецепторов вызывает кальциевую дисрегуляцию, дисфункцию митохондрий и клеточную гибель по механизмам апоптоза и некроза [2].

Известно, что активация циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) инициирует нейропротекторные сигнальные каскады [3]. В связи с этим интересно было изучить возможное нейропротекторное действие форсколина, способного активировать аденилатциклазу, а впоследствии увеличивать синтез цАМФ, в условиях нейротоксического действия L-гомоцистеина на нейроны мозжечка и коры головного мозга крыс и определить участников данного сигнального каскада.

Методом флуориметрического выявления апоптотических и некротических клеток путем последовательного окрашивания акридиновым оранжевым и бромистым этидием нам удалось показать, что 1 мкМ форсколина предотвращал эксайтотоксическую гибель нейронов ЦНС. С использованием данного подхода, в экспериментах с ингибитором протеинкиназы А (1мкМ), блокатором протеинкиназы С (хелеритрином 0,6 мкМ) или блокатором СаМКII (KN93 3 мкМ) нам удалось определить, что в нейронах коры головного мозга в нейропротекторный эффект форсколина при длительном (4ч) действии L-гомоцистеина (50 мкМ) вовлечены протеинкиназа А и СаМКII, в нейронах мозжечка - протеинкиназа А и блокатор протеинкиназы С.

Иммуноцитохимический анализ экспрессии проапоптотических белков BAX, AIF, каспаза-3 и p53 показал качественное снижение их экспрессии при действии 1 мкМ форсколина совместно с 50 мкМ L-гомоцистеина по сравнению с действием только агониста. Уровень антиапоптотического белка bcl-2 увеличивался на фоне действия 1 мкМ форсколина, тем самым подтверждая его нейропротекторный эффект.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-00653 и Стипендией Президента РФ.

1. Bhatia P, Singh N. Homocysteine excess: delineating the possible mechanism of neurotoxicity and depression. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 29(6): 522-528 (2015).
2. Abushik P.A., et al. Pro-nociceptive migraine mediator CGRP provides neuroprotection of sensory, cortical and cerebellar neurons via multi-kinase signaling. *Cephalalgia.* 37(14): 1373-1383 (2017).
3. Cameron E.G., Kapiloff M.S. Intracellular compartmentation of cAMP promotes neuroprotection and regeneration of CNS neurons. *Neural Regen Res.* 12(2): 201-202 (2017).

**Роль взаимодействия жировой и мышечной ткани
в регуляции слияния миобластов
в процессе развития и регенерации скелетной мускулатуры**

Иванова О. А.^{1,2}, Комарова М. Ю.^{1,3}, Дмитриева Р. И.¹.

¹ ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

astroksana@gmail.com

Ключевой стадией формирования мышечного волокна является слияние миобластов [1], [2]. Нарушения данного процесса, обусловленные генетическими, метаболическими или иными факторами, приводят к деградации скелетной мускулатуры, ее замещению на жировую или фиброзную ткань. Известно, что патологическое взаимодействие между мышечной и жировой тканью может пагубно влиять на развитие и регенерацию мышц [3]. В данной работе мы использовали модель мышечной дифференцировки *in vitro* на основе линии миобластов C2C12, чтобы исследовать влияние адипогенного сигнала на слияние миобластов.

Использовались три типа стимуляции дифференцировки миобластов линии C2C12: миогенная DM1, адипогенная DM2, смешанная DM3 – одновременно DM1 и DM2. Миотрубки фиксировали и окрашивали с использованием антител к MYHs, размер трубок определяли с использованием ПО Zeiss Zen. РНК-экспрессию определяли с помощью qPCR. РНК-секвенирование проводили на приборе MiSeq с целью выявления глобальной

картины согласованной регуляции миогенных и адипогенных стимулов. Анализ данных секвенирования и визуализацию проводили с помощью веб-приложения Phantasia.

При всех типах дифференцировки образовались миотрубки. Иммуноцитохимия подтвердила их зрелость (MYH+). Морфология миотрубок различалась: в DM1/DM3 наблюдались преимущественно длинные и толстые трубки, в DM2 - короткие и тонкие (различие - $p < 0.001$). Самый высокий коэффициент слияния показала DM2 культура. Однако, 47% трубок в DM2 были образованы слиянием 3-х и менее миобластов, в то время как в DM1/DM3 ~70% миотрубок были 4-15-ядерные. Морфология волокон коррелирует с РНК-экспрессией основных регуляторов слияния миобластов *myomaker* и *myomixer*: она снижена в DM2. Анализ РНК-секвенирования показал, что сигнальные пути, отвечающие за этап слияния миобластов при развитии/регенерации миотрубок, ингибированы при стимуляции адипогенеза DM2.

Запуск адипогенной дифференцировки клеток C2C12 приводит к нарушениям в созревании миотрубок на стадии слияния миобластов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ. Соглашение № 16-15-10178 от «18» мая 2016 г.

1. Srihari C. S., Srinath C. S., et al, *Skel. Muscle*, 8, 1 (2018).
2. Susan M. A., Grace K. P., *Dev.* 139, 4, (2012).
3. Rahemi H., Nigam, N., et al, *J. R. Soc. Interface*, 12, 109, (2015).

Выявление роли E-кадгерина в инвазии условно-патогенных бактерий *Serratia grimesii* в клетки эукариот.

Ивлев А. П., Хайтлина С. Ю.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

andrewivlev1410@gmail.com

Инвазия – сложный процесс взаимодействия бактериальной и эукариотической клеток, в котором участвуют как ферменты бактерий, так и рецепторы клетки-хозяина. Согласно литературе, E-кадгерин, белок межклеточных контактов, является одним из рецепторов для инвазинов – бактериальных поверхностных белков, которые при взаимодействии с рецептором запускают сигнальный каскад реакций в бактерии, приводящий к интернализации бактерии [1]. Ранее было показано, что под действием антиоксиданта N-ацетилцистеина возрастает чувствительность клеток иммортализованных мышинных фибробластов 3Т3 и их трансформированных аналогов 3Т3 SV40 к инвазии, коррелирующая с увеличением экспрессии E-кадгерина. В клетках 3Т3 и 3Т3 SV40 также была обнаружена колокализация бактерий *Serratia grimesii* с E-кадгеринном [2].

Известно, что E-кадгерин содержится в липидных рафтах – участках плазматической мембраны, обогащённых холестерином, сфинголипидами и насыщенными фосфолипидами [3]. Встраивание мембранных белков в липидный рафт приводит к его стабилизации, а последующее связывание лигандов с рецепторами запускает передачу внутриклеточного сигнала. Поэтому целью данного исследования стало выявление роли E-кадгерина в инвазии бактериями *S. grimesii* в клетки дермальных фибробластов DF2. Для изменения рафтов, путём удаления холестерина, использовалась обработка метил-бета-циклодекстрином (MbCD). Изменения определялись методом конфокальной микроскопии (КМ) и микробиологическим тестом (МТ).

Согласно данным КМ, обработка клеток DF2 MbCD вызывает разборку рафтов на клеточной мембране и переход E-кадгерина в цитоплазму. В свою очередь, уменьшение чувствительности клеток DF2 к бактериальной инвазии, вызванное обработкой MbCD, указывает на участие белков рафтов в инвазии бактерий *S. grimesii*. Полученные результаты позволяют предположить, что взаимодействие E-кадгерина с инвазином ведет к интернализации бактерии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№17-04-00558).

1. Ribet D., Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues //Microbes and Infection. – 2015. – Т. 17. – №. 3. – С. 173-183.
2. Ивлев А.П., Ефремова Т.Н. и др. *Цитология*, 59(9), 601-608. (2017).
3. Seveau S. et al. Role of lipid rafts in E-cadherin–and HGF-R/Met–mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells //The Journal of cell biology. – 2004. – Т. 166. – №. 5. – С. 743-753.

Марганец-индуцированные нарушения энергетического метаболизма

Ивлева И. С., Майстренко В. А., Муружева З.М., Карпенко М. Н.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

I.S.Oblamskaya@mail.ru

На протяжении многих лет в промышленности используются вредные химические вещества, токсическое влияние которых обнаруживается только после длительного контакта с источником интоксикации. Одним из таких элементов является марганец, накопление которого в организме вызывает развитие «болезни сварщиков» - марганцевой энцефалопатии [1]. Основное повреждающее действие данного микроэлемента связывают с его способностью через Ca²⁺-унипортеры проникать внутрь митохондрий, вызывать нарушения гомеостаза кальция митохондрий, что приводит к Ca²⁺ перегрузке и нарушению работы ферментов дыхательной цепи, сопровождающейся увеличением гидролиза АТФ и интенсификацией производства АФК [2]. Дефекты в структуре комплекса переноса электронов, в первую очередь, вызывают дисфункцию клеток ЦНС и это неудивительно, поскольку энергетические потребности нейронов обеспечиваются ими исключительно за счет окислительного фосфорилирования [3].

Целью данного исследования было определение показателей энергетического обмена в крови и в клетках ЦНС животных с индуцированной марганцевой энцефалопатией.

Работа выполнена на крысах линии Вистар, массой 220-250 г (n=20). Экспериментальная группа крыс (n=10) получала интраназально MnCl₂ (1мг/дн на животное) в течение 10 недель. Контрольные животные – тот же объем физиологического раствора. Спектрофотометрическими методами были измерены уровни лактата, пирувата и ЛДГ в сыворотке крови и гомогенате клеток стриатума.

Оказалось, что в крови опытных крыс уровень лактата снизился на 27%, уровень пирувата увеличился на 12%, а активность ЛДГ возросла в 1,5 раза, по сравнению с контрольными животными. При этом отношение лактат/пируват в крови было в 1,5 раза ниже, чем контрольной группе. В гомогенате клеток стриатума обнаружено увеличение уровня лактата на 67% и снижение уровня пирувата на 10%, при этом активность ЛДГ была увеличена 2 раза, а отношение лактата к пирувату в 1,7 раза по сравнению с контролем.

1. Irina Oblamskaya et.al. Trace Elements and Electrolytes. 35, 4, 184-186 (2018). DOI 10.5414/TEX0155402
2. Farina M. et al. Neurochem. Int. 62, 5, 575-594 (2013)
3. Pellerin L. et al. Developmental neuroscience. 20, 4-5, 291-299 (1998).

**Исследование влияния
модифицированного иммуноглобулинового препарата
на выживаемость мышинных моделей экспериментального сепсиса**

Илюкина Н.А.¹, Старкина О.В.^{1,2}, Василев Ч.Л.^{1,2}

¹ *Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

² *Центр молекулярной биологии и биомедицины, Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

letjagaletjaga@yandex.ru

Сепсис является результатом мощного неконтролируемого воспалительного ответа системы врожденного иммунитета против патогенов и также является одной из основных причиной смерти в мире. Специфические лекарственные средства для лечения сепсиса пока не существуют. Иммуноглобулиновые препараты для венозного введения содержат иммуноглобулины класса G, полученные от большой группы здоровых доноров плазмы. Препараты содержат антитела к антигенам многих бактерий, вирусов и даже к некоторым антигенам собственного организма – то есть являются полиспецифичными [1]. В последнее время были разработаны технологии для дополнительного увеличения их полиспецифичности. В одном из вариантов повышение полиспецифичности достигалось воздействием низких концентраций ионов железа Fe(II). Подобные препараты имеют терапевтический потенциал[2].

Целью настоящей работы является изучение влияния модифицированного ионами железа Fe (II) иммуноглобулинового препарата на жизненную способность мышей при моделировании экспериментального сепсиса.

Задачи:

- провести сравнительный анализ нативного иммуноглобулинового препарата и модифицированного с дополнительно увеличенной полиспецифичностью;
- исследовать, связано ли усиление полиреактивности антител с появлением способности модифицированного иммуноглобулинового препарата взаимодействовать с собственными антигенами человека.

Экспериментальное септическое состояние мышей линии Balb/c было индуцировано внутрибрюшными инъекциями биоматериала. Препараты иммуноглобулина G были введены внутривенно. Установлено, что применение модифицированного ионами железа Fe(II) иммуноглобулина G повышает выживаемость мышей с экспериментальным сепсисом в сравнении с использованием нативного иммуноглобулина G. Необходимо более подробное

изучение взаимодействия модифицированного препарата с аутоантигенами с использованием пептидных микрочипов, содержащих 2 733 пептидов, которые являются В-клеточными эпитопами аутоантигенов человека (фирмы PEPperChip, Гейдельберг, Германия) и также микрочипа, содержащего более 8 000 белков человека (HuProt™, фирмы Cambridge Protein Arrays, Великобритания).

1. Gonnert F. A., Recknagel P., et al., J. of Surgical Research. 170, 123-134 (2011).
2. Djoumerska-Alexieva I., Roumenina L. et al., J. Mol. Med. 21, 1002-1010 (2015).

Разработка конструкции для экспрессии иммуногенных вирусных белков в *E.coli* с использованием стрептавидина

Исаков М.А.¹, Матюшенко В.А.², Меженская Д.А.², Исакова-Сивак И.Н.²

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

isa-misha7@yandex.ru

Векторные вакцины являются приоритетными разработками российской и мировой науки. Они способны обеспечить защиту от целого круга инфекционных заболеваний, в том числе и возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), таких как респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), метапневмовирус (МПВ), вирус парагриппа (ВПГ) и др [1]. Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) является оптимальной векторной системой для доставки антигенов различных возбудителей ОРВИ в клетки мишени [2]. Для оценки эффективности векторных вакцин необходимо показать, что выбранные для встраивания участки вирусов иммуногенны и/или обладают нейтрализующим эффектом, что должно быть подтверждено реакцией антиген-антитело, для чего требуется наработать чистые антигены.

Для решения данной задачи была выбрана система *E.coli*, а в качестве экспрессионного вектора – плазида рЕТ21а с клонированным стрептавидином дикого типа, который будет использован в качестве репортерного белка. Экспрессионная конструкция имеет следующую схему: стрептавидин – линкер-1 – сайт протеолиза TEV – линкер-2 – целевой белок – линкер-3 – His-tag – стоп-

кодон. В качестве целевых белков будут встроены нейтрализующий эпитоп F₂₄₃₋₂₉₄ – РСВ, эпитоп гемагглютинаина-нейраминидазы HN₂₅₀₋₄₀₈ – ВПГ и скомбинированные участки МПВ.

С использованием алгоритма i-TASSER мы показали, что самая оптимальная конфигурация вторичной структуры экспрессируемой белковой последовательности получится, если в качестве линкера-1 и линкера-2 использовать последовательность AAAPGAA, а в качестве линкера-3 – (GGGS)₂ [3]. В указанной комбинации линкерные последовательности практически не образуют вторичных структур, что будет способствовать увеличению эффективности отщепления стрептавидина от целевого белка по высокоспецифическому сайту расщепления для TEV-протеазы ENLYFQ↓S, а также способствовать максимальной стерической доступности гистидинового хвоста (His-tag) для очистки продукта методом афинной хроматографии.

1. Kotomina T., Korenkov D., et al., Hum Vaccin Immunother; 19:1-7, (2018).
2. Fedorova E. A., Smolonogina, et al., Bull Exp Biol Med; 164(6):743-748, (2018).
3. <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>.

Исследование процессов биокристаллизации для защиты генетического материала с помощью криоэлектронной томографии

Камышинский Р. А. ^{1,2}, Ю.М. Чесноков ^{1,2}, А.С. Орехов ^{1,2}, А.Л. Васильев ^{1,2}

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

² ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

kamyshinsky.roman@gmail.com

В настоящей работе с помощью криогенной электронной микроскопии детально проанализированы процессы кристаллизации белка Dps и ДНК, которые проявляются как защитный механизм при неблагоприятных условиях окружающей среды в бактериальных клетках *Escherichia coli* в стационарной фазе [1,2]. С помощью метода криоэлектронной томографии [3] в данной работе впервые получены структурные характеристики биокристаллов Dps-ДНК как *in cellulo*, так и *in vitro*, что позволило экспериментально показать сходства и различия в строении биологических объектов в нативном состоянии и в искусственной среде.

Актуальность исследования процессов биокристаллизации определяется рядом важных причин. Прежде всего, *in vivo* кристаллизация белков и их комплексов с нуклеотидами, не поддающихся кристаллизации *in vitro*, дает уникальную возможность исследовать их структуру на атомном уровне непосредственно в клетке. Известно, что структура биологических объектов, закристаллизованных в искусственных камерах кристаллизации, и их структура в нативном состоянии может существенно отличаться. Поэтому знание строения компонентов клеток атомного разрешения *in cellulo* необходимо для понимания фундаментальных функциональных свойств живой материи.

Исследование проводилось с помощью криогенного просвечивающего электронного микроскопа Titan Krios (FEI, США), оснащенного высокочувствительной системой прямого детектирования электронов Falcon II (FEI, США) а также корректором сферических aberrаций (Image corrector, CEOS, Германия) при ускоряющем напряжении 300 кВ. Набор экспериментальных данных проводился в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения Tomography (FEI, США) в режиме малых доз, что позволило минимизировать радиационные повреждения, сохраняя нативную структуру исследуемых объектов. Расчеты и трехмерная реконструкция проводились на мощностях многофункционального вычислительного комплекса Курчатовского центра обработки данных НИЦ «Курчатовский Институт».

1. Pletnev P., et al., Acta Naturae. 7, 22 (2015).
2. Vtyurina N. N., et al., Proc Nat Acad Sci USA. 113, 49872 (2015).
3. Lindsay A. Baker, et al., 46, 149 (2017).

**Тестирование новых подходов к лечению острых травм
в условиях доставки к месту травмы полимерных конъюгатов
в сочетании с метилпреднизолоном**

Кислицына И.Н.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

amina_g13@mail.ru

Буферные функции крови, кислотность рН и секреция ферментов в органах пищеварения, а также детоксикационные и фильтрационные свойства печени и почек являются препятствиями для доставки лекарств в клетки-мишени. Поэтому для преодоления подобных защитных функций организма биологически активные вещества, должны быть заключены в надлежащую гидрофильную биосовместимую матрицу для достижения максимального эффекта.

Целью работы было оценить эффективность доставки лекарств в нервную ткань с помощью полимерных конъюгатов в острую фазу развития травматического заболевания спинного мозга после инициирования ушиба у крыс. Использование основ нанотехнологий для доставки лекарств к месту повреждения позволяет контролировать процессы распределения препарата, а также избежать передозировки или неудачного эффекта от лечения. Ушиб был произведен с применением модифицированного метода А. Аллена.

Результаты показали, что мышцы подошвы и икроножной мышцы имеют сходные изменения в амплитудных характеристиках, но подошва более чувствительна к режиму иммобилизации, чем икроножная мышца. На ранней фазе травматического заболевания спинного мозга эпидуральная стимуляция изменяет функциональное состояние спинальных нейронов, которое выражается путем подавления прямой двигательной реакции подошвенной мышцы, увеличения рефлекторной возбудимости моторных центров мышц голени и ингибирования полисинаптических реакций. Вливание метилпреднизолона в соответствии со стандартным терапевтическим протоколом приводит к увеличению моторной реакции икроножных мышц крысы и подавлению рефлекторной возбудимости моторных центров. Применение полимерного комплекса с метилпреднизолоном после сотрясения спинного мозга оказывает влияние на уровень метилпреднизолона в центрах мышц голени крысы, который сохраняется в течение 6 часов, что подтверждает доставку метилпреднизолона в нервную ткань.

1. Kajstura, J. Myocyte cellular hyperplasia and myocyte cellular hypertrophy contribute to chronic ventricular remodeling in coronaryartery narrowing-induced cardiomyopathy in rats / J. Kajstura et al. // *Circ Res.* 1994. - Vol. 74, № 3. - P. 383-400.
2. Langevin, S. Does diet affect values obtained during prolonged ambulatory pressure monitoring / S. Langevin, S. F. DeNuna, D. O. Castell // *Dig Dis Sci.* 1993. № 38(2). - P. 225-232.
3. Rumessen, J J. Plexus muscularis profundus and associated interstitial cells. Ultrastructural studies of mouse small intestine / J. J. Rumessen, L. Thuneberg, H. B. Mikkelsen // *Anat Rec.* 1982. - V. 203, № 1. -P. 129-146.

Метод фенотипического исследования клеточных реакций на химические соединения при первичном скрининге *in vitro*

Клюшова Л. С.

Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики – структурное подразделение ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия

klyushovals@mail.ru

Многопараметрический скрининг (HCS, high content screening), объединяющий автоматическую флуоресцентную микроскопию с количественным анализом изображений, позволяет одновременно получать большое количество информативных измерений на уровне отдельных клеток [1]. HCS дает возможность детектировать фенотипические изменения клеточных популяций и представляет интерес для поиска новых лекарств на основе фенотипа (PDD, phenotypic drug discovery) [ii, iii]. При разработке помимо поиска целевых эффектов представляет сложность и наличие возможных побочных эффектов, поэтому корректная оценка таких эффектов на этапе первичного скрининга может увеличить выход соединений, обладающих высокой клинической эффективностью. В связи с этим возникла необходимость создания методов для оценки возможных побочных эффектов на этапе первичного скрининга *in vitro* для нетоксичных доз препаратов.

Данное исследование было направлено на разработку метода HCS для оценки влияния клинически одобренных препаратов и исследуемых соединений на клеточную линию Her2 (карцинома гортани). В качестве основы для определения фенотипа клеток использовали красители Hoechst 33342 (визуализация ядер) и DiD (1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate), флуоресцирующий при включении в клеточные мембраны и доступный для применения в скрининговых технологиях.

В результате исследования были выявлены изменения в популяциях клеток Her2 при воздействии некоторых клинически одобренных и тестируемых соединений. В нетоксичном диапазоне концентраций ряд препаратов приводил к изменению площади окраски DiD и клеточных ядер. Рассмотрение динамики и характера этих изменений показало, что эти параметры выступают в качестве индикаторов клеточного стресса и потенциальной токсичности препаратов. Это может быть использовано для оценки возможных побочных эффектов исследуемых соединений на этапе первичного скрининга, что позволит увеличить выход препаратов в клиническую практику.

Анализ частоты CGG повторов гена FMR1 в популяции северо-западного региона России.

Коган А. Е.^{1,2}, Иващенко Т. Э.¹

¹ *Лаборатория пренатальной диагностики наследственных заболеваний
Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии
имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия*

² *Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия.*

annakogan@mail.ru

Введение.

Синдром ломкой X хромосомы (синдром Мартина-Белл) - наследственное нейродегенеративное заболевание человека, которое встречается с частотой от 1/4000 до 1/6000. Причиной данного синдрома является экспансия тринуклеотидных повторов CGG в 5' - промоторной области гена FMR1 (Fragile X mental retardation), что приводит к недостаточной экспрессии белка FMR1. В норме числе повторов не превышает 54, премутационное состояние – от 55 до 200 (ассоциированные с синдромом симптомы), полная мутация – больше 200 повторов (выраженные симптомы болезни).[1]

Синдром фрагильной X хромосомы обнаружен во многих популяциях во всем мире.

Цель исследования.

Анализ частоты CGG повторов гена FMR1 в популяции северо-западного региона России.

Материалы и методы.

Проведено ДНК типирование CGG повторов в 5' - промоторной области гена FMR1 у 30 мужчин. ДНК выделена стандартным методом из 5 мл периферической крови. Количество повторов определяли при помощи полимеразной цепной реакции с последующим фрагментным анализом на капиллярном электрофорезе. Помимо размера основных повторов были определены прерыватели AGG в повторяющихся последовательностях.

Результаты и обсуждение.

В результате анализа 30 ДНК проб было выявлено, что наиболее частое количество CGG повторов – 30 копий (27%), реже – 29 копий (13%) и 31 копия (13%). CGG повторы от 19 до 41 копии встречались в единичных случаях.

В 67% образцов было идентифицировано 2 прерывателя AGG, в 30% – 1 прерыватель. В одном случае прерыватель идентифицирован не был.

Корреляции между количеством прерывателей и количеством повторов выявлено не было. Наиболее часто встречаемый аллель:

10х(CGG) (AGG) 9х(CGG) (AGG) 9х(CGG)

Если сравнивать с результатами, полученными в других странах, наибольшее сходство наблюдается со странами западной Европы и Америки (Хорватия, США, Чили, Бразилия), а наименьшее – с Японией и Индией. [2]

1. Chromatin changes caused by expansion of CGG repeats in fmr1 gene
Yudkin D.V., Lemskaya N.A., Grischenko I.V., Doloskiy A.A.
Molecular Biology. 2015. Т. 49. № 2. С. 179-184.
2. Fragile X syndrome: the FMR1 CGG repeat distribution among world populations, Pevrah E., Ann Hum Genet . 2012 March ; 76(2): 178–191. doi:10.1111

**Межсубъединичный контакт
различных SM-подобных белков бактерий и архей:
возможно ли перекрёстное взаимодействие?**

*Колесник В. В.^{1,2}, Леконцева Н.В.², Михайлина А.О.²,
Гарбузинский С.А.², Балобанов В.А.²*

¹ *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Институт белка РАН, Пущино, Московская обл., Россия*

uralm62@rambler.ru

Объектом нашего исследования являются белки, принадлежащие к семейству Sm-подобных (или Lsm) белков. Белки этого семейства являются мультифункциональными регуляторами трансляции, процессинга и деградации РНК, что, впрочем, не имеет значения в данной работе. [1]. Для нас более важно то, что многие Lsm белки являются термостабильными, а это делает их перспективными объектами для белковой инженерии.

Для белков данного семейства характерно сходство первичной и третичной структур, но четвертичная структура белков из различных доменов жизни отличается разным количеством мономеров. Для бактериальных белков характерны пространственные структуры гомогексамерного типа, для архейных белков – гомогептамерного типа [2, 3].

Несмотря на значительные усилия в изучении процесса самоорганизации Lsm белков пока не были выявлены ключевые особенности, определяющие их высокую стабильность. Несомненно, не последнюю роль в стабилизации структуры играют межсубъединичные контакты [4].

Нами был предложен новый подход для определения структурных элементов, определяющих специфичность олигомеризации Lsm белков. В нашем распоряжении имеется коллекция бактериальных и архейных Lsm белков. Для работы были получены и очищены Lsm белки из следующих организмов: *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, *Methanococcus Vanniellii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Methanococcus jannaschii*.

В данной работе, с помощью предложенного нами метода мы показали возможность образовывать бактериальными и архейными Lsm белками смешанные гетероолигомеры при совместной ренатурации. Также на основе экспериментальных данных были отобраны Lsm белки для теоретического анализа структур пар белков, которые взаимодействуют и не взаимодействуют, что позволит выявить структурные особенности, определяющие межсубъединичные взаимодействия в олигомере.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-24-00157

1. Achsel T., Brahm H., Kastner B., Bachi A., Wilm M., Lührmann R. (1999) A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3' end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO J.*, vol. 18, pp. 5789-5802.
2. Мурина В. Н., Никулин А.Д. (2011) РНК-связывающие Sm-подобные белки бактерий и архей: сходство и различия структур и функций. *Успехи биологической химии*, 51: 133-164
3. Toro, I., Basquin, J., Teo-Dreher, H. & Suck, D. (2002). Archaeal Sm proteins form heptameric and hexameric complexes: crystal structures of the Sm1 and Sm2 proteins from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J Mol Biol* 320, 129-42.
4. Moskaleva O., Melnik B., Gabdulkhakov A., Garber M., Nikonov S., Stolboushkina E. and Nikulin A (2010) The structures of mutant forms of Hfq from *Pseudomonas aeruginosa* reveal the importance of the conserved His57 for the protein hexamer organization. *Structural Biology and Crystallization Communications* F66, 760–764.

С2С12 как модель для изучения энергетического обмена в скелетной мускулатуре

Комарова М.Ю.^{1,2}, Игнатьева Е.В.¹, Дмитриева Р.И.¹

¹ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

komarovamy96@yandex.ru

При метаболических расстройствах скелетная мускулатура может накапливать жир. Мышцы являются основным регулятором термогенеза у теплокровных [1]. Поэтому, замещение мышечной ткани сказывается и на терморегуляции. Точные молекулярные процессы замещения мышечной ткани на жировую пока не описаны. Мышечные волокна могут запасать избыток энергии в виде жира, а могут рассеивать ее в виде тепла, как в бурой жировой ткани, где этот процесс регулируют белки семейства UCP [2]. Целью нашей работы является изучение динамики UCP в поддержании энергетического баланса в мышечной ткани на примере линии мышечных миобластов С2С12.

Дизайн исследования: (i) анализ динамики экспрессии генов в ходе дифференцировки в течение 4 дней, (ii) электростимуляция (5 Гц, 6 дней) использовалась для моделирования мышечных сокращений *in vitro*, (iii) анализ экспрессии генов и уровня белка под воздействием «холода» (32°C, 24 часа).

Анализ результатов: ПЦР в реальном времени; Вестерн Блоттинг.

Эффективность мышечной дифференцировки подтверждали иммуноцитохимическим окрашиванием. Уровень экспрессии Ucp2 в мышечной ткани был существенно выше, чем Ucp1/Ucp3. Также, его экспрессия стабильно увеличивалась на протяжении всего периода дифференцировки, в то время как Ucp1/Ucp3 показали лишь кратковременный рост экспрессии на 3 день после стимуляции.

Было выявлено снижение уровня мРНК Ucp1 и Ucp2 под действием электростимуляции по сравнению с образцами, не подверженными электростимуляции, что может указывать на участие Ucp1/2 в регуляции утилизации энергии при мышечных сокращениях. На «холоде» мы не выявили достоверных изменений в экспрессии UCPs. Под воздействием «холода» наблюдалось повышение экспрессии митофузинов, что может говорить о слиянии митохондрий [3]. При электростимуляции уровень мРНК митофузинов Mfn1/2 снижался.

Таким образом, показано ключевое значение семейства Ucp, особенно Ucp2, в утилизации энергии в мышечной ткани при сокращении, но не в регуляции термогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ. Соглашение № 16-15-10178 от «18» мая 2016 г.

Список литературы:

1. Leslie A. Rowland, Naresh C. Bal, and Muthu Periasamy. The role of skeletal-muscle-based thermogenic mechanisms in vertebrate endothermy. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2015 November; 90(4): 1279–1297. doi:10.1111/brv.12157.
2. Anna Fenzl and Florian W. Kiefer. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2014; 19(1): 25–37.
3. Antonio Zorzano. Regulation of mitofusin-2 expression in skeletal Muscle. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 34: 433–439 (2009).

Оценка окислительного стресса при подавлении экспрессии гена *swiss cheese* в различных типах клеток нервной системы *Drosophila melanogaster*

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

tem3650@yandex.ru

У известных мутантов *Drosophila melanogaster* по гену *sws* наблюдается патология нейронов и глиии в мозге [1]. Уже в первые дни жизни взрослого насекомого детектируется наличие аномальных складчатых структур вокруг тел нейронов, образованных глиальными клетками. Белок SWS локализуется в нервной системе в эндоплазматическом ретикулуме и выполняет функцию сериновой эстеразы [2].

Ранее нами было показано уменьшение количества митохондрий в нейронах мутантов *Drosophila melanogaster* по гену *sws*, а также мы показали гибель клеток глиии кортекса. Данные нарушения могут быть вызваны окислительным стрессом. Поступление большого количества кислорода неизбежно ведет к образованию АФК, что до некоторого порога нормально для

клетки [3]. Однако, если свободные радикалы накапливаются в высоких концентрациях, это приводит к окислительному стрессу, и, вызванному свободно-радикальными реакциями окисления компонентов клетки, приводящие к её гибели.

В данной работе были оценены показатели окислительного стресса у линий *Drosophila melanogaster* с мутациями в гене *sws* (*sws*¹ и *sws*⁷⁶⁻¹⁵) и в линиях с подавлением экспрессии *sws* в нейронах и глиальных клетках. Для определения уровня активных форм кислорода был выбран распространённый зонд H₂DCF-DA. У мутантных линий *sws*¹ и *sws*⁷⁶⁻¹⁵ уровень АФК выше по сравнению с контрольной линией, что, возможно, является одной из причин апоптоза нервных и глиальных клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00982.

1. Kremer M. C., Jung C., Batelli S., Rubin G. M., Gaul U.. The glia of the adult *Drosophila* nervous system//*Glia*. – 2017 – V.65 – P. 606-638
2. Kretzschmar D., Neurogenet J.. *Swiss cheese* et alii, some of the first neurodegenerative mutants isolated in *Drosophila*// – 2009 – V.23 – P.34-41
3. Болдырев, А. А. Окислительный стресс и мозг//Соросовский образовательный журнал. – 2001. – №. 4. – С. 21-28.

Исследования активности тройничного нерва крысы в условиях моделирования гипергомоцистеинемии

Коньшев Я.Г., Хаертдинов Н.Н., Королёва К.С.

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

mr.demyank@gmail.com

Гипергомоцистеинемия (гГЦ) это заболевание, связанное с высоким уровнем гомоцистеина в крови, она негативно сказывается на сердечно-сосудистой и нервной системе, приводит к оксидативному стрессу [1][2]. гГЦ стимулирует начало приступов мигрени. Литературные данные указывают на то, что боли при мигрени возникают из-за активации периферических отростков тройничного нерва в мозговых оболочках [3]

Целью данной работы является исследование электрической активности тройничного нерва крысы в условиях моделирования гипергомоцистеинемии.

Для моделирования пренатальной гГЦ использовали потомство крыс, получавших метионин с пищей. Объект исследования – изолированный препарат половины черепа крысы, из него вырезался отросток тройничного нерва и всасывался в стеклянный электрод. Вещества апплицировались в область расхождения медиальной менингеальной артерии. Для определения возбудимости тройничного нерва использовали H₂O₂ в концентрациях 10 мкМ, 30 мкМ и 300 мкМ и KCl в концентрациях 5 мм, 10 мм, 25 мм, 50 мм.

Анализ частоты потенциалов действия (ПД) тройничного нерва показал повышение базовой активности у животных с пренатальной гГЦ ($0,71 \pm 0,18$ s⁻¹ (n=9, p<0.05)) по сравнению с контрольной группой ($0,21 \pm 0,054$ s⁻¹ (n=6)).

У крыс с гГЦ Частота ПД достоверно увеличивалась с $0,71 \pm 0,18$ s⁻¹ в контроле до $1,07048 \pm 0,25$ s⁻¹ (n=9, p<0.05) при аппликации 10 мкМ H₂O₂, у здоровых животных достоверное увеличение ПД наблюдалось только в ответ на аппликацию 300 мкМ H₂O₂. При аппликации KCl достоверные изменения частоты ПД, наблюдаются при 5 мм у крыс с гГЦ, в сравнении с контрольной группой у которой изменения наступают при 25 мм KCl.

В условиях пренатальной гГЦ наблюдается повышение базовой частоты спайкования тригеминального нерва по сравнению с контрольной группой. Кроме того, чувствительность тройничного нерва к более низким концентрациям H₂O₂ и KCl у животных с гГЦ свидетельствует о повышенной возбудимости и чувствительности к оксидативному стрессу.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-15-00618.

1. M, Curro, M. Gungliandolo. *Neurochem Res*, (2014), 39, 1485-95
2. Ciaccio M, Bivona G., Bellia C. *Therap. and Clin. Risk Manag* (2008), 4, 219–224.
3. P.J. Goadsby. *J. Neuroscience*, (2007), 97, 3827

**Применение метода стохастического внедрения соседей
с распределением Стьюдента (tSNE)
в анализе метагеномных последовательностей**

Корженков А.А.¹, Теплюк А.В.^{1,2}

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия*

² *Балтийский федеральный университет им И. Канта, Калининград, Россия*

Korzhenkov_AA@nrcki.ru

Реконструкция индивидуальных геномов на основании метагеномных данных позволяет получить информацию о генетическом материале, физиологии и взаимодействии некультивируемых микроорганизмов. Впервые такие геномы были получены в 2004 году [1], а в 2017 Parks и коллеги в рамках одного исследования получили 8000 геномов из метагеномов [2].

Современные инструменты биннинга контигов, в т. ч. CONCOCT [3], GroopM [4], MetaBAT [5], MaxBin2 [6], COCACOLA [7] используют данные о представленности тетра nukлеотидов и среднем покрытии последовательностей. При обработке многомерных данных эти инструменты проводят снижение числа размерностей и последующую кластеризацию последовательностей. Ограничением вышеназванных инструментов является низкая эффективность при работе с единственным образцом.

Актуальные методы снижения размерности данных включают линейные техники, классическое многомерное шкалирование, факторный анализ и широкий спектр нелинейных техник. Метод стохастического внедрения соседей с распределением Стьюдента (t-distributed stochastic neighbor embedding, t-SNE) [8] был реализован с учётом недостатков вышеуказанных техник [9] и успешно применяется для снижения размерности и визуализации многомерных данных в разнообразных приложениях (машинное обучение, распознавание текстов, звуков и т.д.) [10].

В нашей работе был проведён анализ синтетического и реального метагеномов экстремофильных микробных сообществ. Каждой метагеномной последовательности более 1000 п.н. соответствовал 257-мерный вектор, включающий представленность каждого тетра nukлеотида и среднее покрытие. Данные были импортированы в среду R, нормализованы и приведены к двум измерениям при помощи t-SNE. Метагеномные бины сформированы из кластеров, полученных при помощи алгоритма HDBSCAN [11]. Полнота и контаминация была оценена при помощи CheckM [12].

Использование метода t-SNE позволило реконструировать геномы микроорганизмов из синтетических метагеномных данных на уровне широко используемых опубликованных инструментов.

1. Tyson, G. W., et al. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428(6978), 37.
2. Parks D. H. et al. (2017). Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature microbiology*. 2(11), 1533.
3. Alneberg, J., et al. (2014). Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature methods*, 11(11), 1144.
4. Imelfort, M., et al. (2014). GroopM: an automated tool for the recovery of population genomes from related metagenomes. *PeerJ*, 2, e603
5. Kang, D. D., et al. (2015). MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ*, 3, e1165.
6. Wu, Y. W., Simmons, B. A., Singer, S. W. (2015). MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 32(4), 605-607.
7. Lu, Y. Y., et al. (2017). COCACOLA: binning metagenomic contigs using sequence COmposition, read CoverAge, CO-alignment and paired-end read LinkAge. *Bioinformatics*, 33(6), 791-798.
8. van der Maaten, L., Hinton, G. (2008). Visualizing data using t-SNE. *Journal of machine learning research*, 9(Nov), 2579-2605.
9. van der Maaten, L., Postma, E., Van den Herik, J. (2009). Dimensionality reduction: a comparative review. *J Mach Learn Res*, 10, 66-71.
10. van der Maaten, L. (2014). Accelerating t-SNE using Tree-Based Algorithms. *Journal of Machine Learning Research* 15(Oct):3221-3245.
11. Campello, R. J., et al. (2015). Hierarchical density estimates for data clustering, visualization, and outlier detection. *ACM Transactions on Knowledge Discovery from Data (TKDD)*, 10(1), 5.
12. Parks, D. H., et al. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, gr-186072.

Индекс метилирования импринтированных генов *DLK1*, *NESP55* и *GRB10* при нарушениях эмбрионального развития человека

Крикунова П.А.^{1,2}, Лапшина В.В.^{1,2}, Беличенко Д.В.^{1,2}, Саженова Е.А.²

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

² НИИ Медицинской генетики ФГБНУ Томского НИМЦ РАН, Томск, Россия

p.krikunova56@gmail.com

Актуальность. Невынашивание беременности – актуальная проблема современного акушерства, которая затрагивает примерно 25% супружеских пар. Репродуктивную функцию человека контролируют генетические и эпигенетические факторы, одним из которых является геномный импринтинг – особый вид регуляции активности генов в зависимости от пола родителя. Его механизмы связаны с метилированием импринтированных локусов, нарушение в которых приводит к эпимутациям и изменению экспрессии этих генов [1]. *DLK1* - фактор роста, вовлечен в нейроэндокринную и клеточную дифференцировку. *NESP55* - биомаркер для эндокринных и нейроэндокринных опухолей, принимает участие в клеточном росте. *GRB10* - адаптерный белок, который взаимодействует с рецепторами тирозинкиназ, сигнальных молекул, инсулина и инсулиноподобного фактора роста.

Цель. Анализ индекса метилирования (ИМ) импринтированных генов *DLK1*, *NESP55* и *GRB10* в выборке спонтанных (СА) и медицинских (МА) абортусов.

Материал и методы. В работе использовались образцы внезародышевой мезодермы 47 СА и 45 МА I триместра беременности с нормальным кариотипом. ИМ определяли путем пиросеквенирования 5 CpG-динуклеотидов для гена *NESP55*, 8 для *GRB10* и 9 для *DLK1* на пиросеквенаторе PyroMark Q24. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0».

Результаты. Средний показатель ИМ по всем CpG сайтам *NESP55* в группе СА (49,4±7,8%) был выше, чем в группе МА (42,7±9,6%) ($p < 0,01$). Значения ИМ всех CpG гена *DLK1* также был выше в группе СА по сравнению с МА - 48,5±7,4% и 42,3±8,4% соответственно ($p < 0,05$). В то время как среднее значение ИМ *GRB10* в выборке СА был ниже, чем в группе МА - 40,6±6,5%, и 50,2±4,4% соответственно ($p < 0,01$).

Выводы. Увеличение ИМ *NESP55* и *DLK1* может приводить к снижению экспрессии генов и к уменьшению количества продуцируемых белков, а снижение ИМ *GRB10* - к увеличению количества данного белка. Исходя из

функции этих генов, такие нарушения могли привести к подавлению роста эмбриона и остановке его развития.

1. Adalsteinsson BT, Ferguson-Smith AC. Epigenetic control of the genome-lessons from genomic imprinting. *Genes*. 2014; 5(3): 635-655.
2. Лебедев ИН, Саженова ЕА. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией. *Генетика*. 2008; 44(10): 1356–1373.pt
3. Саженова ЕА, Никитина ТВ, Скрыбин НА и др. Эпигенетический статус импринтированных генов в плаценте при привычном невынашивании беременности. *Генетика*. 2017; 53 (3): 364-377.

Изучение альтернативных вариантов фактора транскрипции PAX4 при моногенных формах диабета

Кузнецова А. И.¹, Краснова Т. С.², Орехова А. С.², Рубцов П. М.^{1,2}

¹ *Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия*

² *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

anyakuznetsova5@mail.ru

MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) – это заболевание, обусловленное дефектами в функционировании β -клеток поджелудочной железы [1]. В данной работе изучены альтернативные формы транскрипционного фактора PAX4 дикого типа. PAX4 принимает участие в регуляции инсулинового и глюкагонового промоторов в клетках поджелудочной железы. N-конец белка высококонсервативен; на C-конце расположен трансактиваторный домен. Особенностью PAX4 является наличие домена отрицательной регуляции, расположенного перед доменом трансактивации, который подавляет активность последнего, поэтому PAX4 выступает в качестве репрессора транскрипции во многих типах клеток. Однако клетки крысиной инсулиномы могут возможно образовывать укороченный вариант белка с отсутствием регуляторного домена и PAX4 действует как активатор [2]. Известно несколько изоформ PAX4, не описанных ранее в литературе. Альтернативные варианты отличаются друг от друга C-концевой частью, следовательно, могут по-разному влиять на активность инсулинового и глюкагонового промоторов.

Ранее было показано, что менее консервативная С-концевая область гена PAX4 определяет его функцию в зависимости от типа клеток [3]. Мы получили конструкции, кодирующие различные формы PAX4 дикого типа, отличающиеся друг от друга на С-конце и характеризующиеся наличием в двух вариантах делеции одного экзона. Для изучения влияния изоформ на транскрипционную активность мы провели котрансфекцию клеток НЕК293 плазмидой, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем инсулинового промотора, и плазмидами, обеспечивающими экспрессию белков PAX4. Установлено, что варианты PAX4 с делецией выступают в качестве репрессоров транскрипции, а полные варианты действуют как активаторы. В настоящее время проводится сравнительный анализ их влияния на активность инсулинового и глюкагонового промоторов в клетках мышины инсулиномы MIN6.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №17-29-06049 и №18-04-01271).

1. Vaxillaire M., Froguel P., Monogenic diabetes of the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 29, 254 (2008).
2. Lorenzo P., et al., The Diabetes-Linked Transcription Factor PAX4: From gene to functional consequences. *Genes.* 8, 101 (2017).
3. Fujitani Y., et al., Identification of a Portable Repression Domain and an E1A-Responsive Activation Domain in Pax4: a Possible Role of Pax4 as a Transcriptional Repressor in the Pancreas. *Mol. and cel. biology.* 19, 12 (1999).

Сравнительная характеристика солей антиоксидантных пептидов с хиральной диментилдитиофосфорной кислотой

*Кузнецова Е.В.¹, Ахмадишина Р.А.¹, Али Руба¹, Ахмедова Г.Р.²,
Гарифуллин Р.И.¹, Низамов И.С.², Абдуллин Т.И.¹*

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

² *Химический институт им. А.М. Бутлерова,
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

e_v_kuznetsova@bk.ru

Актуальной задачей в области биоорганической и медицинской химии является создание новых методов модификации белков и пептидов с целью направленного изменения их структуры, физико-химических и биологических

свойств [1-3]. Перспективным подходом является нековалентная модификация пептидов, не нарушающая их специфическую активность. О,О-замещенные дитиофосфорные кислоты (ДТФК) способны образовывать биоактивные аммониевые соли с олигопептидами [4]. В работе проведено сравнительное исследование солей ДТФК на основе (S)-(-)-ментола с трипептидом глутатионом (GSH) и синтетическим тетрапептидом Tyr-Arg-Phe-Lys, обладающими антиоксидантными свойствами. Модифицированные олигопептиды охарактеризованы с использованием ИК- и ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, кругового дихроизма и динамического рассеяния света.

По данным DPPH-теста дитиофосфорный компонент усиливал радикал-связывающую активность GSH, но слабо влиял на антиоксидантные свойства Tyr-Arg-Phe-Lys. По данным МТТ-теста соль GSH проявила значительно более высокую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток РС-3 и РС-12 ($IC_{50}=4\pm 1$ и 14 ± 3 μ M) по сравнению с Tyr-Arg-Phe-Lys ($IC_{50}=161\pm 12$ и 219 ± 17 μ M), что, вероятно, обусловлено редокс-модулирующим действием ДТФК-GSH [5]. По данным проточной цитометрии ДТФК-GSH в ингибирующей концентрации вызвал почти 2-кратное снижение содержания активно пролиферирующих клеток (фаза G2), а также в нетоксичной концентрации – морфологические изменения и образование отростков у клеток РС-12. Результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования солей олигопептидов с ДТФК в качестве биоактивных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 18-33-00983 mol_a, 18-415-160012-р и в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

1. Kubota K., et al., J. Am. Chem. Soc. 140, (2018).
2. Cha S.J., et al., Oxid. Med. Cell. Longev. 9, (2017).
3. Mansfield K. M., et al., J. Am. Chem. Soc. 7, 3, (2018).
4. Akhmadishina R., Kuznetsova E., et al., Peptides 99, (2018).
5. García-Giménez J. L., et al., Biochimica et Biophysica Acta 1830, (2013)

**Изменение локализации перинейрональных сетей
внеклеточного матрикса головного мозга мышей линии C57BL/6
в результате моделирования шизофрении
в эксперименте путем длительной блокады NMDA-рецепторов**

Кузьмина Д.М.^{1,2}, Белоусова И.И.², Мухина И.В.²

¹ *Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия;*

² *Приволжский исследовательский медицинский университет Министерства здравоохранения России, Нижний Новгород, Россия*

dariak2294@gmail.com

Целью исследования является изучение изменений локализации перинейрональных сетей внеклеточного матрикса головного мозга мышей при моделировании шизофрении в эксперименте путем длительной блокады NMDA-рецепторов.

Исследование проводилось на мышах линии C57BL/6 (самцы), возраст 8 недель, n=20; использовался неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов – (-/-)МК-801. Блокада рецепторов осуществлялась в течение 10 дней. Контроль эксперимента осуществлялся путем введения одной группе животных физиологического раствора. Смоделированное шизофреноподобное состояние контролировалось изменением реакции предстимульного торможения. Затем было проведено иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов мозга животных.

Выявлено, что в результате блокады NMDA-рецепторов наблюдаются нарушения реакции предстимульного торможения, что подтверждает развитие шизофреноподобного состояния у животных. Исследование парафиновых срезов мозга с использованием иммуногистохимического окрашивания показало, что в результате длительной блокады NMDA рецепторов происходит деградация перинейрональных сетей внеклеточного матрикса мозга, что подтверждается снижением агреган положительных нейронов в области миндалины головного мозга.

Таким образом было выявлено, что длительная блокада NMDA-рецепторов приводит к формированию шизофреноподобного состояния у мышей линии C57BL/6. При этом длительное введение антагониста NMDA-рецепторов МК-801 вызывает деградацию перинейрональных сетей внеклеточного матрикса мозга в области миндалины.

1. Nakazawa K., Jeevakumar V., Nakao K. Spatial and temporal boundaries of NMDA receptor hypofunction leading to schizophrenia. NPJ Schizophr. 3, 1, 7 (2017).
2. Tohyama M. Molecular basis of major psychiatric diseases such as schizophrenia and depression. Anat. Sci. Int. 90, 3, 137–143 (2015).
3. Zain M.-A., Rouhollahi E., Pandey V., et al. Phencyclidine dose optimisation for induction of spatial learning and memory deficits related to schizophrenia in C57BL/6 mice. Pharmacology. 1, 3-10. (2018).

Механизмы импорта и утилизации новых форм витамина В3 клетками человека НЕК293

*Куликова В.А.^{1,2}, Кропотов А.В.¹, Нериновский К.Б.³, Якимов А.П.⁴,
Шабалин К.А.⁴, Светлова М. П.¹, Соловьева Л. В.¹,
Ходорковский М.А.², Никифоров А.А.¹*

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

³ *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

⁴ *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

veronika.a.kulikova@gmail.com

Основным способом регуляции уровня никотинамидадениндинуклеотида (NAD) в клетках человека является его биосинтез из поступающих с пищей предшественников: никотинамида (Nam) и никотиновой кислоты (NA), известных как витамин В3, а также новых форм витамина В3 - рибозидов никотинамида (NR) и никотиновой кислоты (NAR) [1,2].

Механизм импорта нуклеозидов NR и NAR в клетки человека неизвестен. За транспорт пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов в клетки человека отвечают переносчики, принадлежащие к двум семействам трансмембранных белков - ENT (equilibrative nucleoside transporters) и CNT (concentrative nucleoside transporters) [3].

Целью данной работы была проверка гипотезы о том, что переносчики ENT и CNT могут также транспортировать через плазматическую мембрану нуклеозиды NR и NAR. Для этого клетки человека линии НЕК293 выращивали в присутствии нуклеозидов NR или NAR и с помощью ЯМР-спектроскопии анализировали изменения их концентрации в кондиционированной питательной среде после сверхэкспрессии или фармакологического ингибирования белков ENT1-4 или CNT1-3. Мы показали, что импорт нуклеозидов NR и NAR опосредуют переносчики семейства ENT. При этом эффективность импорта нуклеозидов зависит от степени их утилизации в клетке. Так, нуклеозид NR эффективно транспортируется в клетку и расщепляется до Nam цитозольной фосфорилазой PNP, при ингибировании которой импорт нуклеозида подавляется. Тогда как, значительное уменьшение концентрации нуклеозида NAR в кондиционированной среде наблюдается лишь после сверхэкспрессии в клетках киназы NRK, катализирующей превращение NAR в мононуклеотид никотиновой кислоты.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10240).

1. Nikiforov A., Kulikova V., Ziegler M. 2015. The human NAD metabolome: functions, metabolism and compartmentalization. *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* 50: 284-297.
2. Kulikova V.A., Gromyko D.V., Nikiforov A.A. 2018. The Regulatory Role of NAD in Human and Animal Cells. *Biochemistry (Moscow)*. 83: 800-812.
3. Young J.D., Yao S.Y., Baldwin J.M., Cass C.E., and Baldwin S.A. 2013. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med.* 34: 529-547.

CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут гена интерферон-индуцированного трансмембранного белка-3 (IFITM3)

Кухарева А.П.^{1,2}, Бондаренко А.Б.^{2,3}

¹ *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

² *ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия*

³ *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

aleksandra.kuhareva@pharminnotech.com

Интерферон-индуцированные белки IFITM состоят из двух трансмембранных доменов, цитоплазматического домена и имеют короткие N- и C-концевые области [1,2]. Всего в геноме человека обнаружено пять генов IFITM. В ходе изучения данных белков были открыты их противовирусные свойства [3]. В основном IFITM изолируют входящие вирусные частицы в эндосомах, препятствуя их трансфузии. IFITM3 ингибирует большинство вирусов однако недавно была показана его роль в развитии опухолевых клеток человека. Но сами механизмы экспрессии еще не до конца исследованы [4]. Для изучения данных процессов необходимо создать клеточную линию с нокаутом генов.

Для нокаута экспрессии IFITM3 в клетках A549 использовался вектор lentiCRISPRv2 [5] рестрицированный по сайту Esp31 и лигированный двухцепочечной короткой РНК (дкРНК) последовательностью участков экзона-1 и промотора таргетного гена. Частицы лентивируса были получены ко-трансфекцией клеток HEK293T полученным вектором lentiCRISPRv2

(экспрессирующего таргетные дкРНК), пустым вектором в качестве контроля и рLP1, рLP2 и рLP/VSVG плазмидами. Клетки A549 были заражены полученными частицами с последующей селекцией на пурамицине (2 мкг/мл, 2 недели). Полученные стабильные клеточные линии были клонированы в 96-луночный планшет. Эффективность нокаута гена IFITM3 в IFN- α 2b-обработанных клонах была определена с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания фиксированных клеток и вестерн-блот анализа клеточных лизатов с использованием антител, специфичных к IFITM1, IFITM2, IFITM3 и альфа-тубулина. Результаты вестерн-блота подтверждались ПЦР, специфичной для каждого локуса IFITM.

Из 12 полученных клонов 3 не экспрессировали IFITM3.

Стабильный CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут генов IFITM3 в клетках A549 необходим для дальнейшего исследования вклада данного гена в процессы противовирусного ответа, адгезии клеток, канцерогенеза и прогрессии рака [6,7].

1. Bailey C.C., Kondur H.R., Huang I., Farzan M. Interferon-induced transmembrane protein 3 is a type II transmembrane protein. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 32184–93.
2. Weston S., Czieso S., White I.J. et al. A membrane topology model for human interferon inducible transmembrane protein 1. *PLoS One* 2014; 9(8): e104341.
3. Bailey C.C., Zhong G., Huang I.C., Farzan M. IFITM-family proteins: the cell's first line of antiviral defense. *Annu. Rev. Virol.* 2014; 1: 261–83.
4. Hu J., Wang S., Zhao Y. et al. Mechanism and biological significance of the overexpression of IFITM3 in gastric cancer. *Oncol. Rep.* 2014; 32: 2648–56.
5. Sanjana N.E., Shalem O., Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* 2014; 11: 783–4.
6. Siegrist F., Ebeling M., Certa U. The small interferon-induced transmembrane genes and proteins. *J. Interf. Cytokine Res.* 2011; 31: 183–97.
7. Zhang D., Wang H., He H. et al. Interferon induced transmembrane protein 3 regulates the growth and invasion of human lung adenocarcinoma. *Thorac. Cancer* 2017; 8: 337–43.

**Изучение роли фактора сборки и ремоделирования
хроматина дрозофилы Chd1
в процессе регуляции дозовой компенсации у дрозофилы**

Кучинская Я.А., Гненная Ю.А., Конев А.Ю.

*Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

Дозовая компенсация (ДК) - это выравнивание уровня экспрессии генов в половых хромосомах гетерогаметных организмов. У дрозофилы ДК реализуется путём усиления экспрессии генов X-хромосомы у самцов за счёт привлечения комплекса MSL, имеющего в составе белки MSL1-MSL3, ацетилтрансферазу MOF, РНК геликазу mle и 2 длинные некодирующие РНК [1]. Предметом работы является изучение функции консервативного хроматинремоделирующего фактора CHD1 в регуляции структуры X-хромосомы самцов и дозовой компенсации. У мутантов по Chd1 изменяется структура X-хромосомы самцов - происходит её сильная деконденденсация и деформация. [2]. При иммуноокрашивании X-хромосома самцов окрашивается антителами к CHD1 интенсивнее и в большем количестве сайтов, чем у самок. Ещё нагляднее усиленное связывание с X-хромосомой самцов проявляется у нуль-мутантов по гену Chd1: белок CHD1 материнского происхождения связывается исключительно с X-хромосомой. Инактивация MOF снижает уровень привлечения CHD1 к X-хромосоме самцов до того же уровня, что и в аутосомах. Сайты локализация комплекса MSL и белка CHD1 в X-хромосоме самцов дикого типа практически полностью совпадают. У самцов дикого типа MSL1 связывается исключительно с X-хромосомой, а MOF окрашивает ее гораздо интенсивнее, чем аутосомы. У мутантов Chd1 появляются аутосомные сайты связывания MSL1 и изменяется относительная интенсивность окрашивания X-хромосомы и аутосом антителами на MOF. В X-хромосоме самцов нуль-мутантов по гену Chd1 также нарушаются встраивание вариантного гистона H3.3 в X-хромосому и ацетилирование гистона H4 по лизину 16 (модификация, определяющая повышенную экспрессию генов в X-хромосоме самцов). Встраивание вариантного гистона H3.3 является одной из основных функций CHD1 [3]. Таким образом, нормальное функционирование комплекса MSL необходимо для усиленного привлечения CHD1 к X-хромосоме самцов. Наоборот, при мутациях гена Chd1, наблюдается изменение распределения компонентов комплекса MSL и ацетилирования гистонов, что вкпе позволяет предполагать непосредственное участие CHD1 в процессе ДК.

1. Conrad T. and Akhtar A., Nat Rev Genet. 13, 2 (2012).
2. Конев А. Ю., Тютюнник А. А., Барановская И. Л., Цитология. 58, 4 (2016).
3. Konev A.Y et al., Science. 317, 5841 (2007).

Возможности протеомных исследований в психиатрии: поиск биологических маркеров шизофрении

*Летова А.А.¹, Дмитриева Е.М.², Серегин А.А.²,
Дубровская В.В.², Гончарова А.А.²*

¹ *Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

² *Томский национальный исследовательский медицинский центр,
НИИ психического здоровья, Томск, Россия*

anastasia.a.letova@gmail.com

Гетерогенность и многофакторность шизофрении всегда препятствовали изучению патогенеза заболевания и задерживали создание доклинических моделей. Анализ протеома сыворотки крови больных шизофренией может быть использован в диагностических целях, а также для прогнозирования эффективности терапии, так как известно, что существуют нарушения белкового обмена при шизофрении.

Работа проводилась на 22 пациентах с шизофренией и 13 психически и соматически здоровых донорах. Подготовка образцов включала очистку от 6 мажорных белков методом аффинной хроматографии, разделение белков 1D PAGE, трипсинолиз белков в геле. Регистрацию масс-спектров проводили с помощью ионной ловушки LTQ VELOS (Thermo Scientific). Белки идентифицировали путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в соответствующих базах данных с использованием программного обеспечения Mascot Ver. 2.1 (Matrix Science). Для статистического анализа использовали точный критерий Фишера с поправкой Йетса и непараметрический критерий Манна-Уитни (STATISTICA 10.0). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

При сравнении протеомов сыворотки крови больных шизофренией и здоровых лиц обнаружены ДНК-связывающие белки, не выявленные у здоровых лиц, такие как Бромдомен, смежный с доменом 2В цинкового пальца [1], Центромер-ассоциированный белок E [2], KRAB-содержащий белок ZNF747 [3] и Гистон H1t2, необходимый для конденсации ДНК, связывающий двух- и одноцепочечную ДНК, АТФ и протамин-1 [4].

Появление белков, регулирующих транскрипцию, и участвующих в регуляции клеточного цикла и дифференцировки клеток у больных шизофренией, говорит о функциональных нарушениях, вызванных хроническим патологическим процессом.

Масс-спектрометрический анализ проведен на базе ЦКП «Протеом Человека» Института биомедицинской химии (ИБМХ), г. Москва. Проект

поддержан Министерством образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017).

Работа поддержана грантом РФФИ №18-15-00053 «Поиск периферических маркеров, ассоциированных с нарушением миелинизации головного мозга и патогенезом заболевания при шизофрении» 2018–2020 гг.

1. Kostrhon S., et al., J Biol. Chem. 292, 43 (2017).
2. Ohashi A., et al., Oncotarget. 7, 48 (2016).
3. Oleksiewicz U., et al., Stem Cell Reports. 9, 6 (2017).
4. Pan Ch., Fan Y., Biochim. Biophys. Acta. 1859, 3 (2016).

Комплексы сополимер-ДНК с включением золотых наночастиц

Лиходеева М. Н., Касьяненко Н. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

maria.likhodeeva@gmail.com

Наночастицы золота обладают уникальными физико-химическими свойствами, которые позволяют использовать их в биомедицинских целях [1]. Их можно использовать в качестве средств переноса лекарств и в биокатализе. Кроме того, у металлических наночастиц наблюдается поверхностный плазмонный резонанс, что позволяет использовать их в качестве маркера и для усиления комбинационного рассеяния, что значимо для доставки генов и лекарств [2, 3]. Эффективность их использования может меняться в зависимости от размеров и формы наночастиц, на что влияет синтез.

Предложен новый способ создания наночастиц золота без восстановителя с использованием синтетического сополимера. Подобраны оптимальные концентрации компонентов и время выдержки растворов для получения однородных золотых наночастиц. Изучено взаимодействие ДНК – сополимер в растворе с точки зрения формирования компактных частиц. Показано формирование комплексов золота с молекулой ДНК и с синтетическим сополимером.

Проведена оценка размеров и формы формируемых частиц золота и наночастиц ДНК с полимером и золотыми наночастицами методами ДРС и АСМ. Предложен способ создания генных векторов, содержащих золотые наночастицы при минимальном количестве ингредиентов в растворе.

1. An H., Jin B., *Biotechnol. Adv.* 30, 6 (2012).
2. Vigderman, L., Zubarev E., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 5 (2013).
3. Capek, I., *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017).

Роль ферментов-киназ в реализации нейропротекторного действия GDNF при моделировании гипоксии в первичных культурах гиппокампа *in vitro*

Логинова М. М.¹, Мищенко Т. А.^{1,2}, Ведунова М. В.¹, Митрошина Е. В.^{1,2}

¹ *Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

² *Приволжский исследовательский медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Россия*

pandaagron@ya.ru

В настоящее время гипоксия рассматривается как одно из основных патогенетических звеньев при ишемическом повреждении головного мозга и других патологиях ЦНС. Глиальный нейротрофический фактор (GDNF) предотвращает гибель нервных клеток при гипоксическом воздействии. Лиганд-связывающий компонент GFR α и тирозинкиназа RET образуют функциональный блок рецепторов для реализации биологического действия GDNF. Целью работы явилось изучение роли ключевых киназ, входящих в метаболический каскад GDNF: RET, MAP2K1/2, Erk2, RAF и AKT1/2, в адаптации нервных клеток первичных культур гиппокампа мыши к действию гипоксии.

Задачи:

- исследовать влияние селективных и неселективных ингибиторов киназ на жизнеспособность клеток первичных культур гиппокампа в норме;
- исследовать роль ключевых киназ в адаптации клеток первичных культур к действию гипоксии и их роль в реализации нейропротекторного действия GDNF;
- дифференцировать типы клеточной смерти при моделировании гипоксии и блокаде ключевых киназ.

Показано, что применение всех исследованных ингибиторов киназ в условиях нормоксии не снижает жизнеспособность клеток первичных культур гиппокампа. Применение ингибитора RET-киназы достоверно снижает долю живых клеток на 7 сутки постгипоксического периода («Интактные» - $92,28 \pm 1,81\%$, «Гипоксия» - $76,24 \pm 5,74\%$, «Гипоксия+ингибитор RET киназы» - $30,03 \pm 1,96\%$).

Выявлено, что GDNF (1нг/мл) защищает клетки от негативного действия гипоксии, жизнеспособность клеток группы «Гипоксия+GDNF» не отличалась от показателей интактной группы. Ингибирование RET киназы полностью блокирует нейропротекторный эффект GDNF (доля мертвых клеток в 2,7 раз выше, чем в группе "Гипоксия"). Применение ингибиторов RAF и AKT1/2 киназ также нивелирует действие GDNF.

Дифференциальная оценка типов клеточной смерти при моделировании гипоксии, что применение GDNF предотвращает гибель клеток как по пути некроза, так и апоптоза. При ингибировании AKT1/2 киназ гибель клеток идет по некротическому пути, а при RET по апоптотическому.

1. Fan Y., et al., J Cell Biochem. 118 (2017).
2. Hu G.Q., et al., Neural Regen Res. 12 (2017).
3. Huang M., et al. Am J Transl Res. 125 (2016).
4. Yang S., et al., Int. J. Mol. Sci. 18 (2017).

Новая сублиния трансгенных мышей с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией

Лысикова Е.А., Тетерина Е.В., Чапров К.Д.

Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия

lysikova_katerina@mail.ru

В патогенезе ряда форм бокового амиотрофического склероза (БАС) и фронтотемпоральной лобарной дегенерация (ФТЛД) важная роль отводится патогенной агрегации ДНК/РНК-связывающего белка FUS [1]. При общем молекулярном механизме FUS-протеинопатии различна анатомическая локализация патологического процесса: БАС характеризуется поражением двигательных нейронов, а ФТЛД - нейронов фронтальной и лобной долей головного мозга, что определяет различную клиническую картину [2]. Оригинальная трансгенная линия мышей tg-FUS[1-359], в геном которых встроена трансгенная кассета, кодирующая укороченную форму белка FUS человека с удаленным сигналом ядерной локализации под Thy1 промотором, воспроизводит фенотип БАС и характеризуется низкой продолжительностью жизни животных [3]. После четырех генераций обратного скрещивания с мышами дикого типа на генетическом фоне CD1 была выделена сублиния животных L-FUS[1-359] с увеличенной продолжительностью жизни и отсутствием фенотипа БАС. Методом ПЦР в реальном времени было выявлено присутствие в геноме L-FUS[1-359] мышей трансгенной кассеты, и показано, что число ее копий такое же, как и в оригинальной линии с фенотипом БАС.

Целью исследования являлась характеристика сублинии животных - L-FUS[1-359]. Методом ОТ-ПЦР было показано существенное снижение уровня экспрессии трансгенной кассеты в спинном мозге L-FUS[1-359] мышей, что могло привести к изменению анатомической локализации патологического процесса. Методом полногеномного секвенирования РНК были установлены различающиеся группы генов между сублиниями с фенотипом БАС и ФТЛД. Исследование когнитивной функции L-FUS[1-359] мышей выявило изменения, в частности, повышение показателей тревожности, как в возрасте 3, так и 7 месяцев.

1. Saxon J.A., et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry. 88, 8 (2017).
2. Nolan M., et al., J. Acta Neuropathol Commun. 4, 1 (2016).
3. Shelkovnikova T.A., et al., J Biol Chem. 288, 35 (2013).

**Изучение свойств амилоидных фибрилл
различных прионогенных белков дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*
в системе *in vitro***

Максютенко Е.М.¹, Землянко О.М.^{1,2}, Бондарев С.А.^{1,2},
Барбитов Ю.А.¹, Матвеев А. Г.¹, Журавлева Г. А.^{1,2}

¹Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

jmrose@yandex.ru

Прионы - это инфекционные агенты белковой природы, вызывающие неизлечимые заболевания человека и животных [1]. Они существуют и у модельного объекта современной биологии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Один из наиболее известных - фактор $[PSI^+]$ - является прионной формой белка Sup35, фактора терминации трансляции [2]. Было показано, что одиночная аминокислотная замена T341D в неприоногенном домене влияет на прионные свойства Sup35 и приводит к гибели клетки в присутствии $[PSI^+]$ [3]. Такой эффект аминокислотных замен вне прионогенного домена Sup35 может быть связан как с несовместимостью измененного белка со структурой мономеров в амилоидной фибрилле, так и появлением или потерей сайта связывания с молекулярными шаперонами, способствующим поддержанию приона.

Для выяснения возможного механизма влияния миссенс-мутаций, затрагивающих С-конец Sup35, на прионизацию, а также для изучения взаимодействия молекулярных шаперонов с фибриллами различных белков, нами была разработана схема выделения, очистки и получения агрегатов разных вариантов Sup35 (Sup35wt, Sup35-228, Sup35-10, Sup35-25), а также Rnq1 и Ure2. Мы показали способность белков Sup35wt, Sup35-228, Rnq1 и Ure2 формировать агрегаты *in vitro*, сравнили скорость их агрегации и изучили морфологию амилоидных фибрилл при помощи просвечивающей электронной микроскопии. Были обнаружены и охарактеризованы единичные фибриллы для белков Ure2 и Sup35, фибриллы Rnq1 средней длины 215 нм и олигомеры для Sup35-228, Sup35-10.

Полученные результаты позволяют подробно изучить особенности структуры амилоидных фибрилл разных белков и их взаимодействия с системой шаперонов, что имеет важное значение для понимания специфики распространения и поддержания различных прионов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-00537 (получение и анализ амилоидных фибрилл Rnq1/Ure2), гранта РНФ 18-14-00050 (получение и анализ амилоидных фибрилл разных вариантов Sup35) и ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

1. Prusiner S. B., J.Science. 216 (1982).
2. Bondarev S. A., et al., J.Prion. 9 (2015).
3. Kabani M., et al., J. Molecular Microbiology. 81 (2011).

Q/N-богатый транскрипционный фактор Sfp1 формирует агрегаты только при особых условиях продукции в клетках дрожжей

Матвеевко А.Г.¹, Дроздова П.Б.^{1,2}, Журавлева Г.А.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия.

² Научно-исследовательский институт биологии, Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

a.matveenko@sbpu.ru, studentmag01@gmail.com

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются удобным модельным объектом для изучения агрегации белков. Это в том числе связано с существованием у них наследуемых амилоидных агрегатов, называемых прионами. Наиболее изученным прионом дрожжей является [PS⁺], который представляет собой агрегированную форму фактора терминации трансляции Sup35 [1]. Ранее нами было показано, что транскрипционный регулятор Sfp1 при сверхпродукции под контролем промотора *CUP1*, активируемого ионами Cu²⁺, приводит к усилению токсичности приона [PS⁺] в клетках дрожжей. При этом Sfp1 сам формировал детергент-устойчивые агрегаты, предположительно амилоидной природы [2], что согласуется с наличием у Sfp1 гипотетического прионогенного домена, обогащённого аспарагином и глутамином [3].

Мы проанализировали влияние на жизнеспособность клеток [PS⁺] различных уровней и условий экспрессии *SFP1*. Выяснилось, что сверхэкспрессия *SFP1* под контролем сильного конститутивного промотора *GPD(TDH3)* приводит к более сильной токсичности, чем в случае промотора *CUP1*. С помощью флуоресцентной микроскопии мы установили, что активная агрегация Sfp1-GFP происходит только при его продукции с использованием

промотора *CUP1*. В случае промотора *GPD* флуоресценция белка менее интенсивна, а агрегаты содержатся не более чем в 5% клеток, а при использовании промотора *GAL1* наблюдается только диффузное свечение химерного белка. Анализ уровней белков с помощью вестерн-блот гибридизации показал, что в случае промотора *GAL1 Sfp1* продуцируется на более низком уровне, чем в случае промотора *CUP1*. Экспрессия различных делеционных вариантов *SFP1* под контролем промотора *GAL1* также не приводит к появлению агрегатов белка, причём делеция N-концевого региона белка приводит к значительному увеличению его продукции. Вероятно, агрегация Sfp1 может происходить только при определённом уровне продукции белка, однако увеличение продукции при делеции N-конца белка не приводит к появлению агрегатов, так как делеция, по-видимому, затрагивает районы белка, необходимые для формирования агрегатов.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00536, а также ресурсным центром «РМиКТ» НП СПбГУ.

1. Liebman S. W., Chernoff Y. O., Prions in yeast. *Genetics*. 191, 4 (2012).
2. Matveenko A. G., et al., *Genes to Cells*. 21, 12 (2016).
3. Alberti S., et al., *Cell*. 137, 1 (2009).

Изучение роли гена *sws (swiss cheese)* в разных типах клеток нервной системы *Drosophila melanogaster* путём подавления его экспрессии

Мелентьев П.А., Рябова Е.В., Комиссаров А.Е.,
Шарапенков Э.Г., Саранцева С.В.

*Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

melentev_pa@pnpi.nrcki.ru

Ген *sws (swiss cheese)* *Drosophila melanogaster* является эволюционно консервативным: его ортологи найдены у широкого круга организмов от бактерий до млекопитающих [1]. У *Drosophila melanogaster* *sws* экспрессируется в нервных и глиальных клетках, он важен для поддержания их жизнедеятельности и функционирования. Дефицит нормального функционирующего SWS ведёт к нейродегенерации, изменению морфологии глиальных клеток и нейромышечных окончаний, нарушению поведения особей. Дисфункция ортолога SWS у человека

приводит к целому спектру нейропатологий [2]. При этом отмечается явно выраженное функциональное сходство соответствующих белков у дрозофилы и млекопитающих (в том числе и человека). Ген *sws* кодирует многофункциональный белок, имеющий активность фосфолипазы Б, который участвует в метаболизме фосфатидилхолина. Белок SWS также способен ингибировать каталитические субъединицы изоформы С3 протеинкиназы А [3]. Несмотря на то, что функции SWS известны, механизмы нейропатологии, вызванной дисфункцией SWS, остаются невыясненными. Не выявлены все молекулярные события, происходящие при нарушении функций SWS, в том числе и те, которые сопровождаются изменением экспрессии определённых генов.

Мы провели комплексное исследование последствий подавления экспрессии *sws* в тех типах клеток нервной системы, где дефицит функционального SWS наиболее критичен, а именно изучили особей *Drosophila melanogaster* с нокаутом *sws* в нейронах, в клетках кортексной и субпериневральной глии. Мы выявили, что посттранскрипционный сайленсинг *sws* ведёт к снижению продолжительности жизни особей, а также приводит к изменению экспрессии нескольких сотен генов, контролирующих различные биологические процессы. Данное исследование позволило нам предложить ряд гипотез для выяснения функций *sws* в разных типах клеток нервной системы в норме и при патологии.

1. Moser M., et al., *Mechanisms of development*. 90, 2 (2000).
2. Kmoch S., et al., *Nature communications*. 6 (2015).
3. Mühlig-Versen M., et al., *Journal of Neuroscience*. 25, 11 (2005).

Биологическая активность нового лектина из двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*

Мизгина Т.О.^{1,2}, Чикаловец И.В.^{1,2}, Молчанова В.И.², Черников О.В.²

¹ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

tanya.tasha@mail.ru

Лектины - это группа белков/гликопротеинов, содержащих один или несколько углеводов-распознающих доменов и обладающих свойством обратимо и избирательно связывать углеводные детерминанты гликоконъюгатов без

изменения их структуры. Лектины принимают участие в самых тонких процессах на клеточном, субклеточном и органном уровнях в живых организмах. Лектины морских беспозвоночных - это удобная экспериментальная модель для изучения эволюционных аспектов становления и функционирования системы неспецифического, или врожденного иммунитета [1].

Для исследования был выбран широко распространенный на Дальнем Востоке моллюск *Glycymeris yessoensis*, гемолимфа которого обладал перекрестной реактивностью с CGL и MTL (лектины из мидий *Crenomytilus grayanus* и *Mytilus trossulus* соответственно). CGL и MTL являются представителями нового класса лектинов и обладают широким спектром биологических активностей [2,3].

Методами аффинной хроматографии и гель-фильтрации был выделен лектин (GYL) с молекулярной массой по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии 18118,5 Да. GYL относится к Gal/GalNAc-специфичным лектинам и проявляет аффинность к гликопротеинам, содержащим цепи муцинового типа. GYL максимально активен в интервале pH 8-10 и полностью инактивируется при нагревании до 45°C, является Ca²⁺-зависимым лектином.

Проведенный сравнительный анализ триптических пептидов GYL, CGL и MTL показал наличие общих пептидов в их структуре, что является одним из подтверждений гомологии этих лектинов. Так же как CGL и MTL, GYL проявляет цитокин-стимулирующую активность, усиливая синтез провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α клетками крови человека. Полученные данные позволяют предположить роль лектина как фактора, стимулирующего продукцию аналогов цитокинов в организме моллюска, и, следовательно, участвующего в его иммунных реакциях.

Дальнейшее, изучение цитокин-стимулирующей активности GYL представляет интерес, так как цитокины являются регуляторами клеточного иммунного ответа и противомикробной защиты [4].

1. Sharon N. L., J. Biol. Chem. 282, 5 (2007).
2. Chikalovets I.V., et al., Fish Shellfish Immunol. 42 (2015).
3. Chikalovets I.V., et al., Fish Shellfish Immunol. 50 (2016).
4. Ottaviana E., et al. Biology of the Cell. 85 (1995)

Анализ структуры потенциал-зависимого канала K_vAP методом электронной микроскопии

Микуртумов В. И. ¹, Карлова М. Г. ¹, Люкманова Е. Н. ²,
Шенкарев З. О. ², Соколова О. С. ¹

¹ Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

mikivasia@gmail.com

Калиевые потенциал-зависимые каналы (K_v) являются тетрамерами, каждый тетрамер состоит из шести трансмембранных α-спиральных сегментов (S1-S6). S5-S6 сегменты формируют поровый домен, а S1-S4 – потенциал-чувствительный домен (VSD). Структура архейного канала K_vAP (организм – *Aeropyrum Pernix*) была впервые получена методом рентгенструктурного анализа [1]. Однако, потенциал-чувствительный и поровый домены канала неверно ориентированы друг относительно друга, причиной чему могут быть не нативные условия в кристалле, далекие от физиологических [2]. В последние пять лет одним из наиболее бурно развивающихся методов в области структурной биологии является криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ). Одним из достоинств этого метода является то, что образец остается в гидратированном состоянии, наиболее приближенном к нативному. Поэтому изучение структуры K_vAP методом электронной микроскопии крайне актуально.

В данной работе была получена трехмерная карта распределения электронной плотности канала K_vAP. Снимки очищенного в детергенте образца в негативном контрасте были сделаны на микроскопе jeol 2100 в МГУ, а замороженного на микроскопе Titan Krios в центре ThermoFisher, Эйндховен, Нидерланды. Постобработка микрофотографий проводилась с помощью программного обеспечения Relion [3].

1. Jiang Y., et al., Nature. 423 (2003).
2. Lee S. Y., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2005).
3. S. H. W. Sheres, J. Mol. Biol. 415 (2012).

**Влияние морфологии трехмерных PLLA-матрикс
на функции мезенхимальных стволовых клеток
и регенеративную активность тканей после имплантации**

А. А. Михуткин¹, А. В. Родина¹, В. П. Сапрыкин², Л. В. Горшкова¹,
Р. А. Камышинский^{1,3}, А. Л. Васильев^{1,3}, Т. Х. Тенчурин¹,
Т. Е. Григорьев¹, С. Н. Чвалун¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

² Московский государственный областной университет, Москва, Россия

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

Были проведены исследования реакции мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга [1] из трансгенных мышей на структуру и морфологию волокнистых матрикс из полилактида (PLLA) [2] и биофункциональности этих матрикс *in vivo*. Для изучения поведения клеток *in vitro* применялись конфокальная лазерная сканирующая микроскопия и растровая электронная микроскопия, включая трехмерную реконструкцию с оценкой морфологических параметров [3]. МСК, культивированные в трехмерном PLLA-матриксе толщиной 600 мкм, образовали колонии и создали условия для дифференциации клеток. Наблюдались эффективные связи между колониями путем межклеточного взаимодействия, которые влияют на трансдукцию сигнала. Проведенное через 7 дней *in vitro* исследование МСК показало более высокую интенсивность клеточной пролиферации и фактор гепатоцитарного роста в матриксе толщиной 600 мкм, чем в матриксе толщиной 100 мкм. Проведено *in vivo* исследование матрикс с и без МСК, имплантированных подкожно на спину мышей-реципиентов для проверки биодegradации и биосовместимости в течение 0-3 недельных интервалов. После первоначальной имплантации засеянные на 600 мкм матрикс МСК способствовали значительно большей неоваскуляризации, усилению клеточной инфильтрации и образованию волосяных фолликулов по сравнению с матриксами толщиной 100 мкм. Degradация матрикса толщиной 600 мкм была менее интенсивной, чем разрушение матрикса толщиной 100 мкм одновременно с постепенной заменой заново синтезированной тканью. Через 3 недели значительное количество донорных клеток сохранялось только внутри матрикса толщиной 600 мкм.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №17-13-01376.

1. Hong H. S., et al., Arch. Pharm. Res. 35, 201 (2012).
2. Lee Y. H., et al., Biomaterials. 26, 3165 (2005).
3. Mikhutkin A. A., et al., BioNanoScience. 8, 511 (2018).

Влияние антибактериального агента, гипохлорита, на структуру молекулы ДНК в растворе

Мокроносова Е. С., Морожкина Е. Б., Осинникова Д. Н.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

kate.mkr11@gmail.com

Молекула ДНК является одной из мишеней для воздействия антибактериальных препаратов. Характер воздействия их очень разнообразен. Для выяснения молекулярного механизма действия подобных препаратов проводятся исследования их взаимодействия с молекулой ДНК на модельных системах *in vitro*.

В настоящей работе методом УФ-спектрофотометрии исследовано взаимодействие гипохлорита натрия, антибактериального агента, с различными полинуклеотидами: тимусной, плазмидной ДНК и полиадениловой-уридилевой кислотой; а также с пуринами: аденозин-5'-тетрафосфорная кислота и гуанозин-2',3,-циклофосфорная кислота

Получены временные и концентрационные зависимости интенсивности полосы поглощения ДНК и нуклеотидов в присутствии гипохлорита натрия. Определены минимальная концентрация гипохлорита, необходимая для разрушения нативной структуры ДНК, а также время полупревращения этой реакции.

Проведено сравнение спектрального поведения ДНК и нуклеотидов в присутствии гипохлорита натрия и сделаны выводы о характере изменения структуры ДНК в процессе ее взаимодействия с гипохлоритом натрия. При взаимодействии с гипохлоритом натрия происходит как разрушение вторичной структуры ДНК, так и химическая модификация азотистых оснований [1, 2, 3]. Наличие вторичной структуры замедляет химическую реакцию гипохлорита натрия с азотистыми основаниями ДНК.

1. C. L. Hawkins and M. J. Davies, Chem. Res. Toxicol. 15 (2002).
2. M. Whiteman, Chem. Res. Toxicol. 10 (1997).
3. C. L. Hawkins and M. J. Davies, Chem. Res. Toxicol. 14 (2001).

**Белковый комплекс Integrator
участвует в процессинге теломеразной РНК человека**

Василькова Д.П., Мошарева М.А., Рубцова М.П.

*Химический факультет, кафедра ХПС, лаборатория химии нуклеопротеидов,
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

moshareva.m@gmail.com

Теломераза – рибонуклеопротеидный комплекс, состоящий из белковой части и теломеразной РНК. Назначение теломеразы – удлинение концевых участков хромосомы за счёт добавления теломерных повторов во избежание утраты кодирующих участков при недорепликации. Зрелая теломеразная РНК содержит 451 нуклеотид, среди которых содержится матрица для считывания обратной транскриптазой теломерного повтора.

Транскрипция теломеразной РНК осуществляется РНК-полимеразой II, образуется первичный транскрипт, который далее разрезается с участием экзосомы с образованием зрелой теломеразной РНК [1].

Integrator – белковый комплекс, состоящий как минимум из 14-ти различных субъединиц [2]. Ранее было показано, что он участвует в терминации транскрипции генов малых ядерных РНК, а именно осуществляет узнавание определённой последовательности в 3` области мРНК, после чего гетеродимер IntS9/IntS11 осуществляет разрезание первичного транскрипта [3].

Чтобы изучить влияние комплекса Integrator на процессинг теломеразной РНК, мы осуществляли нокдаун генов субъединиц IntS1, IntS9 или IntS11 в клеточной линии HEK293T. Экспрессию генов подавляли методом РНК-интерференции, обрабатывая клетки siRNA, соответствующими по последовательности целевым генам. Методом ПЦР в реальном времени с предшествующей обратной транскрипцией мы показали, что количество 3` удлинённой формы теломеразной РНК при нокдауне генов IntS1, IntS9 или IntS11 увеличивается по сравнению с контрольной линией в 2-6 раз.

Полученные данные свидетельствуют, что Integrator участвует в процессинге не только малых ядерных, но также и теломеразной РНК человека.

1. Tseng, C.-K., Wang, H.-F., et al., Cell Rep., 13, 2232–2243 (2015).
2. Rienzo M., Casamassimi A., Biochim. Biophys. Acta, 1859, 1269-1280 (2016).
3. Chen J., Wagner E.J., Biochem. Soc. Trans., 38, 1082–1087 (2010).

Взаимодействие статинов с модельными клеточными мембранами по данным ЯМР спектроскопии

Мусабилова Г.С.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

guzel.musabirova@bk.ru

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире: ни по какой другой причине ежегодно не умирает столько людей, сколько от ССЗ. И в качестве профилактики ССЗ заболеваний на сегодняшний день широко используются лекарственные препараты группы статинов. Статины являются гиполипидемическими препаратами, которые ингибируют фермент ГМГ-КоА редуктазу, способствующего образованию холестерина. Также, у всех статинов выявлены благоприятные терапевтические эффекты, не связанные с их гиполипидемическим действием — плеiotропные свойства. Не смотря на то, что для статинов характерна схожая химическая структура и общая фармакологическая мишень, необходимая для биосинтеза холестерина, их безопасность, эффективность и в особенности плеiotропные свойства существенно различаются [1]. Существует гипотеза, что фармакологические свойства статинов зависят от их расположения в клеточной мембране [2]. Поэтому целью стало изучить расположение статинов в молекулярных комплексах с модельными клеточными мембранами.

Исследования проводились с помощью спектроскопии ЯМР высокого разрешения методом ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Данный метод позволяет изучать межмолекулярные взаимодействия, получать информацию о структуре молекулярного комплекса и о некоторых фрагментах молекулы, ответственной за связывание.

Результаты экспериментов показали, что все изученные статины формируют молекулярные комплексы с модельными клеточными мембранами на основе мицелл додецилфосфохолина. Также было определено расположение данных статинов по отношению к мицелле ДФХ [3,4]. Даже незначительные различия в структуре статинов приводят к различному взаимодействию с модельной мембраной, и данные различия могут объяснить фармакологические свойства статинов.

1. P.D. Thompson, G. Panza, J. Am. College of Cardiology. 67 (2016).
2. R.P. Mason, et al., Am. J. of Cardiology. 96 (2005).
3. L.F. Galiullina, et al., J. Mol. Structure. 1167 (2018).
4. L.F. Galiullina, et al., J. BBA Biomembranes. 1859 (2017).

Структурные исследования связывающего рибосому фактора А (RbfA) патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса высокого разрешения

Нуруллина Л.И.¹, Бикмуллин А.Г.¹, Валидов Ш.З.¹, Гараева Н.С.¹,
Усачев К.С.¹, Юсупов М.М.^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch, France

lilia.nurullina@mail.ru

На протяжении всего жизненного цикла микроорганизмы реагируют на стресс, вызванный изменениями условий внешней среды. RbfA (связывающий рибосому фактор А) - это адаптивный белок холодового шока, обеспечивающий клеточный рост бактерий при низких температурах [1]. RbfA имеет сродство к свободным 30S рибосомным субъединицам, но не к 70S рибосомам или полисомам. Может взаимодействовать с 5'-концевой спиралью (спираль I) 16S рРНК, участвующей в декодировании мРНК и связывании тРНК. RbfA, по-видимому, важен для эффективной обработки 16S рРНК и для созревания (сборки) 30S рибосомных субъединиц. [2]

Белки семейства RbfA представлены в протеомах большинства археобактерий и организмов эубактерий, а также в митохондриях и хлоропластах высших организмов [3]. Они могут в разной степени различаться по аминокислотному составу, однако имеют единый механизм действия: белок связывается с малой субъединицей в области головки и шеи и изменяет центр декодирования, способствуя созреванию субъединицы, благодаря чему она сможет связаться с мРНК и начать синтез белка.

Объектом наших исследований стал связывающий рибосому фактор А патогенного микроорганизма *S. aureus*. В данной работе нами были найдены и оптимизированы подходящие условия экспрессии на минимальной среде M9, меченного по изотопам ¹³C, ¹⁵N белка RbfA для исследования методом спектроскопии ЯМР. Выполнены многомерные эксперименты по спектроскопии ЯМР и проведено отнесение сигналов ядер ¹H, ¹³C и ¹⁵N основной и боковых цепей белка. На основе экспериментальных данных о химических сдвигах были рассчитаны значения двугранных углов основной цепи. На основе индексов химического сдвига определено положение элементов со вторичной структурой, показано, что топология белка RbfA в растворе представлена в виде: α1-β1-β2-α2-α3-β3-α4 структуры. Полученные на основе ЯМР эксперимента данные позволили нам рассчитать в программе ARIA трехмерную структуру белка RbfA.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00375.

1. Koichi I. et al., J Mol. Microbiol. Biotechnol. 11, 41 (2006).
2. Parta P. et al., Molecular Cell. 28, 434 (2007).
3. Huang Y.J. et al., J. Mol. Biol. 327, 521 (2003).

Сравнение трех кинетических методов определения рецепторной специфичности вирусов гриппа

Онхонова Г.С. ^{1,2.}, Рыжиков А.Б. ¹

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

onhonova_gs@vector.nsc.ru

Грипп является причиной ежегодных эпидемий и даже пандемий и представляет серьезную проблему для здравоохранения и экономики [iv]. Способность вируса гриппа заражать зависит от специфичности связывания гемагглютинаина (НА) – основного белка на поверхности вирионов. На поверхности клеток-мишеней, расположенных на эпителии дыхательных путей человека и ЖКТ птиц, присутствуют сиалированные гликаны, которые являются рецепторами для вирусного НА. Существует 2 типа рецепторов ($\alpha 2-3$ и $\alpha 2-6$) и разные штаммы вируса гриппа отличаются сродством к ним [v].

На сегодняшний день не существует общепризнанного метода определения рецепторной специфичности. Поэтому целью исследования было провести сравнение трех наиболее используемых методов: иммуноферментного анализа (ИФА), метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и бислойной интерферометрии (БИ). В качестве исследуемых объектов были выбраны штамм вируса гриппа птиц A/chicken/Primorsky Krai/03/2018 (H9N2) и сплит-вакцина Ваксигрип (2016-2017). В качестве аналогов рецепторов был выбран белок фетуин, содержащий оба типа рецепторов [vi].

Сравнение трех методов показало, что в случае использования метода ППР для изучения лиганд-рецепторного взаимодействия вирусов гриппа необходимо проводить дополнительную подготовку образцов, а именно, выделять и очищать молекулы гемагглютинаина, несущие рецепторсвязывающий участок. Использование цельных вирионов возможно только при изучении кинетики процесса методами ИФА и БИ. Чувствительность методов ППР и БИ сопоставима, в то время как ИФА продемонстрировал меньшие показатели. Полученные данные позволяют делать вывод о наибольшей предпочтительности применения метода бислойной интерферометрии для измерения рецепторной специфичности штаммов вируса гриппа.

1. Molinari N. A., et al., Vaccine. 25 (2007).
2. Baenziger J. U., Fiete D., JBC. 254, 3 (1979).
3. Ильичева Т. Н., и др., Вирусы гриппа: методическое пособие. Часть I. (Новосибирский государственный университет, 2014.)

Сигма 1 рецептор и депо-управляемый вход кальция в нейронах стриатума

Красковская Н.А., Осбанова С.Р., Безпрозванный И.Б., Корбан С.А.

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

new_space@rambler.ru

Болезнь Хантингтона (БХ) – это генетическое нейродегенеративное заболевание. При БХ преимущественно поражаются клетки стриатума - ГАМКергические средние шипиковые нейроны (СШН) [1]. Исследования последних лет указывают на нарушения в их кальциевом гомеостазе и что чрезмерное повышение кальция приводит к их гибели [2]. Было продемонстрировано, что мутантный хантингтин (mHtt) способен связываться с рецепторами 1,4,5-трифосфата (IP3R) на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР) и вызывать неспецифичный выход Ca^{2+} в цитоплазму, активируя при этом нейрональный депо-управляемый вход кальция (нДУВК) [3]. Данный биохимический путь направлен на восполнение запасов Ca^{2+} в ЭР и его чрезмерная активация наблюдается в случае БХ. Сигма 1 рецептор (С1Р) является трансмембранным белком ЭР, регулирующим функцию IP3R. Предполагается, что данный рецептор действует как кальциевый сенсор и он может способствовать нормализации кальциевого гомеостаза в СШН.

Исследование интенсивности нДУВКа в СШН, выделенных из мышей с моделью БХ, выявило значительную активацию данного биохимического пути по сравнению с мышами дикого типа. Аппликация селективного агониста С1Р - соединения PRE-084 в ко-культурах нейронов дикого типа за 16 часов до проведения измерений не влияла на интенсивность нДУВКа. В дендритных шипиках СШН в кортико-стриатной культуре, выделенных из мышей с моделью БХ, наблюдалась усиленная активация нДУВКа. Аппликация соединения PRE-084 способствовала снижению активности нДУВКа до уровня нДУВКа, выделенного из диких мышей. Кроме того, анализ четвертичной структуры показал, что С1Р подвержен конформационным изменениям при активации нДУВКа, в частности, С1Р переходит из олигомерного состояния в мономерное.

Выводы. Добавление селективного агониста С1Р препятствует излишней активации нДУВКа и способствует нормализации кальциевого гомеостаза в СШН. На основании полученных данных можно предположить, что сигма 1 рецептор может являться новой мишенью для разработки лекарств для терапии БХ.

1. Walker F.O., Huntington's disease. Lancet. 369, 9557 (2007).
2. Wu J., et al., The Journal of Neuroscience. 36, 1 (2016).
3. Tang T. S., et al., Neuron. 39, 2 (2003).

Тканеспецифичное метилирование ДНК регуляторных областей генов *ABCA1* и *ABCG1* в эпикардальной жировой ткани

Пантелеева А. А.^{1,2}, Марков А.В.³, Назаренко М.С.³, Побожева И.А.^{1,2},
Разгильдина Н.А.^{1,2}, Беляева О.Д.², Полякова Е.А.², Беркович О.А.²,
Баранова Е.И., Пчелина С. Н.^{1,2}, Мирошникова В.В.¹

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской
академии наук, Томск, Россия

alekspanteleeva@gmail.com

Патологическое накопление жировой ткани (ЖТ) ассоциировано с развитием сердечно-сосудистых заболеваний и метаболических нарушений. Локализация ЖТ может играть важную роль в развитии определенного типа заболеваний. Нарушение функции эпикардальной ЖТ (ЭКЖТ) вследствие ее анатомической близости к миокарду и коронарным артериям, может влиять на развитие ИБС и формирование атеросклеротического поражения коронарных сосудов и развитие ИБС[1].

АТФ-связывающие белки-транспортеры *ABCA1* и *ABCG1* играют ключевую роль в регуляции обмена холестерина в адипоцитах [2], поэтому можно предположить, что изменение экспрессии этих генов может приводить к накоплению холестерина в клетках ЖТ. Влияние на экспрессию генов может оказывать метилирование ДНК. Ранее была показана ассоциация ожирения с метилированием регуляторных областей *ABCA1* и *ABCG1* в клетках крови [3], однако метилирование ДНК в различных типах ЖТ плохо изучено.

Цель нашего исследования – изучение ассоциации тканеспецифичного паттерна метилирования регуляторных областей генов *ABCG1* и *ABCA1* в ЭКЖТ и подкожной жировой ткани (ПЖТ) у пациентов с ИБС и в контрольной группе.

Исследование было выполнено на 34 образцах ЭКЖТ и 34 образцах ПЖТ, полученных в ходе операций по аортокоронарному шунтированию и замене клапана (ИБС: N=26, контроль: N=8). Уровень метилирования регуляторных областей генов-транспортеров *ABCA1* и *ABCG1* определяли методом пиросеквенирования модифицированной бисульфитом ДНК.

Было показано, что уровень метилирования регуляторной области гена *ABCA1* был выше в ЭКЖТ ($p=0.00006$) в обеих группах по сравнению с ПЖТ. В ЭКЖТ уровень метилирования был достоверно повышен у лиц с ИБС ($p=0.001$) по сравнению с контрольной группой. Аналогичные результаты были получены

для гена *ABCG1* – более высокий уровень метилирования наблюдался в ЭКЖТ по сравнению с ПЖТ ($p=0,00007$) в обеих группах и повышенный уровень метилирования в ЭКЖТ у лиц с ИБС по сравнению с контрольной группой ($p=0,004$).

Исследование поддержано грантом РФФИ №18-315-00382.

1. Nagy E., et al., J. Arch Med Sci. 13, 4 (2017).
2. Frisdal E., et al., J. Diabetes. 64, 3 (2015).
3. Peng P., et al., J. PLoS ONE. 9, 8 (2014).

Активность кальпаинов при экспериментальном повышении уровня дофамина

Пестерева Н.С.¹, Маршак А.З.²

¹ *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

pesterevans@yandex.ru

Одним из достижений современной медицины является увеличение продолжительности жизни. Однако вместе с этим параллельно растет и количество пациентов с диагностированными нейродегенеративными заболеваниями, в частности, болезнью Паркинсона. Одним из признаков нейродегенеративного процесса является гиперактивация кальпаинов клеток ЦНС, например, кальпаина-1 и кальпаина-2 [1]. Как и другие члены этого семейства, эти протеазы являются внутриклеточными и кальцийзависимыми, регулируемыми различные физиологические процессы, среди которых апоптоз [2]. Золотым стандартом лечения болезни Паркинсона является L-dopa-терапия, которая ведет к повышению уровня дофамина в клетках ЦНС [3]. Однако влияние дофамина на активность кальпаинов ранее не изучалось.

В связи с этим целью нашего исследования было выявление активности кальпаинов в условиях экспериментального увеличения уровня дофамина. Работа была выполнена на трех уровнях: *in vivo*, *in situ*, *in vitro*. Исследование *in situ* проводилось на модели выделенных нервных окончаний - синапсом. Методом казеиновой зимографии в растворе с использованием FITC-казеина было показано, что инкубация синапсом с 5 мМ дофамина в течение 90 минут приводит к секреции кальпаинов во внесинапсомальную среду и их активации.

Способность дофамина напрямую активировать кальпаин была показана методом казеиновой зимографии в геле. Инкубация в активационном буфере, содержащем 0,5 мМ дофамина вместо классического активатора - хлорида кальция, привела к активации кальпаина-2. Эксперимент *in vivo* проводился на самцах крыс линии Wistar. Подопытной группе (n=4) перорально вводили препарат L-dopa (100 мг/кг), контрольной (n=4) - таким же способом вводили физиологический раствор. Через 30 минут была произведена декапитация. С помощью ВЭЖХ было установлено повышение уровня дофамина в клетках черной субстанции в $4,6 \pm 0,7$ раза. Казеиновая зимография в геле же показала, что введение L-dopa животным приводит к подавлению активности кальпаина-1, но не кальпаина-2.

1. Karpenko M.N., Tikhomirova M.S., J. NEAB. 45, 8 (2015).
2. Cheng SY, et al., J. Neural Regen Res. 13, 3 (2018).
3. Chagniel L., et al., J. Neurobiol Dis. 45, 1 (2012).

Особенности взаимодействия диритромицина с бактериальной рибосомой

*Е.Б. Пичкур^{1,2,5}, П.С. Касацкий², А.Г. Мясников^{2,8}, Ю.С. Поликанов⁷,
И.А. Остерман^{4,6}, Е.В. Полесскова^{2,3}, А.Л. Коневега^{1,2,3}*

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия*

² *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

³ *СПбПУ, Санкт-Петербург, Россия*

⁴ *НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.
В. Ломоносова, Москва, Россия*

⁵ *ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва, Россия*

⁶ *Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Moscow region 143025, Russia*

⁷ *Department of Biological Sciences, University of Illinois at Chicago, Chicago,
Illinois 60607, USA*

⁸ *Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco,
CA 94143, USA.*

eugene.pichkur@gmail.com

Антибиотик диритромицин (ДИР) относится к классу полусинтетических макролидов, первым представителем которого является эритромицин.

Диритромицин по ряду свойств превосходит своего предшественника. Задача данного исследования состояла в том, чтобы выяснить структурную основу взаимодействия диритромицина с бактериальным функциональным рибосомным комплексом из *E. coli*. Для получения структуры рибосомных комплексов с диритромицином использовался метод криогенной просвечивающей электронной микроскопии (крио-ЭМ). Разрешение полученной структуры по критерию FSC=0.143 составило в среднем 2.24Å.

Предварительный анализ полученной структуры показывает, что положение лактонного кольца ДИР практически совпадает с положением кольца эритромицина, визуализированного при помощи рентгеноструктурного анализа (PDB 4v7u [1]). В обоих случаях есть только одна постоянная водородная связь между антибиотиком и 23S рРНК в положении A2058. Дополнительные контакты или отсутствуют, или представляются очень слабыми, так как расстояние между потенциальными взаимодействующими агентами превышает 3Å. По сравнению с кристаллической структурой A2062 принимает иную конформацию и повернут относительно ДИР. Экспериментальной плотности, соответствующей метоксиэтоксиметильной группе, которая является основной отличительной особенностью ДИР от эритромицина, обнаружено не было. Полученный результат указывает на конформационную лабильность этого радикала, который направлен в просвет туннеля и не образует дополнительных контактов с его стенками. Возможно, модификация лактонного кольца, которая приводит к его стабилизации вследствие появления устойчивого и жесткого шестичленного оксазинового кольца, приводит также к снижению возможных конформационных состояний антибиотика и стабилизации его связывания в пептидном канале, и может характеризоваться повышенной константой связывания ДИР по сравнению с эритромицином.

Эксперименты по изучению структуры рибосом методом крио-ЭМ поддержаны грантом РФФИ 17-14-01416.

1. J. A. Dunkle, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences. 107, 40 (2010).

Социальная передача страха в задаче условно-рефлекторного замирания у мышей

Плюснин В. В. ^{1,2}, Торопова К. А. ^{1,3,4}, Ивашкина О. И. ^{1,3,4}, Анохин К. В. ^{1,3,4}

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия*

² *Московский физико-технический институт, Москва, Россия*

³ *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

⁴ *Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина, Москва, Россия*

viktor.plusnin@phystech.edu

Социальная передача информации об опасности играет важную адаптивную роль для многих видов социальных животных [1]. Исследования последних лет демонстрируют, что грызуны, в частности мыши, также способны как к социальной передаче информации об опасности, так и к социальному аверсивному обучению, называемому социальной передачей страха [2].

На сегодняшний день существует две парадигмы обучения в модели социальной передачи страха у грызунов. В первой из них животное-наблюдатель обучается, непосредственно наблюдая за аверсивным поведением животного-демонстратора [3]. Во второй парадигме социальной передачи страха в качестве безусловного сигнала для обучения наблюдателя используют поведение животного-демонстратора при извлечении ранее сформированной памяти об условном сигнале [4].

Нами была отработана модель социальной передачи страха у лабораторных мышей, а также проведен анализ свойств такого обучения и формирующейся на его основе социальной памяти в сравнении с памятью, формирующейся в результате индивидуального опыта мыши при обучении условно-рефлекторному замиранию. Было показано, что мыши успешно обучаются социальной передаче страха, наблюдая за поведением партнера-демонстратора. Социальная память, формирующаяся в результате такого обучения, является долговременной и сохраняется в течение более 24 часов. Социальное обучение, как и индивидуальное, приводит к формированию ассоциативной памяти, специфической относительно используемого условного стимула и не генерализующейся на другие похожие условные стимулы. Тем не менее, социальная память, является более слабой, чем при индивидуальном обучении, и не все животные способны к наблюдательному обучению. При этом, способность к социальному обучению у мышей-наблюдателей не зависит от социального статуса.

Таким образом, полученные результаты в дальнейшем могут быть использованы для исследования нейрональных механизмов, обеспечивающих социальное обучение и отличающих его от «обычного» индивидуального обучения.

1. Olsson A., et al., Soc. Cogn. Affect. Neuroscience. 2, 1 (2007).
2. Kim E. J., et al., PLoS ONE. 5, 12 (2010).
3. Jeon D., et al., Nature Neuroscience. 13, 4 (2010).
4. Bruchey A. K., et al., Behavioural Brain Research. 214, 1 (2010).

Адипонектин подкожной жировой ткани как риск развития ишемической болезни сердца

Побожева И.А.^{1,2}, Пантелеева А.А.^{1,2}, Разгильдина Н.Д.¹,
Драчева К.В.¹, Пчелина С.Н.^{1,2}, Мирошникова В.В.¹

¹ *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

² *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

Адипонектин является одним из важнейших адипокинов, секретируемых жировой тканью, регулирует энергетический гомеостаз, участвует в метаболизме жирных кислот и глюкозы, обладает противовоспалительным и антиатерогенным эффектами. Адипонектин циркулирует в плазме крови в виде тримера, гексамера, мультимера, но ключевую роль в развитии ожирения и сопутствующих патологий может играть именно высокомолекулярный (мультимерный) адипонектин. [1]

Низкий уровень высокомолекулярного адипонектина в плазме крови ассоциирован с инсулинорезистентностью и высоким риском развития сахарного диабета 2. [2]

Цель нашей работы – исследование экспрессии гена адипонектина (ADIPOQ) и содержания высокомолекулярной формы адипонектина в эпикардальной и подкожной жировой ткани (ЭКЖТ, ПЖТ) при ИБС.

Материалы и методы. Были собраны парные образцы ЭКЖТ и ПЖТ, сыворотки крови 74 пациентов с ИБС, перенесших операцию коронарного шунтирования и 16 пациентов с перенесенным ранее инфекционным эндокардитом, при операции по замене клапанов (контроль). Уровень мРНК

оценивали с помощью ПЦР в реальном времени с флуоресцентными зондами TaqMan. Для оценки уровня высокомолекулярного адипонектина в ЭКЖТ и ПЖТ использовался метод вестерн-блот. Концентрацию соответствующих белков в сыворотке крови измеряли методом иммуноферментного анализа. Статистическая обработка материала выполнялась с использованием программы SPSS 23.0.

Результаты. Уровень мРНК *ADIPOQ* в ПЖТ был ниже у лиц с ИБС по сравнению с контролем ($p=0,020$). Содержание высокомолекулярного адипонектина в ПЖТ также было снижено у пациентов с ИБС по сравнению с контрольной группой ($p=0,003$). Концентрация адипонектина в сыворотке крови была снижена у пациентов с ИБС по сравнению с контрольной группой ($p<0,001$). Оцениваемые параметры в ЭКЖТ между группами не отличались.

Выводы. Развитие ИБС ассоциировано со снижением экспрессии гена *ADIPOQ* и уровня высокомолекулярного адипонектина в ПЖТ, а также снижением адипонектина в сыворотке крови.

Поддержано грантом РФФИ мол_а 18-315-00382

1. Rutkowski J.M., Scherer P.E., Methods in Enzymology. 537 (2014).
2. Pischon T., et al., Atherosclerosis. 219 (2011).

Протеомный анализ клеток головного мозга мыши при локальном облучении протонами высоких энергий (1Гэв)

*Литвинчук А.В.^{1,3}, Зорина Е.С.², Копылов А.Т.², Попова В.О.¹,
Легина О.К.¹, Ронжина Н.Л.¹, Верлов Н.А.¹, Карлин Д.Л.¹,
Лысенко В.В.¹, Ежов В.Ф.¹, Нарыжный С.Н.^{1, 2}*

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича,
Москва, Россия

³ ICRC, St.Anne`s University Hospital, Pekarska 53,656 91, Brno, Czech Republic

vropova1245@gmail.com

Интерес к изучению воздействия протонов высоких энергий на центральную нервную систему связан с протонной терапией и с исследованиями космоса, так как космическое излучение на 80 процентов состоит из протонов

высоких энергий [1]. Исследование воздействия таких частиц очень сильно зависит от материальной базы и не имеет такой большой истории как исследование радиационных эффектов гамма-излучения. Имеющиеся литературные данные о сравнительном исследовании влияния фотонного (гамма-излучение) облучения и облучения протонами на нервные клетки указывают на более высокое поражающее действие протонов и на то, что, в частности, для лечения глиобластом, применение протонной радиации предпочтительнее, чем облучение гамма-лучами [2]. Однако до сих пор до конца не понятны механизмы, происходящие при воздействии протонов, в частности, не определена биологическая эффективность протонного пучка высоких энергий для установления допустимых дозовых нагрузок на центральную нервную систему.

В наших исследованиях были проведены эксперименты для изучения клеточного ответа нервной системы при однократном локальном облучении головного мозга (большие полушария) мыши пучком при дозе 3Гр на отдаленном сроке (30 суток). В отдаленные сроки возможны как необратимый патогенез, так и адаптивные изменения. Для прояснения механизмов воздействия протонов и ответа организма на это воздействие был выполнен протеомный анализ нервной ткани [3-5]. В результате, используя электрофоретические методы разделения белков, а также масс-спектрометрические и иммунные методы детектирования, был получен протеомный профиль клеток ткани головного мозга до и после облучения. Полученные данные указывают на серьезные перестройки цитоскелета нервных клеток и возможные восстановительные процессы с участием многих белков, включая регуляторные белки семейства 14-3-3, при облучении протонами [6,7]. Эти изменения сопровождаются появлением новых протеоформ, как у этих белков, так и у белка кофилин-1, а также и у некоторых других.

Масс-спектрометрические работы были проведены на оборудовании ЦКП ИБМХ.

1. Abrosimov N.K., et al., Journal of Physics: Conference Series. 41, 1 (2006).
2. Mitteer R.A.Jr., et al., Sci. Rep. 5, (2015).
3. Naryzhny S., et al., MethodsX. 4 (2017).
4. Naryzhny S., J. Proteomics. 18 (2018).
5. С.Н. Нарыжный и др., Биомедицинская химия. 60, 3 (2014).
6. A. Gohla, G.M. Bokoch., Curr. Biol. 12 (2002).
7. C.W. Lee, et al., Nature Neurosci. 12 (2009).

Изучение агрегации прионного белка Sup35 методом динамического рассеяния света и атомно-силовой микроскопии

Попова М.А., Соколов П.А., Белоусов М.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

porovamaaria@gmail.com

Мотивация изучения прионных белков в основном связана с их способностью вызывать тяжелые нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Куру, Альцгеймера, Паркинсона, Крейтцфельда-Якоба и другие. Для этих болезней характерна общая черта патогенеза — формирование амилоидов, приводящее к гибели нейронов [1]. Амилоиды представляют собой фибриллярные отложения, образованные функциональными белками в результате их неправильной укладки. Белок дрожжей Sup35 выступает в качестве удобной модельной системы для изучения механизмов образования и распространения амилоидов, понимание которых может быть крайне ценно для исследования амилоидных, в частности прионных, заболеваний человека и млекопитающих [2]. Существует ряд моделей для описания амилоидогенеза, однако детальный механизм перехода белков в амилоидную форму на данный момент остается неизвестным [3].

Динамическое рассеяние света — один из методов, применяемых для изучения агрегации белка, с помощью которого можно оценить распределение амилоидов по длинам в различные моменты времени с начала агрегации. При этом полученные распределения с высокой точностью совпадают с аналогичными данными, полученными при помощи сканирующей электронной микроскопии.

С целью получения данных зависимостей нами был разработан ряд экспериментальных методик и способов обработки данных. После этого было изучено несколько различных образцов прионного белка Sup35: Sup35NMr, два мутантных вида белка M0(QQ33 — KK34) и M5(QQ89-90KK), в которых произведены двойные замены аминокислот в определенных положениях [4], и Sup35-74 — короткий участок белка, содержащий только 74 первых аминокислоты. Было проведено сравнение кинетики агрегации этих образцов и установлено, что для белков с изучаемыми заменами агрегация была затруднена, в то время как для укороченного участка белка агрегация происходила гораздо быстрее.

1. Susan W. Liebman and Yury O. Chernoff. Genetics vol. 191 no. 4 1041-1072; (2012)
2. Balbirnie M., Grothe R., Eisenberg D. S., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 5 (2001).
3. S. A. Bondarev, Prion. 9, 3 (2015).
4. Бондарев С. А. Влияние мутаций в прионизирующем домене белка Sup35 на свойства приона [PSI+] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. (2014)

Исследование белка Dps *Escherichia coli* с использованием криоэлектронной микроскопии

Преображенская Е.В.¹, Пичкур Е.Б.², Праслова Н.В.³, Усольцева Д.С.³,
Беликов Е.А.³, Шешукова А.А.⁴, Чувенкова О.А.³, Пресняков М.Ю.²,
Озолинъ О.Н.¹, Антипов С.С.^{1,3,4}, Турищев С.Ю.³

¹ Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

³ Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

⁴ Балтийский федеральный университет им И. Канта, Калининград, Россия

elena.vl.preobrazhenskaya@gmail.com

Криоэлектронная микроскопия использовалась для получения информации о структуре и морфологии гибридных биоорганических частиц белка Dps в состоянии, близком нативному. Этот белок состоит из 12 идентичных субъединиц, формирующих внутреннюю полость размером ~ 5 нм, способной накапливать до 450 ионов железа [1]. Помимо этого, молекулы Dps способны к самоагрегации за счет формирования белок-белковых контактов, однако механизм их формирования до конца не понятен. Функционально активный белок выделяли из клеток *E.coli* BL21* (DE3), трансформированных вектором pGEM-*dps* без дополнительного насыщения железом [2]. Полученный белок растворяли в буфере (10мМ NaCl, 50мМ Трис-HCl (pH 7.5), 0.1мМ ЭДТА) и наносили на углеродные сетки. Пробы готовили с помощью Vitrobot Mark IV (FEI) при влажности 100% и температуре 4°C, а изображения получали с использованием криоэлектронного микроскопа Titan Krios (FEI) (НИЦ «Курчатовский институт») с ускоряющим напряжением 300kV при увеличении 75000х.

Полученные данные свидетельствуют о формировании молекулами белка двумерного мономолекулярного упорядоченного слоя с гексагональным типом симметрии в расположении молекул внутри ячеек углеродной сетки. Молекулы, формируя упорядоченный массив, образуют длинные ряды регулярно расположенных "структурных единиц", которые можно проследить во всех направлениях вплоть до пределов, ограниченных элементом углеродной сетки. При этом обнаружено лишь небольшое количество дефектов упорядоченной двумерной структуры. Зарегистрированные размеры отдельных молекул белка составляют около 9 нм, что хорошо согласуется с ранее полученными результатами [3,4]. Таким образом, экспериментальные данные указывают на формирование плотной упаковки олигомеров Dps с гексагональным типом симметрии в условиях крио-эксперимента и открывают возможность для более

глубокого изучения особенностей формирования белок-белковых контактов нативного Dps и создания упорядоченных структур на его основе, что необходимо при решении прикладных задач.

1. Almiron M., et al., Genes & development. 6 (1992).
2. Purtov Y., et al., J. Bioinform. Comput.Biol. 12, 2 (2014).
3. Turishchev S.Yu., et al., Biophysics. 61, 5 (2016).
4. Antipov S., et al., Molecules. 22, 11 (2017).

Потенциальное противовоспалительное действие азолазинов при острых респираторных инфекциях

Протасов А.В. ^{1,2}, Барановская И.Л. ^{1,2}, Миргородская О.А. ¹

¹ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

lexprotya@gmail.com

Острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ) — группа клинически и морфологически подобных острых воспалительных заболеваний органов дыхания, возбудителями которых являются пневмотропные вирусы. ОРВИ — самая распространённая в мире группа заболеваний, объединяющая грипп, респираторно-синцитиальную инфекцию, риновирусную и аденовирусную инфекции и другие катаральные воспаления верхних дыхательных путей. Одной из особенностей развития ОРВИ является вероятность развития осложнений, которые могут привести к летальному исходу [1].

Одним из регуляторов воспаления в дыхательных путях является фосфодиэстераза 4 типа (PDE4). Она относится к семейству 3',5'-цАМФ специфичных фосфодиэстераз. Ингибирование PDE4 приводит к снижению уровня воспаления в тканях верхних дыхательных путей [2, 3].

Азолазины являются синтетическими аналогами пуринов, и рассматриваются как потенциальные противовирусные препараты. Нами было сделано предположение о возможном взаимодействии азолазинов с PDE4. Таким образом целью данной работы являлась проверка возможности

азолозинов ингибировать PDE4, тем самым проявляя противовоспалительный эффект при ОРВИ.

В ходе проведенных исследований было показано, что при ОРВИ вызванных вирусом гриппа у мышей повышается уровень экспрессии PDE4 в тканях легких. Также был показан ингибирующий эффект ряда азолозинов в отношении PDE.

1. Нисевич Н. И., Учайкин В. Ф. Инфекционные болезни у детей. — 1-е изд.. — М.: Медицина, 1990. — С. 71—113. — 624 с.
2. S. Jin, S. Ding, S. Lin., *Chang Gung Med J.* 35 (2012).
3. F. Konrad, et al., *PLoS ONE.* 10, 4 (2015).

Конструирование и свойства гриппозного вектора, экспрессирующего химерный белок NS1 с люциферазной активностью

Пулькина А. А.^{1,2}, Сергеева М. В.¹, Романовская-Романько Е.А.¹,
Стукова М.А.¹, Егоров А.Ю.¹

¹ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

Наиболее опасной и распространенной респираторной инфекцией у человека является грипп [1]. По данным Всемирной Организации Здравоохранения только тяжелыми формами гриппа в мире ежегодно заболевают 3–5 млн. человек [2]. Эпидемии, наносящие большой экономический ущерб экономике страны, свидетельствуют о необходимости создания быстрых методов оценки эффективности противовирусных химиопрепаратов. При создании тест-систем для оценки противовирусной активности химиотерапевтических средств и моноклональных антител возможно использование репортерных гриппозных векторов. Использование биолюминесцентных репортерных векторов позволяет детектировать *in vivo* распространение гриппозной инфекции у одного и того же животного в режиме реального времени.

Нами сконструирован гриппозный вектор с модифицированным геном NS, с которого в открытой рамке считывания NS1 синтезируется химерный белок, обладающий люциферазой активностью. В качестве метки использована малая люциферазная субъединица NanoLuc весом 19кДа, выделенная из

глубоководных креветок *Oplophorus gracilirostris* [3]. Полученный репортерный вектор обладает высокой репликативной активностью в культуре клеток Vero и в системе развивающихся куриных эмбрионов и составляет 7,89±0,19 Ig ТИД50/1мл и 7,90±0,35 Ig ЭИД50/1мл соответственно. В процессе пассажей вектор сохраняет способность к люминесценции и характеризуется генетической стабильностью.

Люциферазная активность репортерного вектора является дозозависимой. При заражении культуры клеток Vero люциферазная активность в супернатанте наблюдается уже через 6 часов после инфекции. При заражении самок мышей линии BALB/c интраназально в дозе 5.85 IgЭИД₅₀ на мышью в объеме 30 мкл люциферазная активность в легких зараженных мышей наблюдается уже через 12 часов после инфекции.

Полученный репортерный люциферазный гриппозный вектор может быть использован для мониторинга инфекции в живых биологических системах и проведения быстрой диагностики эффективности противовирусных препаратов.

1. Ghebrehewet S., MacPherson P., Ho A. Influenza. BMJ. 355 (2016).
2. WHO 2009, Influenza (seasonal) fact sheet. WHO, Geneva, Switzerland.
3. Hall M.P., et al., ACS Chem. Biol. 7 (2012).

Грибы *Trichophyton mentagrophytes* и *T. interdigitale* относятся к одному филогенетическому виду

Пчелин И. М.¹, Азаров Д. В.¹, Чурина М.А.^{2,3}, Апалько С. В.²,
Васильева Н. В.¹, Тараскина А. Е.¹

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

² Городская больница № 40, Санкт-Петербург, Россия

³ Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия

arcella.oraia@gmail.com

Аскомицетная плесень *Trichophyton mentagrophytes* является возбудителем поверхностных микозов человека и животных. Близкий к ней вид *T. interdigitale* до сих пор выделяли только от больных людей [1]. Считается, что *T. interdigitale* является обособившейся клональной линией полового *T. mentagrophytes* [2]. Самостоятельность обеих таксономических единиц является предметом длительной дискуссии в мировой литературе [3].

Целью нашего исследования стал филогенетический анализ комплекса видов *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*.

Из Генбанка была взята возможно более полная выборка нуклеотидных последовательностей региона внутреннего транскрибируемого спейсера рДНК (ITS), n = 641. К ней были применены методы вычислительного анализа видовых границ ABGD и PTP. Методом построения филогенетических сетей мы проанализировали три мультилокусных выравнивания нуклеотидных последовательностей. Также, восемь геномных последовательностей изолятов комплекса, включая четыре оригинальных, были проанализированы построением правдоподобной и коалесцентной кладограмм.

Trichophyton mentagrophytes и *T. interdigitale* относились к одной видовой гипотезе в результатах методов ABGD и PTP. Филогенетические сети для обоих видов не содержали отдельных ветвей. На филогеномных деревьях изоляты *T. mentagrophytes* были парафилетичны по отношению к изоляту *T. interdigitale*. Также, группа изолятов двух видов была не поддержана на обоих деревьях. Учитывая наличие явно выраженного баркодowego зазора в распределении генетических расстояний, вычисленных на основании полиморфизма региона ITS *Trichophyton* spp. и то, что генотипы ITS обоих обсуждаемых видов образуют непрерывный ряд изменчивости, не вызывает сомнений, что *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* принадлежат к одному и тому же филогенетическому виду.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант 18-34-00153.

1. Pchelin I. M., et al. Med. Mycol. doi: 10.1093/mmy/myy115.
2. Symoens F., et al. Int. J. Med. Microbiol. 301, 260 (2011).
3. de Hoog G. S., et al. Mycopathologia. 182, 5 (2017).

Экспрессия гена *PPAR γ* в подкожной и эпикардиальной жировой ткани при ишемической болезни сердца

Разгильдина Н.Д.¹, Пантелеева А.А.^{1,2}, Побожева И.А.^{1,2},
Драчева К.В.¹, Пчелина С.Н.^{1,2}, Мирошникова В.В.¹

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

razgnata@mail.ru

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) развивается вследствие атеросклеротических изменений сосудов, что приводит к нарушению

кровообращения миокарда [1]. Одним из наиболее значимых факторов риска развития ИБС является абдоминальное ожирение (АО) – патологическое разрастание интраабдоминальной жировой ткани, сопровождающееся нарушением ее метаболической и секреторной функции [2].

Рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором, гамма (PPAR γ) является основным транскрипционным фактором, который регулирует секрецию адипоцитокинов жировой тканью, а также влияет на экспрессию генов липидного обмена *ABCA1*, *ABCG1* и *FABP4* [3]. PPAR γ участвует в метаболизме липидов и глюкозы, а уровень его экспрессии может играть роль в развитии ИБС и АО.

Цель. Исследование ассоциации экспрессии гена *PPAR γ* в подкожной жировой ткани (ПЖТ) и эпикардальной жировой ткани (ЭКЖТ) с развитием ИБС и АО, а также с уровнем экспрессии генов липидного обмена.

Методы. Образцы ПЖТ и ЭКЖТ были получены от 66 пациентов с ИБС, перенесших операции по аортокоронарному шунтированию и 16 пациентов – представителей контрольной группы, перенесших операцию по протезированию клапанов. В соответствии с классификацией Международной Федерации Диабета (IDF) 44 пациента с ИБС и 7 представителей контрольной группы имели АО. Уровень мРНК *PPAR γ* и генов *ABCA1*, *ABCG1*, *FABP4* измеряли методом ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. Уровень мРНК *PPAR γ* в ПЖТ был значительно снижен у лиц с ИБС ($p < 0,05$) и АО ($p < 0,05$). Показано, что относительный уровень мРНК гена *PPAR γ* в ПЖТ обратно коррелировал с окружностью талии ($r = -0,424$, $p < 0,01$) и индексом массы тела ($r = -0,376$, $p < 0,03$). Кроме того наблюдалась корреляция уровней мРНК *FABP4* и *PPAR γ* в ПЖТ ($r = 0,468$, $p < 0,005$). Уровень мРНК *PPAR γ* в ЭКЖТ отрицательно коррелировал с уровнем мРНК *ABCA1* в ЭКЖТ ($r = -0,413$, $p < 0,03$) и положительно коррелировал с мРНК *FABP4* ($r = 0,613$, $p < 0,001$).

Исследование показывает, что ИБС и АО ассоциировано со снижением экспрессии гена *PPAR γ* в ПЖТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-315-00382).

1. Бокерия Л.А., Ступаков Н.Н. с соавт., Бюллетень НЦССХ им. А.Н.Бакулева РАМН. 8, 5 (2007).
2. Kim J., et al., J Clin Invest. 117 (2008).
3. Grygiel-Gorniak B., Nutr. J. 13 (2014).

Изучение регуляции системы рестрикции-модификации II типа *Esp1396I*

Резинюк Д.А.¹, Морозова Н.Е.^{1,2}, Ширяева А.А.^{1,2},
Ходорковский М.А.¹, Северинов К.В.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

nasada12@mail.ru

Изучение иммунных систем бактерий представляет повышенный интерес в связи с растущей резистентностью к антибиотикам. Одной из таких защитных систем является *Esp1396I* – система рестрикции-модификации II типа. Помимо метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции, эта защитная система содержит в себе ген С-белка (*controller protein*), который выступает одновременно в роли репрессора транскрипции гена метилтрансферазы и активатора транскрипции своего собственного гена и гена эндонуклеазы рестрикции. При больших количествах С-белка, транскрипция генов эндонуклеазы рестрикции и С-белка подавляется [1-4]. Ранее нами исследовался функциональный вариант *Esp1396I*, в котором к 3'-концам генов метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции были добавлены кодирующие последовательности флуоресцентных белков Venus и mCherry соответственно. С помощью этой модели была обнаружена временная задержка между появлением метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетках, которые трансформировали плазмидой, содержащей гены *Esp1396I* [5].

В настоящей работе исследовался вариант системы *Esp1396I* с делецией гена С-белка, также были делетированы значительные внутренние части кодирующих последовательностей генов метилтрансферазы и эндонуклеазы, так как в случае неконтролируемой экспрессии эти белки могут стать токсичными для бактериальной клетки [2]. В результате флуоресцентной микроскопии клеток, содержащих систему без С-белка, была определена динамика накопления флуоресцентных белков, которая показала высокий уровень Venus и очень низкий уровень mCherry.

Для дальнейших исследований была сконструирована плазида рС, содержащая ген С-белка под контролем арабинозного промотора. Проводилась флуоресцентная микроскопия клеток, содержащих систему *Esp1396I* без С-белка, плазмиду рС и арабинозу в различных концентрациях. Таким образом, были получены кривые динамики синтеза флуоресцентных белков в присутствии различных концентраций С-белка в клетках.

1. E. Česnavičienė, et al., *Nucleic Acids Research*. 31, 2 (2003).
2. J. E. McGeehan et al., *Nucleic Acids Research*. 36, 14 (2008).
3. E. Bogdanova, et al., *Nucleic Acids Research*. 37, 10 (2009).
4. J. E. McGeehan, et al., *Nucleic Acids Research*. 40, 9 (2012).
5. N. Morozova, et al., *Nucleic Acids Research*. 44, 2 (2016).

Вторичная структура комплексов бычьего сывороточного альбумина с ионами двухвалентных металлов в водных растворах

Романов Н.М., Баранова Ю.Г., Поляничко А.М.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

nikmromanov@gmail.com

Сывороточные альбумины (СА) являются одними из главных белков-переносчиков ионов металлов, гормонов, жирных кислот и лекарств в крови. Возможность переноса альбуминами ионов металлов зависит как от состояния белка (мономер, димер, олигомер), так и от его структуры [1]. В данной работе была рассмотрена вторичная структура бычьего СА (БСА) и комплексов БСА с двухвалентными ионами металлов. Проведен анализ изменений во вторичной структуре белка от метода пробоподготовки, состояния мономер/олигомер БСА, присутствия ионов металлов Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} .

Для анализа формы и размеров молекул БСА и в работе использовали метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР).

Вторичную структуру белка определяли по спектрам ИК поглощения методом декомпозиции полосы амид I [2]. ИК спектры были получены методом пропускания и НПВО. Такой анализ позволяет различить в составе белка до 5-7 подтипов вторичной структуры [3,4,5].

Было установлено, что в растворах мономеров БСА при взаимодействии с ионами Ca^{2+} происходит димеризация без потери нативной структуры.

В ходе работы была использована экспериментальная установка ДИКСИ в национальном исследовательском центре «Курчатовский Институт».

Часть исследований проведены в ресурсных центрах Научного Парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники».

1. Поляничко А.М., и др., Вестник СПбГУ. Физика и химия. 146, 62 (2017).
2. Byler D.M., Susi H., Biopolymer. 469 (1986).
3. Kong J., Yu S., Acta biochimica et biophysica Sinica. 549 (2007).
4. Поляничко А.М., и др, Цитология. 316, 4 (2014).
5. Polyanichko A.M., et al., Cell and Tissue Biology. 352, 4 (2014).

Различие процессов кристаллизации переохлажденной воды в нативном и аморфном влажных крахмалах

Романова А. Ю., Белопольская Т.В., Грунина Н.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

st023978@student.spbu.ru

Выполнено ДСК исследование тепловых свойств нативного и аморфного крахмалов в широком интервале влажности от 20 до 80 % H₂O и диапазоне температур от -60 до 130 °С [1,2]. Как в нативном, так и в аморфном крахмале наблюдается гистерезис между температурой плавления и температурой кристаллизации водных кластеров. Однако величина этого гистерезиса в исследуемом диапазоне влажностей в нативном крахмале изменяется на десятки градусов, а именно от 30 °С до 3 °С. В то время как в аморфном крахмале остается практически неизменной и составляет 12-14 °С. Установленное различие, по-видимому, обусловлено разрушением нативных структур крахмала при аморфизации. Как известно, набухание аморфного крахмала происходит лишь до 50% H₂O [3]. Это означает, что аморфная фаза в нативном крахмале (составляющая 50-60% от общей массы гранулы) не является истинно аморфной. Лишь после денатурации теплом крахмал становится истинно аморфным и набухает неограниченно. В этом случае наблюдается типичный для стеклующихся систем скачок теплоемкости. В нативных крахмалах такой скачок отсутствует. В исследуемом диапазоне влажностей и температур аморфный стеклующийся крахмал обладает более высокой молекулярной подвижностью, чем нативный, что и определяет практическую независимость его температуры кристаллизации от влажности. Проведенные исследования демонстрируют связь тепловых свойств собственно крахмала и его гидратного окружения.

1. Белопольская Т.В. и др. Материалы XV Международной конференции по термическому анализу и калориметрии в России (RTAC-2016).
2. Церетели Г.И. и др., Биофизика. 6 (2016).
3. Eliasson A.-C., Gudmundsson M. Starch: physicochemical and functional aspects. In: Carbohydrates in food / Ed. A.-C. Eliasson. Marcel Dekker, Inc., NY (1996).

Характеристика микробных сообществ Гренландского ледового покрова по данным ДНК-анализа кернов льда глубокого бурения

Рудая Е.С.¹, Карпунина М.В.¹, Marie D.², Сумбатян Д.А.¹,
Dahl-Jensen D.³, Булат С.А.¹

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff Cedex, France;

³ Niels Bohr Institute, 2100 Copenhagen, Denmark

rudaya.s.e@gmail.com

В рамках проекта North Greenland Eemian Ice Drilling (NEEM) (Северо-Западная Гренландия) в 2007-12 гг. был пробурен керн льда с целью получения палеоклиматического сигнала предыдущего периода потепления [1]. Кроме того, были также выполнены микробиологические исследования [2].

Цель исследования – получение молекулярных данных по микробной экологии древнего ледового покрова Гренландии и использование их как прокси глобальных климатических изменений в прошлом.

Образец льда с глубины 1706 м содержал микробные клетки (317 кл/мл). Выделенная геномная ДНК была использована для амплификации области v4-v6 бактериальных генов 16S рНК. Ампликоны были секвенированы методом MiSeq Illumina.

Образец показал большое таксономическое разнообразие. Особый интерес представили цианобактерии (более 23 %), которые при идентификации были отнесены к *Geitlerinema* (*Coleofasciculaceae*) [3] и неизвестным таксонам *Pseudanabaenaceae* и *Prochlorotrichaceae*.

Филогенетическое дерево, построенное методом Maximum Likelihood, показало, что филотип *Geitlerinema* sp. представлен 13 аллельными вариантами с абсолютным доминированием одного варианта (30 из 50 последовательностей). Это означает, что перенос материала на ледник был массовым - содержал целую популяцию данного филотипа. Согласно филогении все аллельные варианты, показавшие 99,7 % сходства с таксоном *Geitlerinema*, являются более ранней эволюционной ветвью. Из этого следует, что занос на ледник произошел в период его формирования (34 тыс. лет назад).

Ближайшие родственники всех филотипов обитают в прибрежных экваториальных районах в нейтральной или щелочной среде. Температурный диапазон роста от 20 до 45 °С. Филотип *Geitlerinema* ассоциирован с некоторыми кораллами. Два неидентифицированных филотипа, вероятно, свободноживущие; один из них, по-видимому, участвует в формировании

придонного мата, второй – обитает в филлосфере. Близкородственные культуры для всех фило типов имеют нитчатую структуру с развитыми трихомами. Клетки удлиненные, размер от 2 мкм.

1. Popp, et al., *Annals of Glaciology*. (2014).
2. Miteva et al., *Polar Research*. (2015).
3. Tinpranee N. et al., *ScienceAsia*. (2018).

Q/N-богатый участок Sfp1 отвечает за агрегацию белка в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Рыжкова В.Е.¹, Матвеев А.Г.¹, Журавлева Г.А.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия

ya_barbara@mail.ru

Прионы – это наследуемые белковые агрегаты, формирование которых индуцируется изменением конформации правильно уложенного белка. Одним из первых прионов, описанных в *Saccharomyces cerevisiae*, является прион [PSI⁺]. Это агрегированная форма фактора терминации трансляции Sup35, из-за которой снижается эффективность терминации трансляции и происходит прочтение стоп-кодонов, появившихся в результате нонсенс-мутаций [1]. Позже был описан фактор Isp⁺, который инвертирует супрессию, появившуюся вследствие мутации в гене SUP35, и была установлена связь между Isp⁺ и Q/N-богатым транскрипционным фактором Sfp1 [2].

Ранее было показано, что сверхэкспрессия SFP1 дикого типа увеличивает экспрессию SUP35, тем самым усиливая эффект прионной токсичности, и агрегаты Sfp1 влияют на размер агрегатов Sup35. Причем, оказалось, что *in vivo* удаётся обнаружить агрегаты Sfp1 при сверхэкспрессии соответствующего гена под контролем промотора CUP1 [3]. Для дальнейшего изучения влияния Sfp1 на прион [PSI⁺] в нашей лаборатории были получены различные делеционные варианты гена SFP1, слитого с GFP, и экспрессируемые под контролем промотора CUP1. Эти варианты несут делеции участков, кодирующих разные Q/N-богатые регионы. Выяснилось, что делеция региона I не влияла на агрегацию и в клетках [PSI⁺], и в клетках [psi⁻] в отличие от делеции региона II, в

присутствии которой агрегаты не формировались ни в одном из штаммов. Исходя из этого можно сделать вывод, что Q/N-богатые последовательности в регионе II необходимы для формирования агрегатов Sfp1 в клетках.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00536 и РЦ «РМИКТ» НП СПбГУ.

1. Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G., & Philippe M., *Biology of the Cell*. 95, 3-4 (2003).
2. Rogoza T., et al., *Proceedings of the National Academy of Science*. (2010).
3. Matveenko A. G., et al., *Genes to Cells*. 21, 12 (2016).

Поиск функциональных амилоидов в ооцитах *Drosophila melanogaster*

Рыжкова К.В.¹, Синюкова В.А.², Сопова Ю.В.^{1,2}, Белашова Т.А.², Галкин А.П.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский филиал института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург, Россия

kristinaryzhkova.ms@gmail.com

Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты, которые формируются за счет образования упорядоченных межмолекулярных β -складчатых листов. Большинство известных и изученных амилоидов являются патогенными и связаны с тяжелыми нейродегенеративными заболеваниями. Тем не менее, сейчас активно накапливаются данные, что амилоиды выполняют жизненно важные функции в клетках многих живых организмов. Есть данные, что ряд структур окрашивается амилоид-специфичным красителем в яичниках различных организмов, однако более детальный анализ был проведен лишь для нескольких белков.

В нашей лаборатории был разработан метод протеомного скрининга амилоидов (PSIA-LC-MALDI), основанный на устойчивости амилоидных фибрилл к ионным детергентам [1]. Этот метод позволяет идентифицировать ранее не охарактеризованные амилоиды.

С помощью данного метода мы идентифицировали белки, формирующие SDS-устойчивые амилоидоподобные агрегаты в яичниках *Drosophila melanogaster*. Нами были проведены окрашивания криосрезов яичников специфичным красителем тиофлавином S. Было показано, что амилоид-

специфичный краситель связывает структурный компонент хориона - pillars [2] и несколько белков, ассоциированных с хроматином. Сопоставив эти данные с результатами протеомного скрининга, мы определили список наиболее перспективных белков-кандидатов на роль функциональных амилоидов у дрозофилы. Один из них – мажорный белок хориона CH36, в случае делеции гена которого нарушается структура оболочки яйца [3], не формируется микропиле, что препятствует оплодотворению и в последствии приводит к стерильности мух с данной мутацией. Другой перспективный кандидат – нуклеопорин NUP50 - был выбран в соответствии с ранее полученными результатами окрашиваний яичников амилоид-специфичным красителем.

Биоинформатический анализ выявил наличие потенциально амилоидогенных регионов в белках-кандидатах. В настоящее время нами проводится работа по оценке амилоидных свойств этих белков *in vivo* и *in vitro*.

1. Nizhnikov A.A., et al., PLoS One. 9, 12 (2014).
2. Margaritis L., Kafatos F., Petrij W., J. Cell Sci. 42 (1980).
3. Velentzas A.D., et al., Data in Brief. 42, 12 (2017).

Подавление экспрессии гена *swiss cheese Drosophila melanogaster* приводит к дисфункции некоторых типов глиальных клеток

Рябова Е.В.¹, Сурина Н.В.^{1,2}, Мелентьев П.А.¹,
Жмуйдина Д.Р.^{1,2}, Саранцева С.В.¹

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербурге, Россия

ryabova_ev@pnpi.nrcki.ru

Мутации в гене *sws (swiss cheese) Drosophila* или ортолога позвоночных *NTE (neuropathy target esterase)* вызывают прогрессирующую дегенерацию нейронов у дрозофилы и мышей и сложный синдром у людей, который включает спастическую параплегию типа SPG39, синдрому Лоренса-Муна, синдрому Гордона Холмса, синдрому Гаучера-Нейгауза и синдрому Оливера-Макфарлейна. *SWS* и *NTE* широко выражены в нейронах, но также образуются в глии; однако их функция в глиальных клетках до сих пор оставалась неизвестной.

Ранее было показано, что потеря SWS в псевдокатриджной глии образует многослойное глиальное обертывание в коре ламины. Также подавление его экспрессии в глиальных клетках приводит к повреждению аксонов [1].

Нормальный белок выполняет функцию сериновой эстеразы и имеет домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA6) [2]. SWS эволюционно-консервативен, его гомологом у млекопитающих является NTE, как было упомянуто ранее. Связывание органофосфатов с этим доменом приводит к дегенерации мотонейронов и, следовательно, локомоторному нарушению как у мух, так и у человека. Это вызывает спорадическую форму нейропатии (OPIDN, organophosphorus compound-induced delayed neuropathy), приводящая к атрофии мышц кистей у людей.

В данной работе были исследованы линии с подавлением экспрессии *sws* в разных типах глии *Drosophila melanogaster* - трансгенная линия *UAS-RNAi-sws* и линия с нонсенс мутацией, которая приводит к потере 80% гена. Потеря SWS в поверхностной глии и глии кортекса приводит к изменению внешней структуры и уменьшению количества клеток. Эти данные могут указывать на то, что такие изменения в глиальных клетках также способствуют патологии, наблюдаемые у людей с мутациями в *NTE*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-09041.

1. Dutta S., et al., Disease Models & Mechanisms. 9 (2016).
2. Lush M.J., et al., Biochem J. 15 (1998).

Идентификация геномных прогностических маркеров лимфомы из клеток мантийной зоны

С.С. Саенко¹, Д.А. Королева², С.В. Цыганкова¹, Е.С. Булыгина¹,
Н.Г. Габеева², А.В. Недолужко¹, Е.Е. Звонков², О.С. Нарайкин¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

² ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

saenko@phystech.edu

Лимфома из клеток мантийной зоны (ЛКМ) – генерализованная лимфатическая опухоль, характеризующаяся агрессивным клиническим течением [1]. ЛКМ составляют 3 - 10% от всех НХЛ, что соответствует 4 - 7 случаям на 1000000 населения в год. [2].

Современная диагностика ЛКМ основывается на комплексном морфологическом, иммуногистохимическом, цитогенетическом и молекулярно-генетическом методах. До недавнего времени оценка прогноза для больных с ЛКМ была основана на международном прогностическом индексе (МИПИ), морфологическом варианте, уровне пролиферативной активности, наличие del17 и др [3]. Однако, при многофакторном анализе было доказано, что только наличие мутации в гене *TP53* оказывает влияние на общую и беспрогрессивную выживаемость [4].

В рамках данного исследования 20 пациентам с ЛКМ из российской популяции было выполнено секвенирование экзонов (2-11) гена *TP53*. Впервые в России было проведен анализ взаимосвязи наличия мутации в гене *TP53* с ответом на терапию и неблагоприятным прогнозом ЛКМ. В 25% (5/20) случаев обнаружены мутации в гене *TP53* (5, 6, 7 экзоны). Методом FISH (флуоресценция in situ) у 3/5 пациентов с мутацией в гене *TP53* была одновременно выявлена del17p (del+mut+), а у 2/5 была обнаружена только мутация (del-mut+). У одного пациента (1/20) была выявлена del17p, без наличия мутации в гене *TP53* (del+mut-). Таким образом, значимой корреляции между выявлением del17p и мутации в гене *TP53* получено не было. В отличие от наличия del17p, обнаружение мутации в гене *TP53* значимо ассоциировано с отсутствием ответа на терапию и быстрой прогрессией заболевания.

В перспективе планируется выявление мутации в гене *TP53*, как фактора неблагоприятного прогноза, и для других неходжкинских лимфом (НХЛ).

1. Лорие Ю.Ю. Диссертация кандидата медицинских наук. 2009 год.
2. Haige Ye, et al., Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 36, 185 (2017).
3. Hoster E., et al., Blood. 111, 2 (2008).
4. C. W. Eskelund, Blood. (2017).

Взаимодействия рамногалактуронана I с бактериальной РНКазой

Сафарова Э.Р.^{1,2}, Макшакова О.Н.¹

¹ *Институт Физики, медицинская физика, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

² *Казанский институт биохимии и биофизики – Обособленное структурное подразделение ФГБУН ФИЦ «КазНЦ РАН»*

enn.kvant@mail.ru

Полисахариды широко применяются в качестве материалов для систем доставки лекарственных препаратов поскольку являются биосовместимыми и нетоксичными. Инкапсуляция терапевтических белков в полимерную матрицу позволяет защитить терапевтический агент от агрессивных условий окружающей среды (например, при прохождении желудочно-кишечного тракта) и сохранить его в активном состоянии до момента адресного выпуска. Эффективность инкапсуляции и доставки во многом зависит от характера межмолекулярных взаимодействий между целевым терапевтическим белком и материалом матрицы. С одной стороны, образование энергетически благоприятных контактов между белком и полисахаридом способствует загрузке и удержанию белка в полисахаридной матрице, с другой стороны, может приводить к нежелательным масштабным изменениям структуры белка и его инактивации.

В данной работе изучались взаимодействия между рамногалактуронаном I картофеля и РНКазой *Bacillus Intermedius* (биназой), что закладывает основу для разработки методических подходов для инкапсуляции биназы в полисахаридную матрицу. Бактериальные РНКазы рассматриваются как хорошая замена традиционным средствам химиотерапии злокачественных новообразований и представляют собой перспективную альтернативу онконазе [1]. Рамногалактуронан I - разветвленный полисахарид, остов которого представлен повторами димера $[(\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}\text{-(1}\rightarrow)]$, где рамноза может быть разветвлена галактановыми и арабиногалактановыми цепями, особенности его трехмерной структуры были недавно описаны в работе [2].

В данной работе были исследованы следующие аспекты: влияние полисахарида на конформацию белка при их взаимодействии, структура комплексов биназы с фрагментами полисахарида. Для изучения изменений во вторичной структуре белка при связывании полисахарида использовался метод ИК-спектроскопии с приставкой нарушенного полного отражения. Анализ производился по полосе Амид I, об изменениях формы и положения компонент судили по спектрам второй производной. Анализ показал, что при взаимодействии белка с рамногалактуронаном масштабных структурных

изменений не происходит. Центры связывания рамногалактуронана белком картировались с помощью методов ЯМР-спектроскопии высокого разрешения и молекулярного докинга. Анализ показал, что полисахарид взаимодействует с незаряженными остатками белка, преимущественно ароматическими, посредством нейтральных боковых цепей, причем взаимодействия происходят вне активного центра.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта №18-44-160026.

1. Zelenikhin P.V., et al., *Geny i kletki*. 3, 7 (2012).
2. Makshakova O.N., et al., *Carbohydr. Polym.* 158.

**Мультиэтнический анализ ассоциации полиморфизма H63D
гена гемохроматоза (HFE) с предрасположенностью
к занятиям видами спорта на выносливость**

Семенова Е.А. ^{1,2}, Пушкарёв В.П. ^{3,4}, Дятлов Д.А. ⁵,
Леконцев Е.В. ⁶, Пушкарёва Ю.Э. ⁴, Ахметов И.И. ^{1,7}

¹ *Федеральный научно-клинический центр*

физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

² *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

³ *Уральский научно-практический Центр Радиационной Медицины ФМБА России, Челябинск, Россия*

⁴ *Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия*

⁵ *Уральский государственный университет физической культуры, Челябинск, Россия*

⁶ *Региональный центр спортивной подготовки, Челябинск, Россия*

⁷ *Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия*

alecsekaterina@gmail.com

Наследственный гемохроматоз - это состояние, при котором в органах и тканях человека накапливается избыток железа в связи с носительством мутаций в гене *HFE* (бр22.2). В частности, обладатели мутантного G аллеля полиморфизма rs1799945 C/G (H63D) гена *HFE* имеют высокий уровень железа в крови [1]. Железо является ключевым компонентом гемоглобина в эритроцитах, доставляющих кислород в различные ткани и работающие мышцы. В некоторых исследованиях было показано, что G аллель полиморфизма rs1799945 способствует проявлению аэробных возможностей организма и

предрасполагает к занятиям видами спорта на выносливость [2,3,4]. Цель работы заключалась в проведении мета-анализа данных по ассоциации полиморфизма H63D гена *HFE* с предрасположенностью к занятиям видами спорта на выносливость в различных этнических группах спортсменов и лиц, не занимающихся спортом. В мета-анализ были включены следующие исследуемые группы с использованием доступных литературных данных: африканская (контроль, $n=661$; спортсмены, тренирующие выносливость (стайеры), $n=25$) [5], европейская (контроль, $n=1110$; стайеры, $n=309$) [2,3,4,5], российская (контроль, $n=375$; стайеры, $n=255$) [5] и японская (контроль, $n=404$; стайеры, $n=60$) [5] выборки. Сравнивали частоты мутантных генотипов между стайерами и контролями каждой этнической группы (CC против CG+GG). Мета-анализ показал, что полиморфизм H63D гена *HFE* ассоциирован с предрасположенностью к занятиям видами спорта на выносливость, при этом носительство мутантных генотипов повышало вероятность стать стайером в 2,7 раза ($OR=2.67$, 95%ДИ 1.51-4.73; $P=0.0008$; $I^2=81\%$). При проведении анализа в отдельных выборках нами также были обнаружены значимые различия: африканская группа ($OR=13.6$, $P<0,0001$), европейская группа ($OR=1.64$, $P=0.0002$), российская группа ($OR=1.81$, $P=0.0007$), японская группа ($OR=2.95$, $P=0.01$). Таким образом, носительство мутантного G аллеля гена *HFE* предрасполагает к занятиям видами спорта на выносливость.

1. Burt M.J., et al., Gut. 43 (1998).
2. Chicharro J.L., et al., Br. J. Sports. Med. 38 (2004).
3. Deugnier Y., et al., Med. Sci. Sports Exerc. 34 (2002).
4. Hermine O., et al. Biochimie. 119 (2015).
5. Semenova, E.A., Miyamoto-Mikami, E., et al. 23rd Annual Congress of the European College of Sport Science, Book of Abstracts, (2018).

Идентификация функциональных амилоидов в ооцитах *Gallus gallus domesticus*

Синюкова В.А.¹, Сопова Ю.В.^{1,2},
Белашова Т.А.¹, Галкина С.А.², Галкин А.П.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский филиал института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

veleenna@yandex.ru

Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты, образующие кросс-β-структуру. Традиционно в литературе рассматриваются патологические амилоиды, ассоциированные с десятками неизлечимых заболеваний человека. Однако со временем были выявлены амилоиды, в норме присутствующие в клетках различных организмов и выполняющие жизненно важные функции, от образования биопленки бактерий и до участия в синтезе меланина у млекопитающих и человека. В последние годы появляется все больше данных, что в норме в ооцитах у самых различных организмов присутствуют фибриллярные структуры, связывающие амилоид-специфичные красители, однако системный поиск таких белков никогда не проводился. В нашей лаборатории был разработан универсальный метод протеомного скрининга амилоидов (PSIA LC-MALDI), основанный на устойчивости амилоидных фибрилл к ионным детергентам и позволяющий выявить белки, формирующие SDS-устойчивые агрегаты в исследуемом образце [1]. С помощью данного метода были проанализированы яичники *Gallus gallus domesticus* и составлены списки белков-кандидатов на роль функциональных амилоидов.

Для *Gallus gallus domesticus* наиболее перспективным кандидатом является белок вителлогенин 2 (Vit2) – предшественник основных запасющих белков желтка, источников питательных веществ на ранних этапах развития эмбриона [2].

Биоинформатический анализ последовательности белка показал наличие потенциально амилоидогенных последовательностей [3]. Было проведено окрашивание срезов яичников курицы амилоид-специфичным красителем Тиофлавин S и связывающим ДНК красителем To-Pro3. Были идентифицированы структуры, связывающие Тиофлавин S: гранулы в фолликулярных клетках и фибриллярные структуры в ооцитах на ранних стадиях развития. Это согласуется с имеющимися данными о локализации вителлогенина. Кроме того, и в ядре были выявлены структуры, связывающие тиофлавин. Таким образом уже сейчас можно утверждать, что в ооцитах *Gallus gallus domesticus* в норме присутствуют амилоидоподобные структуры.

1. Nizhnikov A.A., et al., PLoS One. 9, 12 (2014).

2. Van het Schip F.D., et al., Journal of Molecular Biology. 196, 2 (1987).

3. Ahmed A.B., Kajava A.V., FEBS Lett. 587, 8 (2013).

Сравнение гидродинамических характеристик протонированных полидиаллиламинов полученных двумя способами синтеза

Слюсаренко М.А., Евлампиева Н.П.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Поиск новых синтетических полимеров, обладающих высокой антибактериальной активностью против микобактерий туберкулеза, продолжает оставаться актуальной проблемой по настоящее время. Протонированные полидиаллиламины (ППДА) являются синтетическими биосовместимыми полимерами. За счет наличия положительного заряда в основной цепи, они обладают антибактериальными свойствами, зависящими от степени замещения амина. Четвертичные ППДА обладают постоянным положительным зарядом в каждом мономерном звене во всем диапазоне pH, но обладают более высокой токсичностью в сравнении с вторичными и третичными аналогами, которые меняют свои свойства в зависимости от кислотности среды. Недавно было установлено, что вторичные и третичные трифторацетатные соли ППДА обладают высокой микобактериальной активностью против *M. tuberculosis* [1]. Так как данные бактерии имеют сложное строение внешней стенки, лишь малое количество противомикробных препаратов оказываются эффективными против возбудителей туберкулёза этого типа. Для использования синтетических высокомолекулярных соединений в фармакологии и медицине на их свойства накладывается целый ряд требований. Для них обязательны биосовместимость, биodeградируемость, водорастворимость, строгий контроль молекулярной массы, узкие молекулярно-массовые распределения и максимально полные представления об их гидродинамическом поведении [2]. Перечисленные характеристики напрямую зависят от способа синтеза полимера. В данной работе исследованы в сравнении молекулярные свойства трифторацетатных солей вторичных ППДА, полученных двумя способами полимеризации: свободно-радикальной с использованием только инициатора полимеризации и свободно-радикальной с использованием агента передачи цепи (Raft-агента) - этилксантогената уксусной кислоты. Гомологические ряды полимеров изучены методами гидродинамики, статического и динамического рассеяния света, как описано ранее в [3]. В работе показано, что указанный Raft-агент существенно снижает ширину молекулярно-массового распределения ППДА. Новый метод синтеза позволяет получать вторичные и третичные трифторацетатные соли ППДА с молекулярными массами, варьируемыми в широком диапазоне.

1. Timofeeva L.M., et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99, 6 (2015).
2. Дженкинс М. *Полимеры в биологии и медицине* (2011).
3. Yevlampieva N.P., et al., *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 23, 5 (2018).

Взаимодействие цис- и транс-ДДП с ДНК

Солдатова А.А., Тымченко Е.И., Травкина В.И., Поляничко А.М.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

soldatova-97@mail.ru

В настоящее время лечение онкологических заболеваний является одной из самых сложных и неотложных медицинских задач. Некоторые подходы лечения основаны на применении координационных соединений платины [1]. Среди таких препаратов наиболее успешным является дихлородиаминплатина(II) (ДДП). Цис-изомер ДДП биологически активен (это соединение используется в медицине) [2], в то время как транс-изомер ДДП не проявляет биологической активности. Известно, что ДДП способна взаимодействовать с ДНК и белками в живых клетках. Однако многие аспекты такого взаимодействия остаются неясными.

Наша научная группа давно изучает влияние ДДП на биологические макромолекулы [3], [4]. В данной работе изучено взаимодействие обоих изомеров ДДП с ДНК тимуса теленка методами УФ и ИК спектроскопии. В работе изучено влияние ДДП на термическую стабильность ДНК. Все температуры плавления определялись двумя различными способами: как средняя точка и как точка перегиба сигма-образной кривой плавления. Показано, что зависимость температуры плавления ДНК (T_m) от молярного отношения ДДП к парам оснований ДНК (r) отличается для цис- и транс-ДДП: при взаимодействии ДНК с цис-ДДП, температура ее плавления понижается, при взаимодействии с транс-ДДП, напротив, растет. В ходе работы мы также оценили характерные времена реакции для обоих изомеров. Было выделено два основных этапа связывания. Характерные времена реакции для каждого из этапов, по полученным нами данным, для комплексов с цис-ДДП в два раза меньше чем для комплексов с транс-ДДП.

Часть работы была выполнена на базе ресурсного центра «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанозлектроники» Научного Парка СПбГУ.

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований за предоставленную финансовую поддержку (грант № 18-08-01500 А).

1. E. Wong and C. M. Giandomenico, Chem. Rev. 99, 9 (1999).
2. Jamieson E. R., et al., Chem Rev. 99, 9 (1999).
3. Feofilova M., et al., Biophys J. 40, Suppl 1 (2011).
4. Чихиржина Е. и др., Цитология. 60, 11 (2018).

Изменение морфологии глиальных клеток при накоплении амилоидного пептида бета у *Drosophila melanogaster*

Жмуйдина Д.Р., Рябова Е.В., Саранцева С.В., Сурина Н.В.

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

anilannas123@gmail.com

Болезнь Альцгеймера является нейродегенеративным заболеванием, затрагивающим 15 миллионов человек во всем мире. По оценкам исследователей, к 2050 году около четверти населения западных стран старше 65 лет будет подвержено риску развития данного заболевания [1]. Классическими гистопатологическими маркерами пораженного головного мозга человека с болезнью Альцгеймера являются внеклеточные амилоидные бляшки и внутриклеточные нейрофибриллярные клубки. Амилоидные бляшки расположены преимущественно в гиппокампе, лимбической системе и неокортексе и состоят из β -амилоидных пептидов, которые, в свою очередь, являются протеолитическими фрагментами более крупного трансмембранного белка предшественника амилоида (APP) [2]. Нейротоксичность амилоидного пептида бета подтверждена и доказана [3].

Мозг имеет два типа клеток: нейроны и глиальные клетки. Глиальные клетки выполняют множество функций, включая упаковку, трофическую поддержку нейронов, берут на себя роль иммунных клеток и образуют гематоэнцефалический барьер. Составляя большую часть мозга (к примеру, у млекопитающих 90 %), глиальные клетки также могут быть задействованы в процессе нейродегенерации. Не исключено, что амилоидный пептид бета, согласно гипотезе амилоидного каскада, является токсичным не только для нейронов, но и для глиальных клеток. Нарушение морфологии данной клеточной популяции влечет за собой потерю множества важных функций, описанных выше, необходимых для нормального функционирования нервной системы.

В данной работе мы исследовали линии *Drosophila melanogaster* с экспрессией APP и бета-секретазы человека, а также линию несущую последовательность Абета, состоящую из 42 аминокислот. Был проведен анализ морфологии разных типов глиальных клеток ЦНС *Drosophila*. Обнаружены нарушения в морфологии периневральной, субпериневральной глие и глии кортекса.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-09041.

1. Puglielli L., J Nat Neurosci. 6 (2003).
2. Puchtler H., J Histochem Cytochem. 13 (1965).
3. E. Gowing, et. al., J. Biol. Chem. 269 (1994).

Исследование структурных превращений фиброина шелка при его переработке с использованием ионных жидкостей

Сусанин А. И.¹, Сашина Е.С.¹, Захаров В.В.^{2,3,4}, Новоселов Н.П.¹

¹*Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, Россия*

²*Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

³*Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия.*

⁴*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.*

drsusanin@yandex.ru

Производство шелка-сырца в мире составляет более 187 тыс. тонн/год [1]. В процессах шелкопрядения немалая часть ценного природного сырья переходит в отходы. Утилизация таких отходов через растворные технологии предоставляет возможность получить биосовместимые и биоразлагаемые материалы для медицины на базе фиброина, основного белкового компонента шелкового волокна [2].

Современные технологии регенерации фиброина не позволяют получить материал, обладающий физико-механическими характеристиками исходного волокна. Для регенерированных волокон и пленок характерна высокая хрупкость, поскольку регенерированный фиброин утрачивает часть свойств, характерных для его нативного состояния [3]. Используемые растворители фиброина обладают денатурирующим и деструктурирующим действием. В последнее время растет интерес к ионным жидкостям (ИЖ) – пожаро- и взрывобезопасным, термически стабильным растворителям биополимеров [4]. Цель данной работы – изучение структурных изменений, происходящих с фиброином при переработке шелкового волокна с использованием ИЖ. Переработка включает в себя стадии предварительной обработки волокна, его растворения и регенерации. На каждой из стадий возможны структурные изменения в полипептиде.

В результате проведенной работы предложены оптимальные условия обработки шелкового волокна. Показано, что молекулярно-массовое распределение фиброина зависит как от природы ИЖ, так и от температурно-временных параметров растворения. В качестве условий растворения предложено использовать ацетат 1-бутил-3-метилимидазолия при температуре не более 90°C. Показано, что спирты служат эффективными осадителями фиброина из растворов в ИЖ, способствуя формированию β -структуры и повышению кристалличности.

Таким образом, данное исследование — это небольшой шаг к созданию уникальных биоматериалов из отходов шелка с использованием ИЖ.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки РФ (№ 4.5718.2017/8.9).

1. Akram S., Int. J. of Mod. Trends in Eng. And Res. 2, 8 (2015).
2. Lovett M., Organogenesis. 6, 4. (2010).
3. Niamsa N., Carbohydrate Polymers. 78 (2009)
4. Gupta M. K., et. al., Langmuir. 23 (2007).

**Исследование зависимости
агрегации амилоидогенных белков человека UBQLN1 и UBQLN2
от присутствия приона [PIN⁺] в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae***

Суханова К. В.¹ Данилов Л.Г.¹, Бондарев С.А.^{1,2}, Журавлёва Г.А.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

sukhanovaxenia@gmail.com

Амилоиды – неразветвленные фибриллярные белковые агрегаты, которые могут формировать следующие структуры: суперскладчатую β -структуру [1], β -соленоид или стопки глобул [2-3]. Образующиеся агрегаты характеризуются рядом специфических свойств, а именно: устойчивостью агрегатов к детергентам, таким как SDS или саркозилат натрия; связыванием специфичных красителей, таких как Конго красный и тиофлавин Т; а также наличием поперечной исчерченности вдоль главной оси фибриллы. Исследования амилоидов являются актуальными, так как было показано, что образующиеся агрегаты могут быть патогенными и вызывать развитие нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтина. Тем не менее, за последние несколько лет было доказано существование функциональных амилоидов, выполняющих различные биологические функции.

В нашей лаборатории в ходе биоинформатического анализа протеома человека были идентифицированы потенциальные амилоидогенные белки UBQLN1 и UBQLN2, которые, возможно, способны коагрегировать с уже известным амилоидом – белком Htt, вовлеченным в развитие болезни Хантингтона. Эти белки являются убиквинтин-подобными белками, основная функция которых - обеспечение протеасомной деградации неправильно уложенных белков. Известно, что белок Htt агрегирует за счет PolyQ последовательности. Аналогичное свойство было показано для одного из изученных дрожжевых белков Rnq1, который является белковым детерминантом дрожжевого фактора [*P1N+*]. Данное сходство позволяет нам использовать белок Rnq1 в качестве аналога белка Htt для исследования его коагрегации с UBQLN1 и UBQLN2 в дрожжевой модели.

В связи с этим целью нашей работы было исследовать зависимость агрегации белков UBQLN1 и UBQLN2 от присутствия в штаммах приона [*P1N+*].

В результате мы показали, что агрегаты белка UBQLN1 и UBQLN2, слитые с флуоресцентным белком EGFP, образуют точки свечения. Мы также обнаружили, что агрегаты UBQLN1 в присутствии приона [*P1N+*] характеризуются более крупными размерами, но меньшим количеством на клетку. Для белка UBQLN2 таких отличий обнаружено не было.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (17-74-10159), а также ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

1. Нижников А., Антонец К., Инге-Вечтомов, Биохимия. 80, 9 (2015).
2. Kajava A. V., Baxa U., Steven A. C., The FASEB Journal. 24, 5 (2010).
3. Shewmaker F., Mcglinchey R. P., Wickner R. B., The Journal of biological chemistry. 286, 29 (2011).

Диагностическая система для детекции и прогноза тяжести течения острых респираторных инфекций человека

Тараскин А. С.^{1,2}, Ложков А. А.^{1,2}, Лебедев К. И.¹, Клотченко С. А.¹

¹ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

taraskin_07@bk.ru

Как правило, острые респираторные заболевания (ОРЗ) вызывают вирусы гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальные вирусы, аденовирусы, а также возбудители невирусной природы: стрептококки, пневмококки, некоторые виды микоплазм и прочие возбудители. Существенной особенностью развития респираторных заболеваний является вероятное появление осложнений, в том числе приводящих к летальному исходу [1].

Как вирусные, так и бактериальные заболевания характеризуются повышенными уровнями молекулярных маркеров воспаления в зависимости от тяжести состояния. Было показано, что повышенные концентрации CRP, LBP, IL-6, IL-18 достигают более высоких значений у пациентов с бактериальными инфекциями, по сравнению с пациентами с вирусными инфекциями [2, 3].

В связи с этим, целью настоящей работы являлась разработка нового мультиплексного метода персонифицированной диагностики гриппоподобных заболеваний (ГПЗ) и тяжёлых острых респираторных инфекций (ТОРИ) на основе белкового микрочипа, который позволит определить соответствующие этиологические агенты, а также прогностические маркеры системной воспалительной реакции.

Список выявляемых патогенов: вирусы гриппа типа А и В, вирусы парагриппа II и III типа, аденовирус и респираторно-синцитиальный вирус. В качестве основных маркеров воспаления был выбран следующий перечень: С-реактивный белок (CRP), липополисахарид-связывающий белок (LBP), интерлейкин IL-6, интерлейкин IL-8, интерлейкин IL-18.

В ходе проведённых исследований был создан прототип универсального белкового микрочипа, в настоящее время проводится его апробация на клинических образцах пациентов с ОРЗ (назофарингеальные мазки и образцы сыворотки крови) с подтверждением диагноза сертифицированными ОТ-ПЦР наборами для определения гриппа и ОРВИ. Выборка пациентов составляет 100 человек.

Проект осуществляется при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 14.604.21.0180, уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI60417X0180.

1. Bakaletz L. O., Current opinion in microbiology. 35 (2017).
2. Slaats J. et al., PLoS pathogens. 12, 12 (2016).
3. Васильева И. А. и др., Цитокины и воспаление. 2, 2 (2003).

Исследование сыворотки крови больных онкогематологическими заболеваниями методом ИК спектроскопии

*Тельная Е.А.¹, Кобелева М.О.¹, Плотникова Л.В.¹, Романов Н.М.¹,
Гарифуллин А.Д.², Кувшинов А.Ю.², Волошин С.В.², Поляничко А.М.¹*

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, Россия

serlina1624@gmail.com

К онкогематологическим заболеваниям относятся все опухолевые болезни кроветворной и лимфатической ткани. Множественная миелома (ММ) – онкологическое заболевание, сопровождающееся повышенной выработкой моноклональных иммуноглобулинов [1]. Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – еще одно из наиболее распространенных онкогематологических заболеваний характеризующееся появлением в периферической крови трансформированных зрелых лимфоцитов с характерным иммунофенотипом [2]. Данная работа посвящена сравнительному анализу вторичной структуры белков сыворотки крови больных ММ, ХЛЛ и здоровых доноров на основе анализа спектров инфракрасного поглощения сыворотки крови [3].

Спектры ИК поглощения регистрировали с использованием Фурье-спектрометров Nicolet 8700 (Thermo Scientific, США) и Tensor 27 (Bruker, Германия) методами нарушенного полного внутреннего отражения и пропускания. В работе исследовали образцы сыворотки крови, полученные от 55 здоровых доноров и 45 больных онкогематологическими заболеваниями. Полученные результаты позволяют заключить, что у больных ММ наблюдаются изменения вторичной структуры белков в составе сыворотки крови. Было

установлено, что во вторичной структуре белков больных ММ наблюдается снижение доли α -спиральных участков и увеличение содержания β -слоев по сравнению со здоровыми донорами.

На основании проделанной работы можно заключить, что, опираясь на анализ спектров ИК-поглощения возможно относительно быстро различать образцы сыворотки крови здоровых доноров и больных ММ.

Авторы признательны за финансовую поддержку РФФИ (грант № 18-08-01500) и Правительства Санкт-Петербурга. Часть работ проводили с использованием оборудования Научного Парка СПбГУ: ресурсных центров «Оптические и лазерные методы исследования вещества» и «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники».

1. Gertz M.A., Rajkumar S.V. Multiple myeloma. Diagnosis and treatment. New York: Springer, 311, (2014)
2. O'Brien S., Gribben J.G. New York: Informa Healthcare. 301, (2008)
3. Polyanichko A.M., et al., Cell and Tissue Biology. 352, 4 (2014)

Особенности транскрипции генов у мутантов *CHD1* в слюнных железах дрозофилы

Торощина А. В., Ильина Ю. А., Конев А. Ю

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

darkagness@mail.ru

Генетический материал эукариот в ядре находится в виде нуклеопротеинового комплекса (хроматина), в котором нити молекулы ДНК накручены на нуклеосомы, состоящие из гистоновых белков. В процессах реализации генетической информации необходимо освобождение участков ДНК от нуклеосом с последующим восстановлением их нуклеосомной последовательности. Удаление и сборка нуклеосом выполняется гистоновыми шаперонами и АТФ-зависимыми хроматин ремоделирующими факторами. Впервые *in vivo* участие в сборке хроматина АТФ-зависимых факторов было показано для белка *CHD1* [1]. *CHD1* (хромодоменсодержащая ДНК-связывающая геликаза) – это консервативная SNF2-подобная АТФ-аза. Геном человека содержит 2 гомолога *CHD*: *CHD1* и *CHD2*, оба являются онкогенами. Как гомозиготные делеции гена *CHD1*, так и избыточная продукция этого белка имеют широкое распространение в онкологических опухолях простаты [2], что делает белок *CHD1* возможной терапевтической мишенью. Геном дрозофилы содержит только один ген *CHD1*. Отсутствие *CHD1* вызывает нарушение сборки хроматина в мужском пронуклеусе и следствием этого - нежизнеспособность эмбрионов дрозофилы. Известно, что *CHD1* необходим для включения вариантного гистона H3.3 в репликативно-независимой сборке хроматина [1]. *CHD1* принимает участие в регуляции транскрипции: в политенных хромосомах он колокализуется с элонгирующей формой РНК полимеразы II, необходим при работе РНК полимеразы I [3].

Ранее в нашей лаборатории было показано, что сверх-экспрессия нативной и каталитически неактивной форм белка *CHD1* вызывает сильную деформацию политенных хромосом в слюнных железах дрозофилы. На первом этапе были исследованы гены из пуффированного района 3С: *Sgs4*, *ng2* и *Pig1*.

В данной работе мы продолжаем исследовать влияние сверхэкспрессии *CHD1* в его нативной, доминант-негативной форме и у нуль-мутанта на транскрипцию генов из районов с нарушенным пуффированием политенных хромосом. В работу включены гены экдизонового ответа *Eig71Eb*, *Eig71Eg* и *Eig71Ee*, расположенные в районе 71E.

1. Konev A. Y., et al., Science. 317, 5841 (2007).
2. Rodrigues L. U., et al., Cancer Res. 15, 75, 6 (2015).
3. McDaniel I. E., et al., Genetics. 178, 1 (2008).

D-серин восстанавливает долговременную потенциацию у крыс после пентилентетразол-индуцированного эпилептического статуса

Трофимова А. М.^{1,2}, Постникова Т. Ю.^{1,2}, Зайцев А. В.^{1,2}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

alina.trofimova1132@mail.ru

Введение. Эпилептический статус (ЭС) вызывает нарушения синаптической пластичности [1]. Известно, что истощение D-серина или нарушение экзоцитоза в астроцитах может блокировать долговременную потенциацию (ДВП) [2, 3].

Цель работы – исследовать изменения ДВП в поле СА1 гиппокампа крыс Вистар после ЭС, вызванного пентилентетразолом (ПТЗ), и оценить влияние D-серина на индукцию ДВП.

Методы. У экспериментальных животных ЭС вызывали внутрибрюшинным введением ПТЗ (70 мг/кг) в возрасте трех недель. Переживающие срезы мозга получали через 30 суток после ЭС. Полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) отводили от радиального слоя поля СА1 гиппокампа, стимуляцию осуществляли биполярным нихромовым электродом, помещённым в коллатерали Шафера на границе полей СА1 и СА3. ДВП вызывали тета-стимуляцией. Достоверность различий определяли с помощью дисперсионного анализа с использованием последующего апостериорного теста Фишера для наименьшей значимой разницы (Fisher LSD).

Результаты. У крыс экспериментальной группы наблюдалось снижение величины ДВП по сравнению с животными контрольной группы ($1,19 \pm 0,04$ и $1,51 \pm 0,12$ соответственно, $p = 0,02$). В опытах с блокатором NMDA-рецепторов (AP-5; 50 мкМ) у крыс контрольной и экспериментальной групп ДВП не вырабатывалась ($1,14 \pm 0,10$ и $1,09 \pm 0,05$ соответственно). В присутствии D-серина (10 мкМ) у экспериментальных животных величина ДВП возросла до $1,34 \pm 0,06$, тогда как у контрольных животных D-серин не влиял на ДВП ($1,37 \pm 0,12$).

Выводы. У крыс через 30 дней после ЭС, вызванного ПТЗ, ДВП снижена. Отсутствие ДВП у животных на фоне введения AP-5 подтверждает NMDA-зависимый характер этой формы пластичности. Восстановление величины ДВП с помощью глиального нейротрансммиттера D-серина может свидетельствовать о нарушении нейрон-глиальных отношений в поддержании пластичности после ЭС, вызванного ПТЗ.

Исследование поддержано грантами РФФИ: 16-04-00998, 17-00-0040.

1. Трофимова А.М., Постникова Т.Ю., Зайцев А.В. Влияние эпилептического статуса на синаптическую пластичность в гиппокампе // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. - СПб, 2017. - С.519-522.
2. Henneberger C. et al. Long term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes // - Nature. 2010 Jan 14; 463(7278): 232–236.
3. Plata A et al. Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca²⁺ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat Hippocampus // - Front Mol Neurosci. 2018 Jun 26; 11:215.

Исследование комплексов ДДП с белками методом электрофореза

Тымченко Е.Е.¹, Солдатова А.А.¹, Чихиржина Е.В.², Поляничко А.М.¹

¹ Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров, физический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e.tymchenko@yandex.ru

Цис-дихлородиаминоплатина (цис-ДДП, цисплатин) – противоопухолевый агент, применяемый для лечения некоторых видов рака человека. В основе биологической активности цис-ДДП лежит способность этого соединения образовывать устойчивые комплексы с молекулой ДНК. [1] Однако помимо взаимодействия со своей главной терапевтической мишенью – ДНК, молекула ДДП способна взаимодействовать с другими биологическими макромолекулами, в том числе с белками крови и ядерными белками. [2], [3] Так, например, ранее было показано, что ДДП взаимодействует с сывороточными альбуминами и способствует их димеризации. [4]

Мы предполагаем, что различная противоопухолевая активность цис- и транс-ДДП и избирательность цис-ДДП по отношению к разным типам опухолей может быть связана в том числе с ДДП-белковыми взаимодействиями.

В данной работе мы проводили исследование взаимодействия цис- и транс-ДДП с сывороточными альбуминами и ядерными белками (HMGb1/2, линкерным гистонем H1 и коровыми гистонами H2A/B, H3, H4) методом электрофореза. Было показано, что взаимодействие ДДП с белками приводит к

образованию димеров, а также может стабилизировать комплексы ядерных белков.

Часть работы была выполнена на базе РЦ «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники» Научного Парка СПбГУ.

1. E. Wong and C. M. Giandomenico, Chem. Rev. 99, 9 (1999).
2. G. Ferraro, et al., Chem. Commun. 51, 46 (2015).
3. J. F. Neault and H. A. Tajmir-Riahi, Biochim. Biophys. Acta. 1384, 1 (1998).
4. I. Belaya, E. Chikhirzhina, and A. Polyanichko, J. Mol. Struct. 1140 (2017).

Ассоциативное кодирование объектов и пространства нейронами гиппокампа у мышей

*Тяглик А. Б.¹, Петрова О. А.^{1,2}, Сотсков В. П.^{1,3}, Плюснин В. В.³,
Константинов Д. В.⁴, Куликова Е. А.⁴, Ивашкина О. И.^{1,3,5}, Анохин К. В.^{1,3,5}*

¹ *Центр Нейронаук и Когнитивных наук, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Avast software s.r.o., Прага, Чехия*

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

⁴ *Московский физико-технический институт, Москва, Россия*

⁵ *НИИ Нормальной физиологии им. П. К. Анохина, Москва, Россия*

alisatiaglik@gmail.com

Одним из фундаментальных вопросов современной нейронауки является расшифровка механизмов кодирования мозгом информации об окружающей среде [1-6]. Известно, что при попадании животного в новое пространство, активность пирамидных клеток гиппокампа поля СА1 (“клетки места”) демонстрирует пространственную специфичность относительно положения животного [7-9]. Помимо общепринятого представления о роли гиппокампа в пространственном кодировании, новые данные указывают на более комплексное кодирование им информации о различных параметрах среды, включая внутреннее состояние животного [10-13]. Согласно одной из гипотез, кодирование информации в гиппокампе представляет собой формирование

связей между событиями, объектами и пространством в виде общего когнитивного эпизода [14].

Для экспериментальной проверки данной гипотезы нами была использована модель распознавания объектов, в которой животные запоминают, как тип объекта, так и его положение в пространстве. Для регистрации активности нейронов использовали метод прижизненного кальциевого имиджинга нейронов области CA1 гиппокампа с помощью микроэндоскопа. Анализ поведения осуществляли путем экспертного определения поведенческих актов и автоматического определения координат носа и вибриссных подушек с помощью обученной нейросети DeepLabCut [15]. Комплексный анализ данных кальциевой активности и поведения основан на методах машинного обучения.

На основе литературных данных [16-19] мы предполагаем, что в популяции нейронов гиппокампа происходит формирование связей между объектом и пространством, где он расположен. При этом изменение как типа объекта, так и местоположения объекта повлечет за собой перестройку паттерна кальциевой активности нейронов гиппокампа для образования новых связей в новых условиях среды. Если же изменение будет происходить только при смене типа объекта или только при смене его места, тогда клеточное кодирование исключительно объектное или пространственное.

1. Шевченко Д. Г., и др. Сопоставление активности нейронов различных областей коры в поведении. В кн.: Нейроны в поведении: системные Аспекты. М., Наука (1986).
2. O'Keefe, J., & Nadel, L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford, UK: Clarendon, (1978)
3. Hartley, T., Lever, C., Burgess, N., and O'Keefe, J. Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 369, (2014)
4. Eichenbaum H., Nat Neurosci. 18, 12 (2015).
5. Moser M. B., et al., Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7 (2015).
6. Rowland D.C., et al., Annu. Rev. Neurosci. 39 (2016).
7. O'Keefe J., Dostrovsky J., Brain Res. 34 (1971)
8. O'Keefe J. & Nadel L. The Hippocampus as a Cognitive Map (Oxford, Clarendon). (1978)
9. McNaughton B. L., et al., Nature Reviews Neuroscience. 7, 8 (2006).
10. Omer D. B., et al., Science. 359, 6372 (2018).
11. Manns J. R., et al., Neuron. 56, 3 (2007).
12. Jimenez J. C., et al., Neuron. 97, 3 (2018).
13. Danjo, T., et al., Science. 359, 6372 (2018).
14. Eichenbaum H., & Cohen, N. J., Neuron. 83, 4 (2014).
15. Mathis A., et al., Nature Publishing Group (2018).
16. Moita M. A., et al., Neuron. 37, 3 (2003).
17. Komorowski R. W., et al. Journal of Neuroscience. 29, 31 (2009).
18. Itskov V., et al., Journal of Neuroscience. 31, 8 (2011).
19. Itskov P. M., et al., Journal of neurophysiology. 107, 7 (2012).

Влияние органических растворителей на интегральный уровень метилирования ДНК

Усалка О.Г.¹, Максимова В.П.², Якубовская М.Г.², Кирсанов К.И.^{2,3}

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

³ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Ousalka@mail.ru

Метилирование ДНК – один из основных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов, который задействован в таких клеточных процессах, как геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы, клеточное старение. Абберантное метилирование может быть причиной геномной нестабильности и опухолевой трансформации клеток [1]. Механизм метилирования заключается в присоединении метильной группы к атому углерода в 5'-позиции в составе цитозина, входящего в CpG-динуклеотид. CpG-островки (кластеры CpG-динуклеотидов), расположенные в промоторных областях и в последовательностях генов-супрессоров опухолей, как правило, гипометилированы, что позволяет осуществлять нормальную экспрессию генов [2], в то время как промоторы онкогенов, а также транспозоны, тандемные и диспергированные повторы – гиперметилированы [3].

Исследование метилирования является важным направлением в изучении эпигенетической активности различных ксенобиотиков. Примером таких соединений являются органические растворители, которые могут вызывать серьезные нарушения биохимических и физиологических процессов при попадании в организм человека. В связи с этим, исследование влияния растворителей на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов в клетках млекопитающих является актуальной задачей молекулярной онкологии.

В данной работе изучалось влияние растворителей на уровень метилирования последовательности LINE-1 (long interspersed nuclear element). Это диспергированный повтор длиной 6000 пар нуклеотидов, который находится в составе факультативного гетерохроматина и имеет высокий уровень метилирования в нормальных тканях. Гипометилирование данной области является одним из признаков трансформации клеток [4].

Изменение уровня метилирования ДНК при действии органических растворителей исследовалось с помощью метода пиросеквенирования с бисульфитной конверсией. Было показано, что растворитель ацетонитрил способен снижать уровень метилирования области LINE-1, что при постоянном воздействии этого агента может привести к абберации транскрипции.

1. Hatzia Apostolou M. & Iliopoulos, Cell. Mol. Life Sci. 68 (2011).
2. Smith Z. D. & Meissner, Nat. Rev. Genet. 14 (2013).
3. Kinney S. R. M. & Pradhan S., Progress in molecular biology and translational science. 101 (2011).
4. Baba Y. et al., Digestion. 97 (2018).

**Ассоциация когнитивного статуса
с цитокиновым профилем плазмы крови у пациентов с деменцией
с тельцами Леви**

Усенко Т.С.^{1,2}, Николаев М.А.^{1,2}, Безрукова А.И.¹, Кулахбухова Д.Г.¹,
Князева М.Ю.¹, Бельцева Ю.А.³, Грачева Е.В.⁴, Милюхина И.В.⁴, Пчелина С.Н.^{1,2}

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ "НМИЦ ПН им. В.М. Бехтерева" Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

tatiana.s.usenko@gmail.com

Введение. Деменция с тельцами Леви (ДТЛ) – это нейродегенеративное заболевание, которое также, как и болезнь Паркинсона (БП), относится к группе заболеваний, называемых синуклеинопатии, в основе патогенеза которых лежит агрегация небольшого пресинаптического белка альфа-синуклеина. Точный молекулярный механизм развития ДТЛ до конца не изучен. Последние данные указывают на роль нейровоспаления при ДТЛ. Предполагается, что накопление и агрегация альфа-синуклеина может приводить к активации микроглии и активации нейровоспаления и, как следствие, развитию когнитивных дисфункций.

Цель данного исследования заключалась в оценке ассоциации цитокинового профиля плазмы крови с когнитивными дисфункциями у пациентов с ДТЛ.

Материалы и методы. В исследование вошло 11 пациентов с ДТЛ (6 женщин, средний возраст: 69,5±9,2 года, средний возраст начала 67,4±10,1 лет). В качестве групп сравнения был включен 21 пациент с БПД (13 женщин, средний возраст: 68,3±8,3 лет, средний возраст начала 64,5±8,3 года), 28 пациентов с БП (15 женщин, средний возраст: 65,9±5,6 лет, средний возраст начала 60,5±7,4 года) и 28 неврологически здоровых индивидуумов (контроль) (16 женщин, средний возраст: 69,8±7,1 лет). От каждого участника исследования был получен образец плазмы крови методом центрифугирования свежесобранной периферической крови (3000 г в течение 30 минут). Уровень двенадцати цитокинов (ИФН-гамма, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-21, ИЛ-23, ИЛ-1бета, ФНО-альфа, МХП-1) анализировали методом мультиплексного анализа с использованием аналитической системы Luminex MagPix (Luminex Corporation, USA) с использованием наборов Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (HCYTOMAG-60K, Merk-Millipore, USA) в соответствии с инструкцией производителя. Для скрининга когнитивных нарушений

использовалась краткая шкала оценки психического статуса (MMSE). Статистическую обработку данных проводили с использованием встроенных пакетов R версии 3.5.1. Для оценки отличий уровня цитокинов в плазме крови между группами использовали тест Манна-Уитни. С целью определения взаимосвязи между показателями MMSE и уровня цитокинов плазмы крови использовали корреляционный и многофакторный регрессионный анализ. Различия признавали статически значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены в виде медиана (мин-макс).

Результаты. Методом мультиплексного анализа нами была выявлена статистически значимая повышенная секреция цитокинов ФНО-альфа, ИФН-гамма и ИЛ-6 в плазме крови пациентов с ДТЛ (15.49(5.41-29.45) пг/мл, 2.04(0.78-7.34) пг/мл, 1.82(0.56-41.91) пг/мл, соответственно) по сравнению с группой пациентов с БП (10.64(4.96-18.82) пг/мл, 0.67(0.01-3.20) пг/мл, 0.32(0.005-3.40) пг/мл, соответственно) ($p=0.0249$, $p=0.0386$, $p=0.0328$, соответственно). Уровень ФНО-альфа плазмы крови был повышен в группе пациентов с БПД (15.31(6.22-30.02) пг/мл) по сравнению с БП (10.64(4.96-18.82) пг/мл) и понижен в группе пациентов с БП относительно контроля (15.39(7.99-23-91) пг/мл) ($p=0.033$, $p=0.001$, соответственно). Достоверных различий в уровнях цитокинов плазмы крови в группах БПД и ДТЛ выявлено не было ($p > 0.05$). В тоже время уровень хемокина МХП-1 в плазме крови пациентов с ДТЛ (456.98(248.70-702.30) пг/мл, БПД (422.80(215.60-1152.80) пг/мл и БП (537.20(316.70-879.10) пг/мл) статистически значимо снижен по сравнению с контролем (722.80(349.60-1144.30) пг/мл) ($p=0.0002$, $p=0.0002$, $p=0.003$, соответственно). Интересно отметить, что была выявлена тенденция к снижению уровня МСР-1 как у пациентов с ДТЛ, так и БПД относительно пациентов с БП ($p=0,085$, $p=0.058$).

В группе пациентов с деменцией (ДТЛ, БПД) методом корреляционного анализа выявлена положительная связь между значением MMSE и уровнем цитокинов плазмы крови ИЛ-2, ИЛ-12 и ИЛ-23 ($p=0.034$, $p=0.032$, $p=0.015$, соответственно). При проведении множественного регрессионного анализа в группе пациентов с деменцией (ДТЛ, БПД) было показано, что уровни цитокинов ИЛ-13 и ИЛ-21 плазмы крови оказывают значимое независимое влияние на результат MMSE ($p=0.0002$, $F=12.52$, $R^2 = 0.6453$).

Заключение. В ходе данного исследования были выявлены особенности цитокинового профиля у пациентов с ДТЛ относительно пациентов с БП и контроля, а также показана связь уровня цитокинов и когнитивного статуса в группе пациентов с деменцией.

Исследование поддержано грантом РФФИ N 18-315-00387 мол-а

Биофиторемедиация консорциумом нефтеокисляющих бактерий

Фролов М.Д.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

frollovmi hail@gmail.com

Биодеградация признана эффективной, экономичной и универсальной альтернативой физико-химической обработки нефтяных загрязнений [3]. Фермент бензоат/толуат диоксигеназа расщепляет циклические углеводороды [2], такие как камфора, толуол, салицилат, нафталин, деградирует толуол до 3-метилкатехола, который в дальнейшем поступает в сеть метаболизма ксилола.

В загрязненных экосистемах ведущая роль по деструкции углеводородов нефтяного происхождения, принадлежит, главным образом, бактериям. Это связано, в первую очередь, с физиологическими особенностями данных групп бактерий и, в частности, с их способностью к поглощению гидрофобного субстрата [1], так как эффективность микробиологической деструкции на прямую зависит от способности микроорганизмов поглощать гидрофобный субстрат.

Как показали исследования, активный рост микроорганизмов наблюдался, начиная с 5 суток культивирования, через 10 суток в колбах полностью отсутствовала нефтяная пленка и стенки колб были почти полностью очищены от нефтяных подтеков.

Используя определитель бактериальной микрофлоры, мы установили, что нами получены 5 видов различных родов бактерий. Среди них *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*.

Перспективность доминирующих бактерий для биотехнологии очистки почвы была подтверждена при оценке их метаболических свойств. Изоляты выделенные на среде Мюнца тестировали на способность деструкции отдельных углеводородов: алканов (гексан), полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) (нафталин), аренов (толуол). Наибольшей деградирующей способностью всех видов углеводородов обладает штамм *Staphylococcus* sp. Неплохие результаты получены и для штамма *Arthrobacter* sp. Бактерии родов *Pseudomonas* sp. и *Micrococcus* sp. отдавали предпочтение нормальным алканам и ПАУ.

1. Коронелли Т.В., Прикладная биохимия и микробиология. 32 (1996).
2. Сопрунова О.Б. Электронный журнал «Исследовано в России». 94 (2005).
3. Abbasian F. A. Appl Biochem Biotechnol. 8 (2015).

Expression, purification and biophysical studies of mutant p53

A. Hamad¹, R. Khadiullina¹, R. Sayarova¹, R. Sabouni, V. Chasov¹,
R. Khairullin¹, M. Baud², A. Rizvanov¹, E. Bulatov¹

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² University of Southampton, UK

Azzam.hamad@hotmail.com

In ~ 50% of tumor cases inactivation of p53, a key oncosuppressor and transcription factor, is caused by mutations that primarily affect DNA-binding domain. Oncogenic missense mutation Y220C is the ninth most common for p53 and is annually observed in ~ 100,000 new diagnosed cancer cases worldwide. Presence of this mutation disturbs tertiary structure of the p53 DNA-binding domain and leads to destabilization of the whole protein. Selective small molecule modulators of p53(Y220C) mutant can be used to structurally stabilize the protein and restore its impaired transcriptional functions.

In this study we report expression, chromatographic purification and biophysical studies of recombinant p53wt and its p53(Y220C) mutant form. The proteins were expressed in BL21 (DE3) *E. coli* strain. Affinity purification was performed using NGC Discover 100 chromatography system. Protein purity was confirmed using SDS-PAGE. Purified proteins were then subjected to biophysical studies to estimate binding with small molecule amino-benzothiazole derivative MB725. The compound was shown to selectively bind mutant p53(Y220C), as confirmed by two biophysical methods – surface plasmon resonance to measure interaction Kd and differential scanning fluorimetry to estimate protein thermal stability in presence of the compound. Overall, our results confirm preferential binding of MB725 to p53(Y220C) rather than p53wt. Subsequent studies in this area of research will aid development of personalized therapeutics targeting not only Y220C, but also other p53 mutants. The study was supported by Grant of the President of Russian Federation MK-4253.2018.4 to Emil Bulatov and RFBR 18-34-00702 mol_a grant to Regina Sayarova.

1. Emil Bulatov, et al., *Cell Death Discovery*. (2018).
2. Emil Bulatov, et al., *Frontiers in pharmacology*. 9, 450 (2018).
3. Emil Bulatov, et al., *Immunology letters*. 202 (2018).

***In silico* дизайн альфа-L-фукозидазы из *Fusarium proliferatum* LE1, направленный на формирование эндо-фукоиданазной активности**

Чеблоков А.А.¹, Кульминская А.А.^{1,2}, Рычков Г.Н.^{1,2}

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

Фукоиданы – гетерогенные фукозосодержащие сульфатированные полисахариды морских водорослей, обладающие широким спектром биологических активностей [1]. Фрагментирование фукоиданов на олигосахариды определенной длины и гидролиз их до моносахаридов фукозы ферментативным способом является экономически выгодной альтернативой современным трудоёмким и дорогостоящим методам химической деполимеризации. Разработка методов модификации ферментов, приводящих к появлению у них новых требуемых каталитических свойств, является актуальной задачей белковой инженерии и биотехнологии. В данной работе методами *in silico* [2] мы исследуем возможность внесения модификаций в аминокислотную последовательность альфа-L-фукозидазы (FFpI), ген которой был обнаружен в геноме штамма мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1, потенциально приводящих к появлению у фермента эндо-фукоиданазной активности.

На начальном этапе работы был проведен сравнительный анализ структур фукозидаз семейства GH29, эндо-фукоиданаз из семейства GH107 и структурно близких ферментов с эндо-активностью. Выявили ключевые различия проанализированных структур, наиболее принципиальным из которых является длина и структура петли, соединяющей первую β -нить с первой α -спиралью TIM-барреля данных ферментов. Соответствующая петля фукозидазы FFpI была заменена на более короткую петлю из эндо- α -ксиланазы (код PDB: 5MRJ), так как эти два фермента обладают высокой гомологией участков полипептидной цепи, фланкирующих петлю.

Мы провели молекулярный докинг четырёх потенциальных субстратов (трифукозиды с различным чередованием α (1 \rightarrow 3)- и α (1 \rightarrow 4)- связей) в активном центре ферментов FFpI дикого типа и с модифицированной последовательностью петли. Модели субстратов построили, используя веб-сервер GLYCAM [3].

По результатам молекулярного докинга с моделью фермента дикого типа установлено, что в наиболее вероятных позах остаток фукозы на нередуцирующем конце трифукозидов позиционируется внутри активного центра. Однако, для фермента с укороченной петлёй обнаружены позы, в которых внутри активного центра позиционируются как остатки фукозы,

располагающиеся на концах, так и средний остаток трифукозида соединённого α (1→3)- связями. По результатам проведенного анализа можно предположить, что укорочение петли, заключённой между остатками в позициях 35 и 105, приведёт к появлению у FFpI эндо-фукоидоназной активности.

1. Усов А. И., Билан М. И., Успехи химии. 78, 8 (2009).
2. Abagyan, M. Totrov, D. Kuznetsov., Journal of Computational Chemistry. 15, 5 (1994).
3. Woods Group. (2005-2018) GLYCAM Web. Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens, GA.

Белок Munc18-1 мозга крысы *Rattus norvegicus* – новый функциональный амилоид?

Чиринская А.В.¹, Синюкова В.А.², Велижанина М.Е.¹, Белашова Т.А.²,
Сопова Ю.В.^{1,2}, Задорский С.П.^{1,2}, Галкин А.П.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский филиал института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург, Россия

ChirinskaiteA@yandex.ru

Амилоиды – это упорядоченные белковые фибриллы, в которых бета-складчатые листы формируются за счет образования межмолекулярных водородных связей. Среди их свойств выделяют устойчивость к воздействию ионных детергентов при комнатной температуре, окрашивание тиофлавином S и Конго красным. Среди большого разнообразия амилоидов выделяют патологические, вызывающие заболевания человека и животных и функциональные, играющие важную биологическую роль.

Мы проводили поиск функциональных амилоидов в мозге крысы *Rattus norvegicus*, используя разработанный и апробированный в нашей лаборатории метод идентификации амилоидных белков PSIA-LC-MALDI [1]. В результате скрининга мы выявили белок Munc18-1. Это жизненно-важный цитоплазматический белок, участвующий в секреции нейромедиаторов [2]. В мозге белок Munc18-1 претерпевает альтернативный сплайсинг с образованием изоформ а и b.

Мы показали присутствие в мозге крысы высокомолекулярных SDS-устойчивых агрегатов белка Munc18-1, используя методы PAGE и SDD-AGE с

последующей вестерн-блот гибридизацией. Используя бактериальную систему C-DAG [3], мы показали образование амилоидных фибрилл белком Munc18-1a. Колонии штамма VS39 бактерий *E. coli* связывали краситель Конго Красный и демонстрировали яблочно-зеленую окраску при микроскопии в поляризованном свете. С помощью электронной микроскопии с негативным контрастированием мы детектировали внеклеточные фибриллы белка Munc18-1a. Полученные в системе C-DAG результаты позволяют нам считать белок Munc18-1 амилоидогенным *in vivo*.

С использованием метода иммуоцитохимии была показана локализация белка Munc18-1 в участках, связывающих краситель тиофлавин S на препаратах мозга крысы.

Полученные результаты подтверждают способность белка Munc18-1 к амилоидогенезу и дают основания предполагать, что Munc18-1 находится в мозге крысы *Rattus norvegicus* в амилоидной форме.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-50-00069, РФФИ №18-34-00419 и ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.

1. Antonets K.S., et al., Biochem. 81, 1 (2016).
2. Verhage M., et al., Science. 287, 5454 (2000).
3. Sivanathan V., et al., Nat. Protoc. 8, 7 (2013).

Применение транспозонного мутагена для флуоресцентного мечения белков *Mycoplasma gallisepticum*

Шабалина А. В.¹, Ведяйкин А. Д.^{2,3},
М.А. Ходорковский М. А.², Вишняков И. Е.³

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

shinedown901@gmail.com

Mycoplasma gallisepticum – широко распространённый возбудитель респираторных заболеваний у птиц. Данная бактерия относится к классу *Mollicutes*, представители которого имеют ряд морфофизиологических и

генетических особенностей, среди которых выделяют отсутствие клеточной стенки, небольшой размер клетки, маленький геном, урезанные метаболические пути [1]. Одним из малоизученных процессов у микоплазм является механизм деления. Известно, что в процессе деления участвует множество белков, которые могут варьировать в разных группах бактерий и архей, кроме того, сам механизм деления может быть различен [2, 3]. Данная работа направлена на изучение функций и локализации белков, которые могут быть вовлечены в процесс деления у *M. gallisepticum*.

Для определения внутриклеточной локализации белков в данной работе используются генетические конструкции, которые встраиваются в геном бактерии посредством транспозонного мутагенеза. Подобным способом можно осуществлять эндогенное флуоресцентное мечение белков интереса и определять их локализацию *in vivo*. В ходе этого исследования были сконструированы плазмиды, в состав которых входит транспозон Tn4001, подходящий для работы с *M. gallisepticum* [4], ген транспозазы, селективные маркеры (тетрациклин и ампициллин), ген интереса и ген флуоресцентного белка mMaple2.

В настоящее время созданы плазмиды для генов *ftsZ*, *dnaK*, *ef-tu*. Кроме того, проведена трансформация клеток *M. gallisepticum* штамма S6 методом электропорации, и при помощи транспозонного мутагенеза в геном встроен ген белка FtsZ:mMaple2. Клоны, в которых синтезируется белок слияния FtsZ::mMaple2, были визуализированы методом флуоресцентной микроскопии. При этом было обнаружено, что у части клеток белок слияния накапливается на одном из полюсов клетки. Дальнейшая работа позволит установить локализацию других белков и установить их взаимодействие друг с другом, а также их роль в процессе деления.

Исследование выполняется за счёт гранта Российского научного фонда (проект №17-74-20065).

1. Krieg, N.R., et al., eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. ed. Vol. 42010, Springer.
2. Erickson, H.P. and M. Osawa, Mol Microbiol. 78, 2 (2010).
3. Lluch-Senar, M., E. Querol, and J. Pinol, Mol Microbiol. 78, 2 (2010).
4. Whetzel, P.L., et al., Plasmid. 49, 1 (2003).

Сравнительная характеристика двумерной и трехмерных клеточных моделей раковой опухоли и флуоресцентная микроскопия как метод их тестирования

Шабалина Е. Ю.

Московский физико-технический институт (государственный университет),
Москва, Россия

evgenyashb@mail.ru

Современное понимание многих биологических процессов основано в основном на исследованиях гомогенных популяций клеток, культивируемых на плоских, двумерных подложках, однако 2D-модель не может точно предсказывать физиологическое поведение клеток *in vivo*, когда как 3D-культура соответствует физиологическому состоянию клеток в большей мере [1]. Трехмерные клеточные сфероиды, подобно опухолям, содержат как поверхностные, так и глубоко лежащие клетки с различным доступом к питательным веществам [2]. Также для создания трехмерных клеточных моделей используется и децеллюляризированный внеклеточный матрикс, служащий матрицей для посадки клеток [3].

Целью данной работы было изучение реакции клеток, входящих в состав различных клеточных моделей, на добавление диметилсульфоксида (ДМСО) и установление общих закономерностей в поведении клеток для каждого типа клеточной модели. В результате анализа динамику изменения интенсивности флуоресценции клеток в составе 2D-модели, обработанных 25% ДМСО, можно описать следующим образом: за 1 минуту интенсивность флуоресценции клеток уменьшилась на 20% относительно значения в $t = 0$, за 7 минут – на 17,4%. У клеток, обработанных 25% ДМСО и находившихся в толще сфероидов, наблюдалось возрастание, а затем плавное снижение интенсивности флуоресценции в пределах 200-250 с. Падение интенсивности флуоресценции в течение 450 с у клеток в периферийной области сфероидов составляло 3%-4,3% от начального значения; клеток в теле сфероидов – 11,8%-12,4%. При анализе реакции клеток в составе модели клетки-матрикс на добавление 25% ДМСО у всех проанализированных клеток наблюдался спад интенсивности флуоресценции уже в первые 30 с (на 30%), после чего значение интенсивности флуоресценции клеток становилось постоянным.

Таким образом, клетки в составе 3D-модели на основе децеллюляризованного стерильного матрикса демонстрировали различную реакцию в зависимости от концентрации ДМСО. При добавлении 25% ДМСО они реагировали как двумерный клеточный слой, при добавлении 10% ДМСО клетки реагировали схожим образом с клетками в составе трехмерного сфероидов.

1. Anna Maria Sitarski, Michaela R. Reagan, ACS Biomater. Sci. Eng. (2017).
2. Patrice Penfornis, et al., Frontiers in Bioscience, Elite. 9 (2017).
3. Ozbek et al., Mol Biol Cell. 21, 24.

Анализ нейромышечных окончаний у *Drosophila melanogaster* мутантных по гену *swiss cheese*

Шарапенков Э.Г., Мелентьев П.А., Рябова Е.В.,
Латыпова Е.М., Саранцева С.В

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

e_sharapenkov@mail.ru

Ген *swiss cheese* (*sws*) является эволюционно-консервативным и участвует в контроле поддержания жизнедеятельности клеток нервной системы [1]. Дисфункция белка-ортолога *sws* человека вызывает развитие различных нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся синдромами атаксии/спастичности [2]. Дисфункция *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 *sws*¹ 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 наша группа выявила 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*, *CG8628*, *Dup99B*. Для установления роли этих генов в нейропатологии, вызванной дисфункцией *sws*, были исследованы нейромышечные окончания личинок третьего возраста, несущих мутацию *sws*¹ при одновременном нарушении функции одного из указанных генов, которая, в свою очередь, достигалась либо дизрупцией гена (*CG15263*^{MB03647}), либо подавлением его экспрессии в нейронах с помощью запуска специфичной интерференции РНК (*UAS-RNAi-CG8628*, *UAS-RNAi-DUP99B*). Мы обнаружили изменения морфологии нейромышечных соединений у личинок третьего возраста разных генотипов, что может свидетельствовать о влиянии дисфункции указанных генов на развитие нейропатологии у мутантов по гену *sws*.

1. Kretschmar D., et al., Journal of Neuroscience. 17, 19 (1997).
2. Kmoch S., et al., Nature communications. 6 (2015).
3. Ryabova E., et al. Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics. (2018).

Биосовместимые нетканые материалы для лечения сахарного диабета

Шариков Р.В., Камышинский Р.А.

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

RV.Sharikov@gmail.com

Сахарный диабет – хроническое заболевание, возникающее при повышении уровня глюкозы в крови вследствие невозможности производства инсулина собственной поджелудочной железой, либо неэффективности использования организмом собственно выработанного инсулина [1]. Но из-за поздней диагностики и трудности контроля адекватного уровня глюкозы эта проблема еще далека от решения. Один из подходов лечения связан с трансплантацией донорской поджелудочной железы. Однако при этом возникают две проблемы: недостаток донорского материала, постоянная иммуносупрессивная терапия [2].

Решить первую проблему можно использовав альтернативные источники инсулин-продуцирующих клеток. А вторую – поместить трансплантируемый материал в капсулу, внешний и внутренний слой которой свободно пропускают кислород, инсулин и питательные вещества, а последний еще служит барьером для иммунных клеток [3]. Использование технологий макроинкапсулирования даст возможность для безопасной пересадки клеток различных типов нуждающимся пациентам и даже привести к новым методам лечения сахарного диабета.

Целью данной работы было создание внутреннего слоя макрокапсулы, материал которой должен отвечать следующим требованиям: биосовместимый, небiorазлагаемый, пористый, механически прочный. По результатам сорбции инсулина был выбран полимер полиэтилентерефталат (ПЭТФ), и с помощью метода электроформования из раствора полимера получен нетканый волокнистый материал. Исследованы его структурные свойства (пористость, диаметр волокон), механические свойства, диффузионные характеристики, проведена модификация нетканых материалов в плазме воздуха, проанализирован состав полученных материалов с помощью ИК-спектроскопии, проведены клеточные исследования.

В данной работе сделан вывод о возможности использования волокнистых материалов на основе ПЭТФ для создания инсулиносодержащей биокапсулы.

1. IDF Diabetes Atlas, 8th edition. Brussels: International Diabetes Federation; 2017. Available from: <http://www.diabetesatlas.org>.
2. Ryan, E. A., Bigam, D., et al., J. Diabetes, Obesity and Metabolism. 8, 1 (2006).
3. Bruin, J. E., Rezanja, A., et al., J. Diabetologia. 56, 9 (2013).

Генетическая нестабильность в патогенезе полинеоплазий человека

Шахматова А.Д., Гринькова Е.Я., Бутрович Г.М.,
Мирлина Е.Д., Вострюхина О.А.*

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

Vostriukhina_OA@pmpi.nrcki.ru

Первично-множественные опухоли (ПМО) или полинеоплазии – это независимо возникающие и развивающиеся злокачественные новообразования у одного пациента. При этом пораженными могут быть не только разные органы различных систем, но и парные органы (молочные железы, легкие и др.), а также мультицентрически один орган [1]. ПМО в настоящее время привлекают все более пристальное внимание клиницистов вследствие увеличения частоты их выявления и сложностью лечения этой категории больных. На сегодняшний день не существует единого мнения, какие опухоли можно идентифицировать как ПМО. Основные трудности возникают при дифференциальной диагностике между второй опухолью и рецидивом, т.е. прорастанием или метастазом первой злокачественной опухоли [2, 3].

В структуре полинеоплазий преобладает сочетание двух опухолей. Случаи тройной локализации встречаются в 5-8% наблюдений. Наличие у одного больного 4-х, 5-ти, 6-ти и более опухолей является чрезвычайно редким событием [4].

Целью данной работы явился ретроспективный анализ генетических изменений, накапливающихся в клетках двух больных - пациента с тремя мультифокальными аденокарциномами желудка и пациента с 7-ю последовательно возникающими опухолями разной локализации. Предполагалось, что идентичные мутационные профили опухолей подразумевают метастатический характер второй (и далее) карциномы.

Мутационные профили опухолей определяли с применением техники Real-time PCR, PCR-SSCP и метода электрофореза в денатурирующих условиях. Анализировали наличие повреждений в микросателлитах BAT26 и BAT40, в генах - мишенях дефектной работы системы коррекции неспаренных оснований ДНК - *TGFBR2*, *BAX*, *MSH3*, *MSH6*, *IGF1R* и др., в «горячих точках» мутагенеза генов *TP53*, *BRAF*, *APC*, *KRAS* и в маркерах потери гетерозиготности (*TP53*, *CHRN1* и *D17S786*).

Результаты молекулярно-генетического анализа опухолей сопоставлены с клиничко-патологоанатомическими данными пациентов, на основе чего составлены предположительные схемы поэтапного развития заболеваний.

1. Давыденко П.И., и др., Медицинская визуализация. 6 (2010).
2. Царьков П.В., и др., Практическая онкология. 13, 4 (2012).
3. Vakiani E., et al., J Clin Oncol. 30, 24 (2012).
4. Степанова Ю.А., et al., Медицинская визуализация. 6 (2015).

Анализ амилоидных свойств белка MBP крысы *R. norvegicus*

Шенфельд А.А.^{1,2}, Сопова Ю.В.^{1,2}, Белашова Т.А.², Галкин А.П.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

² Санкт-Петербургский филиал института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург, Россия.

shenaleksandr@mail.ru

Амилоидами называют фибриллярные белковые агрегаты с кросс-бета структурой [1]. Среди амилоидов выделяют патологические, агрегация которых в тканях ассоциирована с патологическими процессами, и функциональные, которые прямо или опосредованно участвуют в поддержании жизненно важных процессов. Поскольку в современной практике до недавнего времени не было универсальных биохимических методов идентификации амилоидов *in vivo*, можно предположить, что в тканях мозга млекопитающих существуют другие, пока еще не охарактеризованные амилоидные полимеры.

Мы применили ранее разработанный в нашей лаборатории протеомный метод [2] для выявления белков, формирующих детергент-устойчивые агрегаты в мозге крысы *R. norvegicus*. Данный подход основан на базовой характеристике всех амилоидов – устойчивости к ионным детергентам, таким как SDS. В результате протеомного скрининга в мозге крысы был выявлен ряд белков, формирующих детергент-устойчивые агрегаты, одним из которых оказался основной компонент миелиновой оболочки - белок MBP (Myelin Basic Protein). Ранее уже была показана способность коротких фрагментов белка MBP формировать фибриллы *in vitro* [3]. Наша работа, в свою очередь, была нацелена на анализ амилоидных свойств белка MBP *in vivo*.

С помощью методов полуденатурирующего электрофореза и фракционирования белкового лизата мы показали, что белок MBP представлен в мозге крысы в виде олигомеров и нерастворимых детергент-устойчивых

агрегатов. Также мы обнаружили связывание амилоид-специфического красителя тиофлавин-S с MBP содержащими миелиновыми волокнами стриатума головного мозга крысы. Полученные результаты говорят о том, что белок MBP демонстрирует амилоидные свойства в миелинизированных нервных волокнах мозга крысы *R. norvegicus*.

1. Rambaran R.N. & Serpel L.C., Prion. 2 (2008).
2. Nizhnikov A.A., et al., PLoS Genet. 12 (2016).
3. Aggarwal S., et al., PLoS Biol. 11 (2013).

Повреждения липидов и белков растений под действием естественного и искусственного окислительного стресса

Шиков А.Е., Емельянов В. В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

shik-999@inbox.ru

Ежегодно последствиями кислородной недостаточности являются крупные потери урожая. Находясь в бескислородной среде, что происходит, к примеру, при затоплениях, растение накапливает токсичные продукты обмена и недоокисленные интермедиаты, поэтому при появлении в среде кислорода может развиваться пост-аноксический окислительный стресс, который приводит к деградации мембран [1], окислению липидов [2] и белков [3] и клеточной гибели [4]. В связи с этим исследование механизмов пост-аноксического стресса является актуальным.

В работе проведено изучение влияния аноксии и пост-аноксии, а также воздействия окислительных агентов (перекись водорода, метилвиологен, менадион, медь с аскорбиновой кислотой) на окисление липидов и белков растений пшеницы и риса. Для оценки соответствующих повреждений применяли спектрофотометрические методы. В ходе исследования было выявлено, что окислительные агенты приводили к интенсификации перекисного окисления липидов (ПОЛ) преимущественно в тканях неустойчивой пшеницы. На

длительных сроках пост-аноксии (24 ч) в побегах пшеницы деструкция липидов была выражена сильнее, чем при воздействии окислителей. Во всех случаях интенсивность ПОЛ в проростках риса была ниже.

Окислительные агенты запускали процесс карбонилирования белков растений, при этом их эффект был значимым в побегах и корнях пшеницы, тогда как у риса повреждения обнаруживались преимущественно в корнях. Реаэрация приводила к карбонилированию белков в проростках обоих растений с той разницей, что у пшеницы уровень карбонилирования оставался высоким, а у риса отмечено возвращение к контрольным значениям после суток реаэрации. При этом эффект окислителей и реаэрации на окисление белков был сопоставим. Таким образом, рис демонстрировал более успешное противостояние деструктивным модификациям молекул, как при действии окислительных агентов, так и при реаэрации, что, по-видимому, обусловлено его устойчивостью к окислительному стрессу.

1. Чиркова Т.В. Вестник СПбГУ. 2, 10 (1998).
2. Pavelic D, et al., Plant Physiology. 124, 3 (2000).
3. Chang W. W., et al., Plant physiology. 122, 2 (2000).
4. Tamang, B. G., Fukao, T. International journal of molecular sciences. 16, 12 (2015).

**Оптимизация методов генотипирования популяций
по главному комплексу гистосовместимости
на примере данных проекта "Российские Геномы"**

Шиманский В., Жернакова Д., Евсюков И.,
О'Брайен С. Д.

Центр геномной биоинформатики имени Ф.Г.Дображского, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Генотипирование ГКГС является важной задачей как с научной точки зрения, так и с медицинской. Исследуемый локус характеризуется очень высоким полиморфизмом в связи со своей важной функцией в формировании иммунного ответа и необходимостью реагировать на большое количество патогенных факторов. Однако большое количество возможных аллелей для каждого из генов вызывает трудности и приводит к низкой точности при дальнейшем генотипировании методами *in silico*.

Целью данной работы является поиск оптимального сочетания программ и их параметров для всех этапах генотипирования, начиная с выравнивания результатов полногеномного секвенирования и заканчивая программами, выявляющими конкретные аллели генов ГКГС.

Краткий план исследования: подготовка данных полногеномного секвенирования, генотипирование по ГКГС при помощи специализированных программ, сравнение результатов и статистическая обработка.

Сначала было проведено генотипирование 10 образцов больных аутоиммунным гепатитом (проект «Wake-off» [15]) по ГКГС, в результате чего был выбран основной набор используемых программ и были найдены известные аллели DRB*13:01 и DRB1*07:01, сцепленные с аутоиммунным гепатитом.

В ходе исследования были протестированы следующие программные пакеты: выравнивание – BWA, bowtie2, Mosaik; генотипирование – Athlates, Optitype. В качестве контроля использовались результаты молекулярного генотипирования образцов по ГКГС. Мы разработали оптимальное сочетание программ и их параметров для генотипирования *in silico*. Далее было проведено генотипирование 250 образцов проекта «Российские геномы» с помощью разработанного набора программ и были получены частоты аллелей ГКГС для 10 этнических групп.

1. Czaja AJ, et al. *J Hepatol.* 37 (2002).
2. Kiyotani K., et al. *Journal of Human Genetics.* 62, 3 (2016).
3. Langmead B., & Salzberg, S. L., *Nature Methods.* 9, 4 (2012).
4. Lee W.-P., et al. *PLoS ONE.* 9, 3 (2014)
5. Leggett R. M., et al., *Frontiers in Genetics.* 4, 288. (2013).
6. Li H., & Durbin, R., *Bioinformatics.* 25, 14 (2009).
7. Li H., Handsaker, et al., *Bioinformatic.* 25, 16 (2009).
8. Liu C., et al., *Nucleic Acids Research.* 41, 14 (2013).
9. Ma, X., & Qiu, D. K. *World Journal of Gastroenterology.* 7, 5 (2001).
10. Oliveira L. C., et al., *Autoimmunity Reviews.* 10, 4 (2011).
11. Szolek A., et al. *Bioinformatics.* 30, 23 (2014).
12. Tang M, et al., *PLoS Genet. Public Library of Science.* 8 (2012).
13. Tanwandee T., et al., *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet.* 89, 5 (2006).
14. Yoshizawa K, et al., *J Hepatol.* 42 (2005).
15. Zhernakova D. V., et al., *PLOS ONE.* 13,7 (2018).
16. Zhernakova, D. V, et al. *Medical Gene Repertoire, Gene Flow, and Natural History of Populations across Russia.* Under review

Механизм ингибирования бактериальных топоизомераз IIА нибомицином

Ширяев Д.И.¹, Комарова Е.С.^{2,3}, Лукьянов Д.А.³, Остерман И.А.^{1,3}

¹ Химический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

dmitrii.shiriaev@outlook.com

В настоящее время в области антибактериальной терапии остро стоит проблема резистентности – устойчивости патогенного микроорганизма к используемому в клинике препарату. Одним из подходов в борьбе с резистентностью является поиск и дизайн более эффективных антибактериальных веществ, способных преодолевать имеющуюся устойчивость.

В нашей исследовательской группе ранее была разработана система поиска антибиотиков, способная к обнаружению веществ, подавляющих биосинтез белка либо индуцирующих SOS-ответ (например, посредством ингибирования биосинтеза или репликации ДНК) в бактериальной клетке [1].

В ходе скрининга веществ природного происхождения нами было обнаружено вещество нибомицин, индуцирующее SOS-ответ. Хотя нибомицин был впервые выделен в 1955 году [2], механизм его действия до сих пор не установлен. В наших экспериментах нибомицин подавлял активность бактериальных топоизомераз IIА (ДНК-гиразы и топоизомеразы IV) - ферментов, обеспечивающих взаимный переход ДНК из суперскрученной в релаксированную форму путем внесения двуцепочечного разрыва и переноса цепей. Нибомицин нарушал мономеризацию ДНК кинетопластов, опосредованную обоими типами ферментов. Далее, в отличие от фторхинолонов, известных ингибиторов топоизомераз, чья активность приводит к образованию линейной формы ДНК, нибомицин обеспечивал образование релаксированной циклической ДНК, содержащей одноцепочечный разрыв. Нибомицин обладал активностью как по отношению к ДНК-гиразе дикого типа *E.coli*, так и к ее мутантной форме, невосприимчивой к действию фторхинолонов. Примечательно, что в работе [3] производные нибомицина подавляли активность только мутантных ДНК-гираз.

Способность нибомицина нарушать работу фторхинолон-устойчивых ДНК-гираз делает его структуру основой для рационального дизайна новых ингибиторов топоизомераз, однако для этого необходимо дальнейшее изучение механизма его действия.

1. Osterman I. A., et al., Antimicrob. Ag. and Chemoth. 60, 12 (2016).

2. Asheshov I. N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 41, 9 (1955).

3. Hergenrother P. J., et al., Nat. Commun. 6 (2015).

**Суицидная генная терапия раковых клеток
с использованием гена тимидинкиназы вируса простого герпеса,
доставленного пептидными носителями,
модифицированными лигандом к интегринам $\alpha\beta 3$**

Штыкалова С.В.^{1,2}, Егорова А.А.¹, Киселев А.В.¹

¹ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии
и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

sofia.shtykalova@gmail.com

Суицидная генная терапия – доставка в клетки-мишени генов, индуцирующих апоптоз, – является одним из подходов в генной терапии рака. Актуальной проблемой генной терапии является разработка систем целевой доставки. Нами были разработаны пептидные носители, содержащие лиганд к интегринам $\alpha\beta 3$ (iRGD), гиперпродукция которых представлена на опухолевых клетках. Данная модификация способствует целевой доставке в клетки-мишени нуклеопептидных комплексов путем рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Цель работы: разработка пептидных носителей, модифицированных лигандом iRGD, для доставки плазмиды с геном HSV1-ТК, в клетки, содержащие на поверхности интегрин $\alpha\beta 3$.

Были синтезированы пептидные носители, модифицированные циклическим лигандом iRGD, и сформированы комплексы с ДНК при различных зарядовых соотношениях. Изучены физико-химические свойства сформированных комплексов. Специфичность проникновения и доставки ДНК в клетки была показана в серии экспериментов, проведенных на клетках с различным поверхностным содержанием интегринов $\alpha\beta 3$ (PANC-1, HeLa, HEK293). Суицидная генная терапия плазмидой с геном HSV1-ТК с последующим лечением ганцикловиром проводилась на клетках панкреатической карциномы человека PANC-1.

С помощью проточной цитометрии на 35, 18 и 3% клеток PANC-1, HeLa и HEK293, соответственно, было показано присутствие интегринов $\alpha\beta 3$. Изучение транспорта ДНК, меченной YOYO-1, показало зависимость между эффективностью проникновения ДНК и присутствием интегринов $\alpha\beta 3$ на поверхности клеток. С помощью теста на токсичность AlamarBlue было показано снижение пролиферативной активности клеток PANC-1, трансфицированных геном HSV1-ТК. Анализ уровня апоптоза у клеток трансфицированных геном HSV1-ТК и контрольных клеток PANC-1 показал достоверные различия.

Таким образом, разработанные носители являются перспективными для специфичной и эффективной доставки гена HSV1-ТК в опухолевые клетки с целью суицидной генной терапии.

Вторичные метаболиты дрожжей как источник новых антимикробных препаратов

Шуленина О. В.^{1,2}, Яровой Б. Ф.¹, Полесскова Е. В.¹, Коневега А. Л.^{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, Россия

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

ovshulenina@gmail.com

Поиск новых антибактериальных соединений является актуальной задачей биологии и медицины. В качестве одного из источников потенциальных антибактериальных препаратов выступают природные соединения, образующиеся в результате жизнедеятельности некоторых организмов в данном биоценозе. Исследования [1, 2] демонстрируют эффективность ряда дрожжевых штаммов в производстве вторичных метаболитов, обладающих противомикробными свойствами.

В Отделении молекулярной и радиационной биофизики ПИЯФ имеется уникальная коллекция дрожжей и дрожжеподобных грибов, сформированная под руководством Б. Ф. Яровой и В. П. Степановой, которая насчитывает порядка 2500 штаммов [3]. В нашей работе проводится анализ культуральных жидкостей штаммов коллекции на проявление ими антибактериальных свойств.

При скринировании библиотек соединений применяют различные клеточные тест-системы, несущие репортерные гены [4]. Начальный этап нашего исследования культуральных жидкостей осуществляется с применением рекомбинантного бактериального штамма *E. coli* BW25113 ($\Delta toI/C$) с репортерной плазмидой pDualrep2. Данная клеточная система экспрессирует флуоресцентные белки-репортеры при наличии в среде ингибиторов биосинтеза ДНК и ингибиторов биосинтеза белка [5].

Нами разработан метод количественной оценки интенсивности флуоресцентного сигнала, позволяющий отслеживать изменения в жидкой бактериальной тест-культуре в течение всего процесса активного клеточного роста в присутствии исследуемых соединений. Полученные данные впоследствии анализируются с применением статистического параметра [6], что позволяет произвести отбор образцов для следующего этапа исследования.

Нами проведен анализ 450 культуральных жидкостей дрожжевой коллекции с применением бактериальной тест-системы *E. coli* BW25113 с репортерной плазмидой pDualrep2. Выявлены образцы, влияющие на рост бактериальных клеток, а также усиливающие сигналы флуоресценции

ингибирования биосинтеза ДНК и флуоресценции ингибирования биосинтеза белка.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-00-00368.

1. Nielsen J.C et al., *Nature Microbiology*. 2 (2017).
 2. Fakruddin M. et al., *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17, 64 (2017).
 3. Suslov A.V. et al., *Radiation Biology, Radioecology*. 44, 5 (2004).
 4. Galluzzi L, Karp M., *Comb. Chem. High Throughput Screen*. 9, 7 (2006).
 5. Osterman I.A. et al., *Antimicrob. Agents Chemother*. 60, 12 (2016).
 6. Zhang J. et al., *J. Biomol. Screen*. 4, 2 (1999).
-