

Тезисы молодежной конференции

Site-directed mutagenesis of TMBP from *Thermococcus litoralis* aimed to increase the dissociation constant of glucose

Alshanaa O.R.¹, Shalguev V.I.², Fonin A.V.³, Rychkov G.N.^{2,1}, Turoverov K.K.^{3,1}

¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

² B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of NRC "Kurchatov Institute", Gatchina, Russia

³ Institute of Cytology of RAS, Saint Petersburg, Russia

aalshanaa@mail.ru

The changing fluorescent properties of carbohydrate binding proteins as a result of conformational changes due to carbohydrate binding can be employed to noninvasively monitor glucose concentrations in patients with diabetes. Fonin *et al.* [1] suggested to use a modified form of D-Trehalose/D-Maltose binding protein (TMBP) from *Thermococcus litoralis* as the sensitive part of a glucose biosensor and studied the conformational changes of the protein using fluorescent dye BADAN. Besides, TMBP is a well studied protein, and the availability of the crystal structure facilitated both *in silico* and wet laboratory studies [2]. Therefore, our work aimed to engineer TMBP in order to produce a glucose binding protein with a higher glucose dissociation constant for the purpose of monitoring glycaemic control.

In silico studies were conducted using the MolSoft ICM program package including molecular mechanics in implicit solvent and molecular docking of D-glucose at TMBP binding site. Key amino acid residues involved in glucose binding were recognized, and consequently we proposed a series of substitutions to decrease the glucose binding free energy [3].

Wet laboratory studies included PCR site-directed mutagenesis based on the preliminary computational results. Moreover, the study included plasmid cloning into *E. coli* DH5 α and later expressing the mutated proteins in *E. coli* BL21 (DE3) according to Maniatis protocols.

Three amino acid residues Y147, R390 and W283 were suggested for site-directed mutagenesis. The aforementioned sites were respectively replaced by tryptophan, lysine and tyrosine. Hence, seven different mutant forms of TMBP were produced: Y147W; R390K; W283Y; Y147W/R390K; R390K/W283Y; Y147W/W283Y; Y147W/R390K/W283Y.

We successfully conducted cloning and protein expression of each mutant form with approximately 35% of total protein production by *E. coli* BL21 (DE3). Fluorescent studies for conformational changes of each mutant form of TMBP and their glucose binding properties are still under investigation.

1. Fonin A.V., Stepanenko O.V. et al. Peer J., 2, e275 (2014).

2. Diez J., Diederichs K. et al. J. Mol. Biol., 305(4), 905-915 (2001).

3. Пивоваров В. А., Фонин А. В. и др. Тезисы докладов международной молодежной конференции «Физика». СПб, с. 30 (2015).

Investigation of photosynthetic pigments and photosynthetic activities in field grown pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves infected by ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’

Balakishiyeva G.Sh., Bayramova J.Y., Madadli A.M., Huseynova I.M.

Institute of Molecular Biology and Biotechnology, ANAS, Baku, Azerbaijan
mededli.aysel@mail.ru

‘*Candidatus* Phytoplasma solani’ is the most common phytoplasma, which has a wider range in solanaceae crops, especially, in peppers, tomatoes and eggplants in Azerbaijan [1]. This phytoplasma induces stolbur disease and infected plants show leaf discoloration, stunting and especially flower malformations, such as virescence and phyllody, leading to sterility [2]. The aim of present work was to investigate the effect of ‘*Ca. P. solani*’ to content of photosynthetic pigments, chlorophyll-protein complex, and photosynthetic activities in field grown pepper plants (*Capsicum annuum* L.). Presence of phytoplasmas was detected in the symptomatic pepper plant samples by nested PCR amplification of their 16S rDNA with universal primers for phytoplasmas. Taxonomic characterization performed by RFLP analysis of Nested PCR products with *AluI* and *RsaI* showed that RFLP patterns of all of pepper samples were identical to the ‘*Ca. P. solani*’ reference isolate. Pigment content analysis indicated that the total chlorophyll (Chl) and carotenoid (Car) content was drastically reduced in infected pepper leaves in comparison with healthy control. As a Chl *a* is more exact characteristic of photosynthetic activity, decreasing of Chl *a/b* ratio in infected plants could explain the decreasing of photosynthetic rates under phytoplasma infection. Car/Chl ratio in infected plant leaves was increased. This could be due to slowly decrease of Car than Chl contents. The Fv/Fm ratio decreased in the infected leaves. It was mainly due to decrease in Fv without increasing the Fo level. This is characteristic for inhibition on the donor side of PS II, thus the result could be used in the development of phytoplasma resistant varieties. The decreasing of pigment composition and electron transport can be attributed to damage caused mostly in photosystem (PS) II by phytoplasma infection.

This work was supported by the Science Development Foundation under the President of the Republic of Azerbaijan (EIF-2014-9(24)-KETPL-14/11/3-M-10).

1. Balakishiyeva G. et al. J. Plant Pathol., 92 (4sup), s4.115 (2010).
2. Quaglino F. et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 63(2879), 10.1099/ijms.0.044750-0 (2013).

Stringent response factor RelA is specifically inhibited by thiostrepton *in vitro* while translational antibiotics affect its activity *in vivo* indirectly

*Kudrin P.¹, Varik V.¹, Beljantseva J.¹, Oliveira S.¹, Payoe R.^{3, 4},
Dzhygyr E.^{3, 4}, Rejman D.², Tenson T.¹, Hauryliuk V.^{1, 3, 4*}*

¹ *University of Tartu, Institute of Technology, Tartu, Estonia*

² *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., Prague, Czech Republic*

³ *Department of Molecular Biology, Umeå University, Umeå, Sweden*

⁴ *Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), Umeå University, Umeå, Sweden*

* vasili.hauryliuk@ut.ee

The stringent response is a central bacterial regulatory pathway mediated by the alarmone nucleotide ppGpp [1]. In *E. coli*, stringent response factor RelA synthesizes ppGpp in response to increased level of deacylated tRNAs caused by the amino acid starvation. ppGpp exerts its regulatory role by modulating the activity of numerous enzymes [1]: RNA polymerase, translational GTPases, and by activating the ppGpp-synthetic activity of RelA itself [2]. This stress survival system is important for bacterial virulence [1] and for formation of antibiotic-tolerant phenotypic variants in clonal bacterial population, so-called persister cells [5].

Using an *in vitro* stringent response and translation system [2] we have tested the inhibition of *E. coli* stringent response factor RelA by antibiotics tetracycline, thiostrepton, chloramphenicol and recently developed RelA inhibitor Relacin [3]. Both Relacin and tetracycline inhibit RelA inefficiently and the inhibition is insensitive to the A-site tRNA while the inhibition of RelA by thiostrepton is strongly dependent on the presence of deacylated tRNA. We hypothesize that RelA enzyme acquires two different conformations in the presence and absence of tRNA leading to dramatically different sensitivity to thiostrepton.

Using an HPLC-based approach we studied the effects of antibiotics in bacterial cultures by measuring bacterial growth rates and nucleotide pools as well as the effects of the stringent response inhibition by antibiotics on formation of persisters. Together with confirming the key role of RSH proteins in bacterial persistence [5, 6] and elucidating the indirect effect of translational antibiotics on stringent response we also report on complete tolerance to the ampicillin challenge upon dual, mupirocin-trimethoprim pre-treatment what supports the previously described idea of suppressive drug interaction between translational and DNA synthesis inhibitors [7].

Generally, our analysis of antibiotics effect on stringent response has revealed the requirement for the specificity, since off-target effects can overshadow the effects on persistence.

1. Dalebroux, Z. D. & Swanson, M. S. Nat Rev Microbiol 10, 203-212, (2012).
2. Shyp, V. et al. EMBO Rep 13, 835-839, (2012).
3. Wexselblatt, E. et al. PLoS Pathog 8, e1002925, (2012).
4. Dalebroux, Z. D. et al. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 171-199, (2010).
5. Maisonneuve, E. et al. Cell 154(5), 1140-50, (2013).
6. Gerdes K, Maisonneuve E. Annu Rev Microbiol. 66, 103-23, (2012).
7. Bollenbach, T. et al. Cell 139(4), 707-18, (2009).

Идентификация TaDREB1 генов у пшеницы с использованием функциональных маркеров

Абдуллаева Г. Р., Рустамова С. М.

*Институт молекулярной биологии и биотехнологий
Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан*

abdullayevagulnar95@gmail.com

Одним из главных явлений, происходящих в клетке при водном дефиците, является экстенсивная модификация генной экспрессии. С помощью различных генетических и биохимических подходов исследуются ключевые гены, ответственные за засухоустойчивость. Именно регуляция экспрессии генов, вовлеченных в стрессотолерантность, является необходимой для усовершенствования этого признака у растений. Транскрипционные факторы являются мощными средствами для генной инженерии, так как их сверхэкспрессия может привести к up-регуляции целого ряда генов, контролируемых этими факторами. Среди всех транскрипционных факторов внимание многих ученых привлекают именно факторы, связывающие элемент ответа на дегидратацию (DREB – Drought Responsive Element Binding), так как они вовлечены в устойчивость к целому ряду стрессов, включая засуху, засоление, замораживание и т. д. В связи с этим, целью данной работы являлась идентификация генов факторов транскрипции DREB1, позитивно регулирующих устойчивость к засухе на уровне генома А. Объектами исследования служили 75 генотипов мягкой пшеницы, взятые из Ген-банка Научно-исследовательского института земледелия, различающиеся по засухоустойчивости, архитектонике, продуктивности и по другим физиологическим параметрам. Выделение ядерной ДНК проводили по СТАВ-методу с некоторыми модификациями. Для амплификации использовали геном-специфичный праймер P25F/Pra (5' CTGGCACCTCCATTGCTGCC3'/5'AGTACATGAACTCAACGCACAGGA CAAC3'), созданный для генов Dreb1 генома А. Продукты реакции разделяли путем электрофореза в 1,5 % агарозном геле с добавлением этидиумбромиды и документировали с помощью системы “Gel Documentation System” (“UVITEK”, СК). Размеры амплифицированных

фрагментов определяли относительно ДНК-маркера 100 бр. У 69 генотипов *Triticum aestivum* L. в электрофоретических профилях визуализировались фрагменты в области 1113 бр. Этот результат указывает на то, что у этих генотипов в хромосомах 3А расположены гены Dreb A1. Однако у 6 из использованных 75 образцов не наблюдалась амплификация ожидаемых фрагментов.

Роль гена *HIM1* в регуляции мутационного процесса у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

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

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

Ген *HIM1* (*high induced mutagenesis*) входит в одну эпистатическую группу с генами *HSM3* и *HSM6*. Ген *HIM1* кодирует белок *Him1p*, биохимическая функция этого белка не известна. Известно, что выключение гена *HIM1* приводит к увеличению как спонтанного, так и индуцированного мутагенеза. Так же известно, что белок *Him1p* физически взаимодействует с гистон деацетилазой *Sin3*, образуя *SIN3* деацетилазный комплекс.

Sin3 участвует в таких процессах как: мейоз, репликация и репарация ДНК, регуляция транскрипции, а также вовлечен в процесс модификации структуры хроматина.

Для определения роли гена *HIM1* в регуляции мутационного процесса у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, мы определили уровень спонтанного репаративного и репликативного мутагенеза у штаммов дикого типа (ДТ), одиночных мутантов *sin3* и *him1*, двойного мутанта *sin3 him1*. А также выживаемость и уровень УФ-индуцированного мутагенеза у этих же штаммов и штамма *him1 Δrad53-C*.

Частота спонтанного репаративного мутагенеза значительно выше у мутанта *him1* (приблизительно в 3 раза и 12 раз) и двойного мутанта *sin3 him1* (приблизительно в 3 раза и 9 раз), по сравнению с клетками ДТ и мутантом *sin3*, соответственно. Частота спонтанного репликативного мутагенеза также повышена у мутанта *him1* (приблизительно в 2 раза и 4 раза) и двойного мутанта *sin3 him1* (приблизительно в 4 раза и 6 раз), по сравнению с клетками ДТ и мутантом *sin3*, соответственно.

Мутант *him1* менее чувствителен к действию УФ-излучения, чем клетки ДТ, двойной мутант *sin3 him1* и мутант *him1 Δrad53-C*.

Частота УФ-индуцированного мутагенеза у мутанта *him1* значительно выше, по сравнению с клетками ДТ, мутантом *sin3*, двойным мутантом *sin3*

hsm1 и мутантом *him1 Δrad53-C*. Частота УФ-индуцированного мутагенеза у мутанта *him1 Δrad53-C* и клеток ДТ практически одинакова.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что мутация *him1* значительно влияет на частоту УФ-индуцированного мутагенеза и спонтанных мутаций. А также в сочетании с мутацией *sin3*, приводит к уменьшению частоты УФ-индуцированного мутагенеза, и практически не влияет на уровень спонтанных мутаций. Мутант *him1 Δrad53-C* с клетками ДТ имеют практически одинаковую частоту УФ-индуцированного мутагенеза.

Микрофлюидные системы в исследованиях ангиогенеза *ex vivo*

Артеменко М. Р.¹, Трашков А. П.^{1, 2}, Верлов Н. А.^{1, 2}

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

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

shadow_ii@list.ru

Развитие классических моделей *in vivo* и *in vitro* для исследования ангиогенеза, начавшись в прошлом столетии, интенсивно продолжается и в настоящее время. Использование литографических технологий позволяет реализовать новые подходы к созданию моделей *in vitro*, примером могут служить микрофлюидные системы и системы типа «орган-на-чипе».

Последние тенденции в исследовании ангиогенеза заключаются в использовании микрофлюидных систем, изготовленных методом лазерной или электронной литографии. В настоящее время подобные системы широко применяются для моделирования физиологических и биохимических процессов, а также при исследовании поведения различных клеточных линий, формирующих в микрофлюидной системе различные органы или ткани, в контексте максимального приближения к физиологическим условиям.

Нами разработан чип для исследования комбинированного влияния ангиогенных и антиангиогенных факторов на образование микрососудистого русла. Дизайн системы был разработан на основании анализа результатов применения подобных чипов в исследованиях ангиогенеза [1–3]. Камера для клеток, в которой обеспечиваются необходимые параметры среды, отделена от смесительной камеры камерой, заполняемой гелем. В смесительную камеру входят семь каналов, в каждый из которых подается определенный фактор. Концентрация смеси факторов

в смесительной камере задается напором в каждом из приточных каналов или близостью участка подачи фактора в системе. Наблюдение за образованием микроциркуляторного русла производится с использованием микроскопа и камеры, снимающей изображение с периодичностью в несколько минут. Температурный режим и параметры газовой смеси обеспечиваются за счет системы термостатирования и CO₂ инкубатора, совмещенного с микроскопом.

Разработанная микрофлюидная система сочетает в себе все положительные стороны моделей как *in vivo*, так и *in vitro*, являясь, таким образом, системой *ex vivo*. Микрофлюидные системы открывают большие возможности для доклинических исследований лекарственных средств, в частности, обладающих активностью в отношении эндотелия.

1. Baker V.M. et al. Microfluidics embedded within extracellular matrix to define vascular architectures and pattern diffusive gradients. *Lab Chip*, 13(16), 3246–52 (2013).
2. Bischel L.L. et al. Tubeless microfluidic angiogenesis assay with three-dimensional endothelial-lined microvessels. *Biomaterials*, 34 (5), 1471–7 (2013).
3. Kim C. et al. A quantitative microfluidic angiogenesis screen for studying anti-angiogenic therapeutic drugs. *Lab Chip*, 15 (1), 301–10 (2015).

Полиморфные варианты генов фолатного цикла в популяции города Астрахани русской и казахской национальностей

*Копылова М. Р., Афанасьева Д. М., Сазбанова А. Д.,
Керимова К. Е., Сухорукова Т. В.*

Астраханский государственный университет, Астрахань, Россия

Целью работы было исследование полиморфизма генов фолатного цикла MTHFR, MTR и MTRR у студентов Астраханского государственного университета разных национальностей.

В исследовании принимали участие девушки и женщины в возрасте от 18 до 33 лет. Все испытуемые принимали участие в исследовании добровольно. По этнической принадлежности все обследованные были разделены на 2 группы: русские, европеоидная раса; казахи, переходная раса между монголоидной и европеоидной. В работе проводились исследования по выявлению полиморфизма генов фолатного цикла. Всего в данном исследовании приняли участие 69 человек.

В результате исследования были определены частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов MTHFR:_677_C>T, MTHFR:_1298_ A>C, MTR:_2756_ A>G, MTRR:_66_ A>G.

В локусе MTR_2756 гомозиготная замена GG в 9 раз чаще встречалась у казахов (57,1 %), в то время как у русских составила только 6,3 %.

Гомозиготы по норме и гетерозиготы в выборках встречались с одинаковой частотой.

Аналогичная динамика прослеживалась и для локуса MTHFR_677: замена по двум аллелям TT у казахов достигла 19 %, у русских – 2,1 %. Однако в гетерозиготном состоянии этот полиморфный ген несколько чаще встречался у представителей русской национальности (41,6 к 23,8 %).

Локус MTHFR_1298, в отличие от предыдущих, у русских испытуемых содержал замены значительно чаще: AC – 41,6 %, CC – 12,5 %, что в 1,5 и 3 раза больше, чем у казахов.

Одинаковая частота всех трех состояний в обеих популяциях выявлена для локуса MTRR_66 с преобладанием гетерозигот AG над нормой AA и гомозиготами GG.

Согласно полученным результатам, из выборочной совокупности более подвержены возникновению гомозиготных нуклеотидных замен и соответствующим метаболическим эффектам представительницы казахской национальности.

Трехмерная реконструкция рибосом в составе полирибосом методами криоэлектронной томографии

*Баймухаметов Т. Н.¹, Афонина Ж. А.², Печникова Е. В.³, Сорокин И. И.²,
Широков В. А.², Ковальчук М. В.^{1,3}, Ильин В. А.¹, Васильев А. Л.^{1,3}*

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

² *Институт белка РАН, Пущино, Россия*

³ *Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова РАН, Москва,
Россия*

baymukhametov.timur@gmail.com

Полирибосомы (полисомы) представляют собой упорядоченные структурно-функциональные комплексы отдельных рибосом, одновременно транслирующих одну молекулу мРНК. Высоконагруженные эукариотические полисомы, как правило, представлены двурядными структурами, среди которых выделяют две основные топологии организации: циркулярную и линейную. Для понимания процессов трансляции, а также механизмов, определяющих структурную организацию полисом, необходима информация о взаимных расположениях и ориентациях рибосом, составляющих комплекс.

Современная криоэлектронная томография (крио-ЭТ) является мощным методом структурных биологических исследований и позволяет достичь разрешения, достаточного для однозначного определения ориентаций отдельных рибосом в составе полисомы. В данной работе, на примере образцов, полученных в Институте белка РАН, будет описана методология томографических исследований в просвечивающей криоэлектронной микроскопии с использованием современного оборудования Titan Krios (FEI, США) и вычислительные методы, лежащие в основе томографической реконструкции и субтомографического усреднения. Результаты работы свидетельствуют о потенциальной возможности решения задачи взаимосвязи особенностей структурной топологии полисом и их активности.

Работа выполнялась при поддержке грантов РФФИ 15-04-08649 и 16-34-60148, и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Межмолекулярные взаимодействия сывороточных альбуминов в присутствии двухвалентных ионов металлов

Баранова Ю. Г., Романов Н. М., Травкина В. И., Поляничко А. М.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

jul.bar.g@yandex.ru

Сывороточные альбумины (СА) – самые распространенные белки плазмы крови у млекопитающих. Обладая достаточно сложной пространственной структурой, СА способны связываться с широким спектром различных соединений, в том числе и с ионами металлов. Подобные взаимодействия могут приводить к изменениям в пространственной структуре белка, а также, влиять на способность СА к агрегации. На данный момент не существует единой теории формирования надмолекулярных структур СА, однако установлено, что образование агрегатов сильно зависит от кислотности среды и концентрации белка в растворе [1].

В данной работе, в качестве модельных белков использовались бычий и человеческий сывороточные альбумины (БСА и ЧСА). Исследовали взаимодействие этих белков с двухвалентными ионами металлов, такими как Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} . Методами аналитического ультрацентрифугирования (АУЦ) и электрофореза в полиакриламидном геле было показано, что взаимодействие с ионами Mn^{2+} приводит образованию преимущественно димерных комплексов. Для анализа вторичной структуры комплексов БСА с ионами металлов в водных растворах использовали метод ИК-спектроскопии, который позволяет различить достаточно большой набор различных типов вторичной структуры, таких как α -спираль, β -повороты, β -складки, 3_{10} -спираль и др. Было показано, что присутствие ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} не приводит к регистрируемым изменениям во вторичной структуре СА. Вместе с тем установлено, что взаимодействие СА с ионами Cu^{2+} и Mn^{2+} приводит к существенным изменениям вторичной структуры, которые выражаются в увеличении межмолекулярных β -слоев за счет уменьшения α -спиральности белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-08-06876). Часть работ была выполнена с использованием оборудования ресурсных центров Санкт-Петербургского государственного университета: «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» и «Оптические и лазерные методы исследования веществ».

1. Поляничко А. М., Михайлов Н. В. и др. Цитология, 58(9), 707-713 (2016).

Роль вторичной структуры геномного сегмента NS вируса гриппа А в его жизненном цикле

Барановская И. Л.^{1,2}, Петрова А. В.¹, Цветков В. Б.¹,
Клотченко С. А.¹, Васин А. В.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия

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

irina.baranovskaja.1992@gmail.com

Вирус гриппа А (ВГА), относящийся к семейству *Orthomyxoviridae*, ежегодно вызывает сезонные эпидемии, представляющие серьезную опасность для человечества. Геном ВГА представлен 8 сегментами однонитевой (-)-РНК, кодирующими до 18 белков [1]. Известно, что вторичная структура РНК может играть важную роль в стабильности молекулы РНК, сплайсинге и регуляции экспрессии вирусных и хозяйских генов [2]. Ранее нами и другими авторами были идентифицированы некоторые области генома ВГА, главным образом на (+)-нити вирусной РНК, обладающие консервативной вторичной структурой.

(+)-РНК геномного сегмента NS содержит, как минимум, 2 области со стабильной вторичной структурой. Данные участки соответствуют положениям 82-148 и 497-564 нуклеотидной последовательности сегмента NS и локализованы вблизи 5' и 3' сайтов сплайсинга гена NS1 [3]. При анализе данных последовательностей была определена консервативность вторичных структур у вирусных штаммов, относящихся к филогенетически родственным клэйдам, а также их хозяин-специфичность.

Кроме того, было проведено компьютерное моделирование с использованием молекулярно-динамических вычислений с целью выяснения возможных конформационных перестроек вторичных структур РНК при введении точечных мутаций, приводящих к исчезновению шпилечной структуры *in silico*.

Далее было замечено, что выявленные шпилечные структуры РНК соответствуют по длине и нуклеотидному составу предшественникам микроРНК. Ранее для ВГА не были найдены кодируемые им микроРНК, однако для целого ряда других, преимущественно ДНК-содержащих вирусов, такие микроРНК были обнаружены. Тот факт, что транскрипция генов ВГА происходит в ядре, а не цитоплазме, как для большинства РНК-содержащих вирусов, позволяет предположить существование микроРНК, кодируемых геномом ВГА.

Для проверки данной гипотезы методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) с использованием платформы MiSeq (Illumina) были получены профили экспрессии микроРНК в эпителиальных клетках человека линии A549, инфицированных рекомбинантными ВГА H5N1 дикого типа (wtNS) и с удаленным геном NS1 (Δ NS). С целью обнаружения

потенциальных вирусных микроРНК провели выравнивание полученных методом NGS прочтений на последовательность генома ВГА.

В дальнейшем для выяснения роли вторичной структуры РНК геномного сегмента NS ВГА в его жизненном цикле планируется методом «обратной генетики» получить штаммы с различной вторичной структурой в положениях 82-148 и 497-564 и охарактеризовать их вирулентность и патогенность *in vitro*.

1. Vasin A.V. et al. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus research*, 185, 53-63 (2014).
2. Priore S.F., Moss W.N., Turner D.H. Influenza B virus has global ordered RNA structure in (+) and (-) strands but relatively less stable predicted RNA folding free energy than allowed by the encoded protein sequence. *BMC research notes*, 6(1), 330 (2013).
3. Vasin A.V. et al. The influenza A virus NS genome segment displays lineage-specific patterns in predicted RNA secondary structure. *BMC research notes*, 9(1), 1 (2016).

ИК-спектроскопия растворов комплексов ДНК с *cis*- и *trans*-ДДП

Баталова А. А.¹, Поляничко А. М.¹, Травкина В. И.¹, Чихиржина Е. В.²

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

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

batalova.phys@gmail.com

Изучение механизмов воздействия противоопухолевых препаратов на ДНК является актуальной проблемой. Расширение знаний в этой области позволяет совершенствовать уже имеющиеся препараты, снижать их цитотоксичность, повышать эффективность, и накапливать данные для разработки новых лекарственных средств. В настоящее время основой комплексной терапии многих видов рака являются цисплатин и его аналоги.

В работе изучали взаимодействие ДНК с *cis*- и *trans*-изомерами дихлородиаминплатины (II) (ДДП) методом ИК спектроскопии в растворе. Исследования проводили в растворах D₂O и H₂O при молярном соотношении ДДП к нуклеотидам [Pt]/[P] в диапазоне от 1:1 до 150:1. Показано, что связывание ДДП приводит к изменению положения и интенсивности спектральных полос, соответствующих колебаниям связей C=N7, C=NH₂ и C6=O в составе гуанина. В случае комплексов *cis*-ДДП-ДНК также наблюдались изменения других полос: смещение полосы поглощения на 1643 см⁻¹, соответствующей колебаниям связей в кольце тимина и падение ее интенсивности с ростом концентрации платины, смещение полосы на 1698 см⁻¹ в сторону меньших волновых чисел, свидетельствующее об изменении частоты колебаний связи C2=O

в тимине. Показано, что связывание *cis*-ДПП сопровождается регистрируемым изменением геометрии сахаро-фосфатного остова, тогда как при связывании *trans*-ДПП соответствующих изменений ИК спектра зарегистрировано не было.

Часть исследований была выполнена с использованием оборудования ресурсных центров СПбГУ «Диагностика функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники» и «Оптические и лазерные методы исследования вещества» Научного Парка СПбГУ. Авторы признательны за финансовую поддержку своих исследований Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ 15-08-06876).

Выявление белков, специфично связывающихся с сайтом 2А дистального энхансера гена *Oct4*

*Бахмет Е. И.¹, Назаров И. Б.¹, Синенко С. А.¹, Артамонова Т. О.²,
Ходорковский М. А.², Томилин А. Н.¹*

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

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

e.bakhmet@incras.ru

В последнее десятилетие бурно развивается тема индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [1]. Как и эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), они могут дифференцироваться во все три зародышевых листка – энтодерму, мезодерму и эктодерму. При этом, ИПСК можно получить из уже дифференцированных клеток взрослого организма, в отличие от ЭСК, которые присутствуют только на ранних стадиях эмбриогенеза. Транскрипционный фактор *Oct4* является маркером как ИПСК, так и ЭСК, а также незаменим при индукции плюрипотентности [2, 3]. Ген *Oct4* подвержен тонкой регуляции – как повышение, так и понижение его экспрессии менее, чем на 50 %, ведет к дифференцировке плюрипотентных клеток [4]. Управление транскрипцией *Oct4* происходит через проксимальный промотор (ПП), проксимальный энхансер (ПЭ) и дистальный энхансер (ДЭ). Эти последовательности метилированы при выключенном *Oct4*, но во время его транскрипции являются мишенями для связывания с регуляторными белками. ДЭ, необходимый для работы *Oct4* во внутренней клеточной массе и в культивируемых ЭСК, содержит два ключевых элемента – сайт 2А и сайт 2Б. С последним связывается гетеродимер *Oct4-Sox2*, но остаются неизвестны белки, взаимодействующие с сайтом 2А (ССССТССССС)[5].

Наша работа заключается в идентификации таких белков и определении их значимости в регуляции экспрессии гена *Oct4*. С помощью методов гель-ретардации, аффинной хроматографии и масс-спектрометрии, нами было обнаружено, что *in vitro*, с последовательностью сайта 2A специфично связываются представители поли-С-связывающих белков (Poly(C)-binding proteins), такие как hnRNP-K, Pcbp1 и Pcbp2. В литературе подтверждается роль этих белков в регуляции транскрипции таких генов, как BRCA1 и μ -опиоидного рецептора [6].

На данный момент, мы работаем над подтверждением полученных результатов в экспериментах *in vivo*. С помощью методов иммунопреципитации хроматина (ChIP) и генного нокаута на основе системы CRISPR-Cas9 выявляется функциональная значимость перечисленных белков в работе *Oct4*. Также ведутся работы по влиянию их оверэкспрессии на функционирование ЭСК и индукцию плюрипотентности.

1. Takahashi K. and S. Yamanaka. Cell, 126(4), (2006).
2. Wu G. and H.R. Scholer. Cell Regeneration, 3(7), (2014).
3. Kim J.B. et al. Cell, 136(3), (2009).
4. Niwa H., J.-I. Miyazaki and A.G. Smith. Nat. Genet., 24(4), (2000).
5. Okumura-Nakanishi S. et al. J. Biol. Chem., 280(7), (2005).
6. Choi H.S. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 380(3), (2009).

Идентификация и исследование мицелиального гриба *Scytalidium sp.* (бывш. *Geotrichum candidum* 3C) – эффективного продуцента ферментов гемицеллюлазного комплекса

Энейская Е. В.¹, Павлов И. Ю.^{1, 2}, Полев Д. Е.³, Иванен Д. Р.¹,
Сумачева А. Д.^{1, 4}, Журшикина Е. В.¹, Бобров К. С.¹, Нарыжный С. Н.^{1, 5},
Згода В. Г.⁵, Швецова С. В.^{1, 2}, Кульминская А. А.^{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

³ Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий»,
Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(технический университет), Санкт-Петербург, Россия

⁵ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
им. В. Н. Ореховича, Москва, Россия

В 2014 году нами был опубликован черновик генома мицелиального гриба *G. candidum* 3C [1], являющегося эффективным продуцентов ферментов гемицеллюлазного комплекса [2], а также был начат комплекс

работ по поиску и исследованию ферментов, разлагающих растительную биомассу. Однако недавно появились сомнения в правильности идентификации таксономического положения данного гриба, т. к. были обнаружены множественные различия в его геноме и в аннотированном геноме *G. candidum* CLIB 918 (ATCC 204307; [3]). Исследование морфологии гриба показало наличие не только артроспор, типичных для грибов рода *Geotrichum*, но и аскоспор, и даже хламидоспор. Проведенный геномный анализ, основанный на всех доступных последовательностях маркера 18S SSU для класса *Leotiomycetes*, позволил предположить, что данный гриб следует относить к представителям рода *Scytalidium*, мицелиальных грибов класса *Leotiomycetes*.

Поиск и исследование ферментов гемицеллюлазного комплекса гриба *Scytalidium sp.* проводили методами биоинформатики и биохимии. В результате были найдены последовательности генов, кодирующих такие лигноцеллюлолитические ферменты как β -глюкозидазы (GH1), β -галактозидазы (GH2), β -N-ацетилглюкозаминидазы и мультифункциональные β -ксилозидазы (GH3); β -глюканазы и целлобиогидролаза (GH7); эндоксилазы (GH10, GH11); а также представители семейств GH15 (глюкоамилаза), GH16 (гиалуронидаза, эндо-глюканазы и эндо- β -галактоназа), и GH31 (α -глюкозидазы). Кроме того, обнаружены представители семейств вспомогательных ферментов (Auxiliary Activities): лакказы (сем. AA1), алкоголь-оксидазы и целлобиоздегидрогеназы (сем. AA3 и AA8). Анализ культуральной жидкости гриба *Scytalidium sp.* показал наличие 6 ферментов, гидролизующих как глюкоз-содержащие, так и ксилоз-содержащие субстраты. Анализ удельной активности обнаруженных ферментов, показал, что среди них есть пять бифункциональных гемицеллюлаз с преимущественно бета-ксилазной активностью и одна, мажорная, гемицеллюлаза, не сорбирующаяся на целлюлозе.

Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда, проект № 16-14-00109.

1. D.E. Poley, K.S. Bobrov, E.V. Eneyskaya and A.A. Kulminskaya. Draft Genome Sequence of *Geotrichum candidum* Strain 3C. *Genome Announc.*, 2(5), (2014).
2. A.S. Borisova *et al.* Sequencing, biochemical characterization, crystal structure and molecular dynamics of cellobiohydrolase Cel7A from *Geotrichum candidum* 3C. *FEBS J.*, 282(23), 4515–37 (2015).
3. G. Morel *et al.* Differential gene retention as an evolutionary mechanism to generate biodiversity and adaptation in yeasts. *Sci. Rep.*, 5, (2015).

Возможность использования магнитных наночастиц как средства адресной доставки лекарственных веществ

Богушевская В. Д.¹, Торопова Я. Г.², Королев Д. В.²

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

² Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

vdb-sky10.09.95@mail.ru

Одной из главных задач современной фармакологии является создание систем направленного транспорта лекарственных веществ. Такие системы помогут снизить токсический эффект лекарственных препаратов, оказываемый на весь организм в целом, а также повысить терапевтическую эффективность препаратов. С помощью системы адресной доставки лекарственных веществ можно пролонгировать действие лекарств и накапливать их в зоне интереса [1].

Задача адресной доставки лекарственных веществ может быть решена за счет использования различных видов наночастиц. В качестве носителей лекарственных препаратов могут использоваться как неорганические, так и органические наночастицы. Неорганические наноносители – частицы золота, серебра, оксидов железа, кремния, фуллерены, нанотрубки и другие. Носители органической природы более разнообразны и включают целые классы органических полимеров, белки, липосомы, дендримеры и даже вирусы. Наиболее широкое применение в медицине находят наночастицы на основе оксидов железа со структурой шпинели (магнетит, маггемит).

Цели:

- Исследование возможности использования магнитных наночастиц на основе оксидов железа в качестве системы адресной доставки лекарственных веществ.
- Изучение биосовместимости.
- Исследование биораспределения магнитных наночастиц.

Материалы и методы:

На сегодняшний день проводятся тестирования магнитных наночастиц на различных системах, таких как:

1. *In vitro*. Объект – культура клеток, клетки крови.
2. *Ex vivo*. Объект – изолированное сердце крысы, сосуды.
3. *In vivo*. Объект – крыса.

В работе использованы магнитные наночастицы (МНЧ) двух видов: наночастицы магнетита и наночастицы на основе диоксида кремния и оксида железа $Fe_mO_n-SiO_2$, полученные путем соосаждения (SiO_2 -coated IONPs) [2].

В условиях *in vitro* и *ex vivo* была установлена различная степень биосовместимости магнитных наночастиц, синтезированных различными способами. Наименьшей токсичностью обладали наночастицы магнетита. В высоких концентрациях все виды магнитных наночастиц обладали цитотоксическим эффектом.

1. Jain T.P., Morales M.A., Sahoo S.K. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol. Pharm.*, 2(3), 194–205 (2005).
2. Brinker C.J., Scherer G.W. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press. INC., Am Imprint of Elsevier, P. 908 (1990).

**Использование модифицированного хитозана,
содержащего четвертичные аминогруппы,
для невирусной доставки генетических конструкций**

Бондаренко А. Б.^{1, 2, 3}, Афанасьев М. В.², Петрова А. В.¹, Горшков А. Н.¹

¹ *Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия*

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

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

andrew.b.bondarenko@gmail.com

В последние десятилетия ведутся активные исследования невирусных систем доставки нуклеиновых кислот в клетки в связи с перспективами генной терапии. Одними из невирусных носителей, пригодных для доставки генетических конструкций в клетки, являются полимерные катионы. Они способны эффективно доставлять генетический материал в клетки, при этом обладая низкой цитотоксичностью и высокой биосовместимостью. К такому типу полимерных катионов относятся хитозан и его производные, формирующие электростатические комплексы с генетическими конструкциями (полианионами ДНК), конденсируя последние в компактные агрегаты.

В нашей работе проведено исследование физико-химических и биологических свойств комплексов, образованных модифицированным хитозаном (содержащим четвертичные аминогруппы) [1] и плазмидной ДНК рmaxGFP™ (Lonza, Швейцария).

Была показана способность модифицированного хитозана эффективно связываться и образовывать стабильные комплексы с плазмидной ДНК, защищающие ДНК от действия эндонуклеаз. Методом динамического рассеяния света было показано, что исследуемые комплексы модифицированного хитозана способны образовывать частицы размером не более 300 нм. С помощью просвечивающей электронной микроскопии была изучена морфология комплексов, образованных модифицированным хитозаном и ДНК. Установлено, что данные комплексы представляют собой частицы диаметром 100–300 нм, стремящиеся к округлой форме. Была показана низкая токсичность комплексов хитозан/ДНК и определена эффективность доставки плазмидной ДНК в клетки НЕК 293 (почки эмбриона человека) с использованием данных комплексов.

Наши данные свидетельствуют, что модифицированный четвертичными аминогруппами хитозан имеет высокий потенциал в качестве кандидата для доставки нуклеиновых кислот.

1. Kostina N.Y., Gorshkova M.Y., Izumrudov V.A. Water-soluble polyplexes of modified chitosan. Polymer Science Series A, 53(10), 947-954 (2011).

Анализ образования 30S инициаторного комплекса методами микротермофореза и дифференциальной сканирующей флуориметрии

Виноградова Д. С.^{1, 2}, Касацкий П. С.^{1, 2}, Pohl Milón³, Коневега А. Л.^{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*

³ *School of Medicine, Faculty of Health Sciences, Universidad Peruana de Ciencias
Aplicadas – UPC, Lima, Peru*

Ключевые слова: 30S инициаторный комплекс, микротермофорез, дифференциальная сканирующая флуориметрия.

Перевод генетической информации с матричной РНК (мРНК) в белки начинается с образования 30S инициаторного комплекса (30SIC). Во время инициации специализированная транспортная РНК (fMet-tRNA^{fMet}) связывается с инициаторным кодоном мРНК в Р-сайте 30S субъединицы рибосомы. Инициаторные факторы IF1, IF2, IF3 определяют точность и эффективность данного процесса.

В данной работе изучения образования инициаторного комплекса (30SIC) впервые был применен метод микротермофореза (МТФ), а также метод дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ) для анализа белковых инициаторных факторов и их комплексов с нуклеотидами. Метод МТФ позволяет измерять аффинности между макромолекулами, используя изменения подвижности молекул в микроскопических градиентах температуры. При образовании комплекса изменяется размер, заряд и степень гидратирования макромолекул. МТФ показывает зависимость образования 30SIC от всех лигандов, а также выделяет ключевую роль ГТФ в селекции fMet-tRNA^{fMet}. Аффинность инициаторного фактора IF2 к инициаторной тРНК в присутствии GTP и GDP, измеренная методом МТФ, $K_D \approx 11 \mu\text{M}$ и $K_D \approx 16 \mu\text{M}$ соответственно. Мы рассматриваем новое применение метода МТФ для изучения биосинтеза белка. Кроме того, данная технология может быть использована для селекции новых ингибиторов инициации трансляции (потенциальных антибиотиков), действующих на образование 30SIC.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-34-00023.

Развитие методов *in meso* кристаллизации мембранных белков

*Власов А. В.¹, Суслов Д. А.¹, Рижиков Ю. Л.¹,
Горделий В. И.^{1, 2, 3}, Куклин А. И.^{1, 4}*

¹ *Московский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Россия*

² *Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, Université Grenoble Alpes-CEA-CNRS,
Grenoble, France*

³ *Institute of Complex Systems: Structural Biochemistry (ICS-6),
Research Centre Jülich, Jülich, Germany*

⁴ *Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия*

vavplanet@mail.ru

В настоящее время кристаллизация мембранных белков развивается стремительными темпами. Особенно актуальной является задача кристаллизации больших мембранных белков и белковых комплексов. Это необходимо для поиска новых препаратов для лечения широкого спектра заболеваний, связанных с нарушением функционирования мембранных белков, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона, и другие [1, 2].

В данной работе представлены результаты исследований геометрических свойств липидных кубических фаз. Вычислено и визуализировано распределение значений гауссовой кривизны в каждой точке срединной поверхности для решеток липидных кубических фаз со следующими (наиболее распространенными) типами симметрии: $Pn3m$, $Ia3d$ и $Im3m$. Визуализированы сети непересекающихся водных каналов для данных типов симметрий.

В результате визуализации показано наличие каналов свободной диффузии мембранных белков в липидных кубических фазах, и сделаны предположения о кинетике кристаллообразования и кристаллизационных процессов мембранных белков. Результаты работы являются дополнением к работам по моделированию липидных кубических фаз [3, 4]. Сходства и различия гипотез, выдвинутых на основании полученных результатов, с литературными данными обсуждаются.

1. D.J. Selkoe. Toward a Comprehensive Theory for Alzheimer's Disease. Hypothesis: Alzheimer's Disease Is Caused by the Cerebral Accumulation and Cytotoxicity of Amyloid β -Protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 924(1), 17–25 (2006).
2. C. Haass and D.J. Selkoe. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(2), 101–12, (2007).
3. N. Johner, S. Mondal, G. Morra, M. Caffrey, H. Weinstein and G. Khelashvili. Protein and lipid interactions driving molecular mechanisms of *in meso* crystallization. *J. Am. Chem. Soc.* 136(8), 3271–84, (2014).
4. G. Khelashvili, P.B.C. Albornoz, N. Johner, S. Mondal, M. Caffrey and H. Weinstein. Why GPCRs behave differently in cubic and lamellar lipidic mesophases. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(38), 15858–68 (2012).

Идентификация хромосом на стадии ламповых щеток в кариотипе зебровой амадины *Taeniopygia guttata*

Володькина В. А., Сайфитдинова А. Ф., Галкина С. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
leravolo94@gmail.com

Зебровая амадина (*Taeniopygia guttata*), певчая птица из семейства вьюрковых ткачиков (Aves, Passeriformes, Estrildidae), – важный модельный объект нейробиологии. Ее кариотип ($2n = 80$) хорошо изучен, а геном секвенирован в 2010 году [1]. В ходе сравнительных цитогенетических исследований было показано, что кариотипы курицы и амадины различаются двумя межхромосомными (центрические разделения) и 114 внутрихромосомными (инверсии и транслокации) перестройками [2]. Кроме того, в хромосомном наборе ооцитов *T. guttata* обязательно присутствует добавочная хромосома, названная germline-restricted chromosome (GRC) [3]. Активная транскрипция различных последовательностей на стадии диплотены профазы I мейоза в растущих ооцитах птиц приводит к тому, что хромосомы значительно увеличиваются в размерах, приобретают отличительную хромомеро-петлевою структуру и превращаются в гигантские хромосомы типа ламповых щеток (ЛЩ).

С целью изучения спектра последовательностей, важных для созревания женских половых клеток, мы идентифицировали хромосомы на стадии ЛЩ в кариотипе зебровой амадины.

Для этого микрохирургическим способом были приготовлены препараты хромосом ЛЩ и проведена флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). В качестве зондов были использованы GRC-специфичный зонд TRAP5, а также искусственные бактериальные хромосомы (BAC-клоны) из библиотеки университета г. Вагенингена (WAG), содержащие консервативные фрагменты генома курицы и работающие на хромосомах курицы и перепела.

Мы показали, что в хромосомном наборе растущих ооцитов *T. guttata* самым крупным является бивалент GRC. На стадии ЛЩ длины хромосомы 1 (TGU1) и полового бивалента ZW оказались одинаковыми и составили 45 мкм. Для идентифицированных хромосом были определены количество хиазм и центромерные индексы, а также признаки, характерные для каждой из хромосом и способствующие их узнаванию. Для каждой хромосомы были построены цитогенетические карты высокого разрешения.

Работа поддержана РЦ «ЦКП Хромас» СПбГУ, РФФИ 15-04-05684.

1. Warren W.C., Clayton D.F. et al. Nature, 464, 757-762 (2010).
2. Völker M., Backström N. et al. Genome Res., 20, 503–511 (2010).
3. M.I. Pigozzi, A.J. Solari. Chrom. Res., 6, 2 (1998).

Влияние молекулярного краудинга на структурные свойства и процесс полимеризации актина

Гагарская Ю. А.^{1, 2}, Поварова О. И.¹, Кузнецова И. М.¹, Туроверов К. К.^{1, 2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

julgag@yandex.ru

Внутри клетки практически нет свободного объема – внутриклеточное пространство почти полностью заполнено макромолекулами, количество несвязанной воды невелико. Такие условия принято называть условиями молекулярного краудинга. В последнее время появляется все больше работ, в которых авторы пытаются в экспериментах *in vitro* имитировать условия, в которых макромолекулы функционируют внутри клетки, т. е. создать *in vitro* условия молекулярного краудинга. Для этого используют краудинг агенты – концентрированные растворы «инертных» полимеров, различного молекулярного веса [1, 2]. Было показано, что присутствие краудинг агентов может оказывать значительное влияние на конформационную стабильность и структурные свойства целевых биологических макромолекул. Было также показано, что макромолекулярный краудинг может оказывать влияние на различные равновесные биологические процессы, такие как, сворачивание белка, связывание белками малых молекул, ферментативные реакции, белок-белковые взаимодействия, агрегацию неправильно свернутых белков и образование амилоидных фибрилл.

Целью настоящей работы было изучение влияния ряда краудинг агентов с различными гидродинамическими размерами на структурные свойства актина и определение влияния молекулярного краудинга на процесс полимеризации актина. Оказалось, что эффективность влияния макромолекулярного краудинга на свойства актина в глобулярном и фибриллярном состояниях коррелирует с соотношением между гидродинамическими радиусами краудинг агента и исследуемого белка. Наиболее сильный эффект наблюдался в случае, когда гидродинамические радиусы краудинг агента и актина имеют близкие значения. Было показано, что краудинг агенты оказывают влияние на скорость полимеризации актина. Нами было выдвинуто предположение, о том, что некоторые краудинг агенты могут стимулировать полимеризацию актина даже при низкой ионной силе раствора.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00131)

1. Kuznetsova I.M., Zaslavsky B.Y. et al. *Molecules*, 20, 1 (2015).

2. Eronina T.B., Chebotareva N.A. et al. *Biopolymers*, 101, 5 (2014).

Роль гипоксии в индукции репаративных свойств стволовых клеток сердца

Докин П. М., Малашичева А. Б.

*Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия*

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

docshin74@icloud.com

Восстановление сократительной функции сердца и регенерация миокарда после ишемического повреждения являются актуальными вопросами современной регенеративной медицины и клеточной биологии. Традиционно считали, что в постнатальном периоде возможности репарации сердца сильно ограничены или отсутствуют [1]. Однако недавно были описаны стволовые клетки сердца (СКС), способные к кардиогенной дифференцировке, и в настоящее время регенеративный потенциал этих клеток активно изучают. Было показано, что гипоксическое воздействие на СКС приводит к повышению их способности восстанавливать миокард после инфаркта [2]. Целью данной работы было получить СКС непосредственно из зоны инфаркта миокарда, сравнить их с СКС, полученными из участка здорового миокарда, по функциональным свойствам – скорости роста, способности к миграции и дифференцировке.

Развитие инфаркта миокарда передней стенки правого желудочка сердца у крыс линии Вистар индуцировали перевязкой коронарной артерии. Через 3 дня из ишемизированного участка получали СКС путем ферментативной диссоциации ткани; в качестве контроля использовали участок здорового миокарда. Полученные линии клеток фенотипировали методом проточной цитометрии. Скорость пролиферации оценивали методом построения кривых роста. Скорость миграции оценивали методом нанесения царапины на монослой клеток. Клетки дифференцировали в кардиогенном, адипогенном и остеогенном направлениях путем добавления в среду культивирования специфических индукторов. Оценка степени дифференцировки проводили методом количественной ПЦР на специфические маркеры дифференцировки, а также окрашивали дифференцированные клетки иммуноцитохимическим методом на специфические маркеры.

СКС, полученные из ишемизированных участков миокарда, обладали более высоким пролиферативным потенциалом по сравнению с СКС, выделенными из участков нормального миокарда; скорость миграции и способность к дифференцировке в исследованных направлениях была выше у клеток, происходящих из ишемизированных участков по сравнению с клетками нормального миокарда.

Таким образом, ишемическое воздействие на миокард при инфаркте приводит к активации внутреннего регенеративного потенциала СКС *in vivo*. Запланированы дальнейшие исследования этого феномена.

1. Anversa P., Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ. Res.*, 83, 1-14 (1998).
2. Nakada Y., Canseco D.C. et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature* (2016).

Структурные особенности фрагмента белка NS1 вируса гриппа

Егоров В. В.^{1, 2}, *Ягудина Я. А.*¹, *Шалджян А. А.*¹, *Лебедев Д. В.*²,
*Горшков А. Н.*¹, *Куклин А. И.*^{3, 4}, *Киселев О. И.*¹

¹ Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

⁴ Московский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Россия

zabryaka@yandex.ru

В ходе экспериментов по изучению биологической активности белка NS1 вируса гриппа было обнаружено, что один из пептидов, соответствующий по первичной структуре фрагменту белка NS1 способен к олигомеризации и образованию нерастворимых агрегатов.

С помощью электронной и атомно-силовой микроскопии, а также с помощью малоуглового рассеяния нейтронов было показано, что агрегаты состоят из фибрилл. Способность фибриллярных агрегатов к изменению спектральных характеристик специфических красителей Конго красный и тиофлавин Т позволяют говорить об их амилоидоподобной природе.

Одной из функционально значимых особенностей амилоидоподобных фибрилл является способность вызывать конформационные переходы белков, содержащих области гомологии с фибриллогенным. При этом индукция передачи конформации происходит лавинообразно, так как белок с индуцированным изменением конформации сам выступает в качестве индуктора. Реализация такого механизма, характерного для так называемых «функциональных амилоидов», приводит к амплификации передачи сигнала о взаимодействии, вызвавшего конформационный переход.

Обнаруженная способность фрагмента белка NS1 к фибриллогенезу может привести к возможности рекрутинга клеточных факторов противо-

вирусного ответа и инактивации данной системы и таким образом играть важную роль в увеличении патогенности вируса гриппа.

В ходе дальнейших исследований планируется изучить роль олигомеров NS1 и пептида из NS1 в патологическом процессе на клеточных моделях.

Анализ экспрессии мРНК изоформ С-лектина DC-SIGN в дендритных клетках человека при инфекции вирусами гриппа А

Комиссаров А. Б., Егорова А. А., Грудинин М. П.

Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия

anna.egorova@influenza.spb.ru, andrey.komissarov@influenza.spb.ru

Многие вирусы (ВИЧ 1 и 2, вирус Эбола, вирус лихорадки Денге, вирус гепатита С), несущие на поверхности высокогликозилированные белки, способны использовать в качестве рецепторов Са-зависимые лектины, в частности С-лектин II типа DC-SIGN [1]. Для вирусов гриппа А показана способность инфицировать клетки, экспрессирующие DC-SIGN. Данная способность зависит от степени гликозилирования гемагглютинина (НА) и сохраняется даже при нарушении его рецептор-связывающего сайта [2]. В ходе эволюции вируса гриппа А (H3N2) рецептор-связывающая способность НА снижается, однако наблюдается накопление потенциальных сайтов N-гликозилирования, приобретение или потеря которых может существенно влиять на способность НА связываться с рецептором на поверхности клетки, антигенные свойства и патогенность вирусов гриппа.

DC-SIGN – рецептор адгезии дендритных клеток неинтегриновой природы экспрессируется в дендритных клетках, моноцитах, альвеолярных макрофагах, эндотелиальных клетках печени, лимфатических узлах и др. Существует 13 изоформ DC-SIGN, которые можно разделить на два типа: трансмембранные и секретлируемые [3]. Функциональная роль различных изоформ DC-SIGN в патогенезе гриппозной инфекции остается противоречивой и малоизученной.

Целью работы была разработка системы праймеров для анализа экспрессии мРНК изоформ лектина DC-SIGN методом ПЦР в реальном времени и анализ их экспрессии в дендритных клетках человека при инфекции вирусами гриппа А.

Нами была разработана система праймеров для анализа экспрессии мРНК различных изоформ DC-SIGN методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I. Данная

система позволяет различить мембранные и растворимые, а также А и В типы изоформ DC-SIGN.

Анализ экспрессии мРНК изоформ DC-SIGN оценивали до заражения и по истечении 24 часов после заражения дендритных клеток человека вирусами гриппа А подтипа H3N2. Анализ данных с помощью программного пакета qBase+ [4] показал снижение уровня экспрессии мРНК трансмембранных изоформ DC-SIGN при инфекции дендритных клеток вирусами гриппа А в 50 раз.

1. S.L Londrigan, M.D. Tate, A.G. Brooks et al. Cell-surface receptors on macrophages and dendritic cells for attachment and entry of influenza virus. *J. Leukoc. Biol.*, 92, 97-106 (2012).
2. M.L.B. Hillaire, H.P. Haagsman, A.D.M.E. Osterhaus et al. Pulmonary surfactant protein D in first-line innate defence against influenza A virus infections. *J. Innate Immun.*, 5, 197–208 (2013).
3. S. Mummidi, G. Catano, L.A. Lam et al. Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. *J. Biol. Chem.*, 267(35), 33196–212 (2001).
4. J. Hellemans, G. Mortier, A. De Paepe et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.*, 8, R19 (2007).

Экспрессия генов нейротрансмиссии в лимфоцитах крови как предиктор эффективности и безопасности терапии антипсихотическими препаратами второго поколения

*Заботина А. М.^{1, 2}, Грунина М. Н.¹, Насырова Р. Ф.³, Сосин Д. Н.³,
Сосина К. А.³, Ершов Е. Е.⁴, Крупицкий Е. М.^{3, 2},
Пчелина С. Н.^{1, 2}, Тараскина А. Е.^{1, 2, 3}*

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 *Санкт-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический
институт им. В. М. Бехтерева, Санкт-Петербург, Россия*

⁴ *Санкт-Петербургская городская психиатрическая больница № 1
им. П. П. Кащенко, с. Никольское, Ленинградская обл., Россия*

a.zabotina@gmail.com

Введение. Антипсихотики второй генерации, «атипичные», являются одними из наиболее эффективных терапевтических препаратов для стабилизации различных симптомов расстройств шизофренического спектра. Однако следует отметить, что прием атипичных антипсихотиков нередко сопровождается клинически значимым увеличением массы тела / ожирением, которое может приводить к дальнейшим осложнениям, таким как инсулин резистентность, диабет, дисфункции липидного метаболизма, сердечнососудистые патологии.

Цель исследования. Определение роли показателей нейротрансмиссии лимфоцитов периферической крови пациентов с расстройствами шизофренического спектра в феномене антипсихотик-индуцированного увеличения веса на примере оланзапина и эффективности терапии. Исходя из поставленной цели планировалось решение следующих задач: определение количества белка гистаминового H1, серотонинового 5-HT_{2A}, дофаминового рецептора 2 типа и анализ экспрессии генов *HRH1*, *5HT2A*, *ADRA1B*, *DRD2* и *DRD4*, кодирующие рецепторы, аффинные к оланзапину.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были взяты лимфоциты периферической крови (ЛПК), так как определено доказано, что ЛПК являются суррогатными маркерами для изучения дисфункций нейротрансмиссии при психоневрологических патологиях, а также для мониторинга фармакологических последствий. В исследование было включено 57 пациентов в возрасте от 18 до 53 лет с первично поставленным диагнозом расстройство шизофренического спектра (F2 МКБ-10). Путем рандомизации пациенты были отнесены к одной из двух групп терапии: оланзапин (n = 29) и галоперидолом (типичный антипсихотик) (n = 28) (группа сравнения). Уровень мРНК изучаемых генов определялся методом real-time PCR с использованием зонда TaqMan. Количество белка

исследуемых рецепторов было определено в 20 мг общей белковой фракции иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов ELISA kit (Cloud-Clone Corp, USA). Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы SPSS 21.

Результаты. Было показано, что антипсихотик-индуцированное увеличение массы тела (более 7 % от исходного веса) достоверно ассоциируется с пониженным уровнем экспрессии генов *HRH1*, *ADRA1B*, *DRD2* и *DRD4*, и на уровне тенденции с *5HTR2A*. Уровень мРНК всех генов, включенных в исследование, положительно линейно коррелировал ($p < 0,01$), отмечалась ко-экспрессия генов, которая сохранялась при воздействии антипсихотических препаратов. Для показателей количества белка достоверных различий не наблюдалось.

Выводы. Антипсихотик-индуцированное увеличение массы тела сопровождается пониженной экспрессией генов нейротрансмиссии на ЛПК, что должно учитываться при назначении больному антипсихотической терапии, особенно препаратов второй генерации.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда № 14-15-00904.

Изменения биофизических характеристик при миссенс-мутациях в гене *SCN5A*, ассоциированных с синдромом Бругада

Зайцева А. К.¹, Карпушев А. В.²

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

² Институт молекулярной биологии и генетики СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова,
Санкт-Петербург, Россия

zaytseva.anastasia.zak@gmail.com

Синдром Бругада – тяжелое редкое наследственное аритмогенное заболевание, для которого характерен высокий риск смерти от внезапной остановки сердца во время сна. По разным оценкам от 20 до 25 % случаев данной патологии ассоциировано с мутациями в гене *SCN5A*, кодирующем альфа-субъединицу Nav1.5. Изоформа потенциал-зависимых натриевых каналов Nav1.5 ответственна за фазу деполяризации потенциала действия кардиомиоцитов и играет ключевую роль в генерации сердечного ритма. На текущий момент идентифицировано более 300 мутаций *SCN5A*, способных приводить к манифестации синдрома Бругада.

Цель данной работы – характеристика биофизических свойств мутантных форм канала Nav1.5. Был выполнен сайт-специфический мутагенез гена *SCN5A* методом ПЦР-амплификации для получения мутантных форм канала и последующей экспрессии в гетерологической системе клеточной линии СНО. Регистрация натриевых токов осуществлялась методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в отведении со всей клетки (конфигурация whole-cell). Полученные значения силы тока были нормированы на емкость клетки.

Нами был выбран ряд мутаций R376H, F543L и N1463Y, обнаруженный у пациентов с синдромом Бругада. Во всех случаях заболевание связано с уменьшением активности каналов Nav1.5 (loss-of-function phenotype). Эти изменения могут варьировать от небольших сдвигов кривых стационарной активации и инактивации до полной потери каналом функциональной активности. Например, в результате серии экспериментов было установлено, что при мутации N1463Y наблюдается полное отсутствие тока. Предположительно, данная мутация приводит к нарушению междоменных взаимодействий внутри белка, необходимых для стабилизации трехмерной структуры ионного канала.

Таким образом, анализ функциональных характеристик мутантных форм канала является ключевым источником информации о структурно-функциональной роли конкретных аминокислотных остатков в нативном белке. Также исследование электрофизиологических параметров каналов – мощный инструмент для определения направлений поиска подходящих фармакологических агентов для терапии данной патологии сердечно-сосудистой системы.

Экспериментальная модель исследования механизмов патологического замещения мышечной ткани на жировую с использованием линии миобластов C2C12

Иванова О. А.¹, Дмитриева Р. И.²

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

² Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

astroksana@gmail.com

Введение. Выявление молекулярных механизмов замещения функциональной мышечной ткани на жировую является нерешенной проблемой медицины. Скелетные мышцы обладают потенциалом к регенерации благодаря наличию взрослых стволовых клеток миосателлитов. Нарушения механизмов регенерации мышечной ткани могут приводить к ее деградации и замещению на жировую при нейрогенной мышечной атрофии, мышечной дистрофии Дюшена, ожирении, диабете второго типа. Молекулярные механизмы замещения мышечной ткани на жировую до конца не изучены, а доступные клеточные модели не воспроизводят *in vitro* реальную картину развития патологии. Классической моделью исследования механизмов мышечной дифференцировки *in vitro* является линия мышечных миобластов C2C12, клетки этой линии были использованы в нашей работе.

Методы. Стимуляцию жировой и мышечной дифференцировки в культуре миобластов C2C12 проводили с использованием стимулирующего коктейля и сывороточного голодания, соответственно. На шестой день после стимуляции клетки фиксировали для окраски и собирали для выделения РНК. Для иммуноцитохимического окрашивания использовали антитела к МНС и десмину. Формирование адипоцитов оценивали с использованием окрашивания OilRedO. Экспрессию маркеров мио- и адипогенеза определяли с использованием Q-PCR. В качестве контроля использовали нестимулированную культуру C2C12.

Результаты. На шестой день после запуска дифференцировки наблюдали активное формирование миотрубок или жировых капель. Экспрессия маркера миобластов Myf5 во всех образцах оставалась на одном уровне. Формирование миотрубок сопровождалось 20-кратным ростом экспрессии регулятора миогенеза MyoG, при этом экспрессия транспортера жирных кислот FABP4 снижалась более чем в 10 раз по сравнению с контрольными образцами. Стимуляция адипогенеза сопровождалась повышением экспрессии FABP4 и LPL более чем в три раза, при этом наблюдался значительный рост экспрессии маркеров миогенеза, в том числе MyoG.

Заключение. Мы показали, что механизмы патологического замещения мышечной ткани на жировую можно исследовать *in vitro* с использованием линии миобластов C2C12.

Обработка антиоксидантами вызывает генотоксический стресс эмбриональных стволовых клеток человека

Иванова Ю. С.^{1,2}, Люблинская О. Г.¹, Пуговкина Н. А.¹, Кожухарова И. В.¹, Ковалева З. В.¹, Никольский Н. Н.¹

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

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

yuliya.s.ivanova@yandex.ru

Антиоксиданты, понижающие внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК), массово используются в клинической практике для профилактики множества заболеваний. Однако детальное изучение влияния антиоксидантного действия на регуляцию многих внутриклеточных процессов началось сравнительно недавно. Для дифференцированных [1], а также для тканеспецифических стволовых клеток [2, 3] было показано, что обработка высокими дозами антиоксидантов вызывает блокирование клеточного цикла, приводя к нарушению АФК-зависимой регуляции пролиферации. Однако, влияние антиоксидантов на пролиферацию эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) еще не изучено.

Поддержание целостности генома является важным для судьбы любых клеток. Для эмбриональных стволовых клеток этот фактор является критическим, поскольку нарушения в структуре ДНК может передаваться всем дифференцированным клеткам-потомкам и негативно влиять на развитие нового организма. В связи с этим, целью данной работы было исследовать влияние антиоксидантов (ресвератрол и Темпол) на динамику клеточного цикла ЭСК, а также проверить, не вызывают ли антиоксиданты нарушения в структуре генетического материала клеток. В ходе выполнения работы установлено, что обработка высокими дозами антиоксидантов вызывает эффект замедленного протекания фазы синтеза ДНК и дозозависимое блокирование перехода в G2/M фазу клеточного цикла ЭСК. Кроме того, под действием обоих антиоксидантов обнаружено возникновение двунитевых разрывов ДНК, превышающих норму интактных клеток. Таким образом, действие антиоксидантов приводит к нарушению пролиферации ЭСК и индукции генотоксического стресса.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-50-00068.

1. Havens et al. Mol. Cell Biol., 26(4701), (2006).
2. Paul et al. Cell Stem Cell, 15(199), (2014).
3. Jang Y.Y. and Sharkis S.J. Blood, 110(3056), (2007).

Влияние сверхэкспрессии различных форм белка CHD1 на транскрипцию генов в слюнных железах *Dr. melanogaster*

Ильина Ю. А., Конев А. Ю.

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

poltoradnya@inbox.ru

Сверхэкспрессия нативной и каталитически неактивной форм белка CHD1 вызывает сильную деформацию политенных хромосом слюнных желез дрозофилы. Деформация обусловлена нарушением структуры хроматина: появлением *de novo* участков декомпактизированных участков хромосом, а также одновременным присутствием в хромосомах пухов, в норме характерных для различных сменяющих друг друга пуховых стадий. Цель данной работы – изучение связи между влиянием экспрессии трансгенов, кодирующих различные формы белка CHD1, на транскрипцию генов в слюнных железах и на изменение структуры тех участков хромосом, где они локализуются.

В качестве контрольных использовали гены *Actin42A* и *U6* (малая ядерная РНК), экспрессия которых в исследуемых мутантах соответствовала линии дикого типа. Проанализировав экспрессию *Sgs*-генов, кодирующих белки секрета слюнных желез (*Sgs3*, *Sgs4* и *Sgs5* – цитологические районы 68С, 3С и 90В, соответственно), у личинок линии дикого типа мы получили данные, соответствующие описанным в литературе – экспрессия от экстремально высоких значений на 5-6 пуховой стадии снижается до минимальных к 10-й стадии, соответствующей нуль-часовой предкуколке. Совершенно неожиданно транскрипция *Sgs*-генов при повышенной экспрессии обеих форм белка CHD1 на 5-6 стадии была резко снижена, а на стадии предкуколки отмечен некоторый рост экспрессии. Для прояснения картины изучили транскрипцию других генов из района 3С: *ng2* и *Pig1*, также сильно экспрессирующихся на 5-6 стадии и «молчащих» у предкуколки. У мутанта со сверхэкспрессией CHD1 дикого типа уровень транскрипции генов *new glue* (*ng*), несколько снижен по сравнению с линией дикого типа, а при экспрессии доминант-негативного мутанта произошло резкое (в 7 раз) увеличение транскрипционной активности и на 5-6 и на 10-й пуховой стадиях. В случае с геном *Pig1* изменения профилей транскрипции были в целом аналогичны дикому типу, но у особей, гиперэкспрессирующих мутантную форму CHD1 на стадии личинки, происходит 5-кратное снижение экспрессии *Pig1*. Следовательно, влияние экспрессии различных форм CHD1 на транскрипцию носит ген-специфический характер и зависит от того, является ли этот белок активным или нет.

Исследование микроструктуры биосенсоров на основе пористых частиц карбоната кальция, модифицированных наночастицами серебра, методами электронной микроскопии

*Камышинский Р. А.¹, Михуткин А. А.¹, Чесноков Ю. М.¹,
Парахонский Б. В.^{2,3}, Марченко И. В.^{1,2}, Букреева Т. В.^{1,2}, Васильев А. Л.^{1,2}*

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

² *Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова РАН, Москва, Россия*

³ *Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, Россия*

terra.tartarara@gmail.com

В качестве сенсорной платформы для биологических систем предложено использовать биосовместимые пористые неорганические частицы, модифицированные биополиэлектролитами и наночастицами Ag, подобные исследованным в [1]. Модификация наночастицами позволяет получить гигантское комбинационное рассеяние (ГКР) света от одиночных молекул, находящихся на расстоянии нескольких нанометров от так называемых горячих точек, образованных агрегатами наночастиц серебра, и таким образом создать биосенсор на основе ГКР платформы. Прохождение разработанных систем через клеточную мембрану за счет модификации поверхности пористых частиц или за счет варьирования их формы и, как следствие, их проникновение в клетку обеспечит уникальную возможность исследования внутриклеточных процессов, включая изучение метаболизма в клетках в условиях различных внешних воздействий.

Различными методами электронной микроскопии – растровой (РЭМ), просвечивающей (ПЭМ) и просвечивающей растровой (ПРЭМ), исследована микроструктура сферических и эллиптических пористых частиц CaCO₃, модифицированных наночастицами Ag. Установлено, что размеры CaCO₃-носителей лежат в пределах 0,9–3,7 мкм. Наночастицы Ag округлые, со средним размером 30 нм и наименьшей концентрацией в центре образца.

Для более детального изучения распределения наночастиц Ag в носителе применялся метод электронной томографии. Трехмерная модель исследуемого объекта, восстановленная после обработки серии изображений, полученных под различными углами в ПРЭМ, позволила визуализировать картину пространственного распределения наночастиц. Сегментирование наночастиц Ag дало возможность получить численные характеристики их морфологии, пространственного и размерного распределений.

1. Lyubutin I.S., Starchikov S.S., Bukreeva T.V. et al. Materials Science and Engineering C. 45, 225-233 (2014).

Разнообразие бактерий в пелагической и придонной зонах пресноводного антарктического озера Радок (оазис Эймери)

Карлов Д. С.¹, Чувочина М. С.², Мари Д.³, Сумбатян Д. А.¹,
Алехина И. А.⁴, Булат С. А.¹

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

² Университет Квинсленда, Брисбан, Австралия

³ Биологическая станция Национального центра научных исследований,
Роскофф, Франция

⁴ Арктический и антарктический научно-исследовательский институт,
Санкт-Петербург, Россия

makondo07@gmail.com

Озерные экосистемы в Антарктиде являются уникальными объектами, представляющие из себя природные лаборатории для проведения фундаментальных исследований в области изучения связи между климатом, эволюционными процессами и молекулярной адаптацией микроорганизмов к экстремальным условиям существования.

С целью изучения разнообразия микробного сообщества пресноводного оз. Радок были отобраны 5 образцов воды, взятых из 4-х горизонтов водного столба оз. Радок (глубина 1,3, 100, 200 и 367 м), а также исток реки Межозерная (глубина 2 м). Идентификацию членов сообщества проводили путем секвенирования амплифицированных в ПЦР 3-х областей генов 16S рРНК: v3-v5, v4-v8 и полноразмерный ген.

В результате анализа 12 клоновых библиотек было выявлено 40 филотипов (20 доминантных), принадлежащих 5 филумам бактерий: *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (α , β - и δ), *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *OD1*, *Verrucomicrobia*, а также 4-м отделам эукариот: *Dictyochophyceae*, *Xanthophyta*, *Chrysophyceae* и *Viridiplantae*. Из них 33 филотипа показали ≤ 98 % сходства с ближайшими видами в мировой базе данных GenBank и, тем самым, были отнесены к новым неизвестным видам микроорганизмов, тогда как 14 филотипов, показавших ≤ 90 % сходства, остались неидентифицированными. Численно из бактерий преобладали представители актинобактерий. Из них во всех 4-х горизонтах преобладала группа из 3 филотипов, родственных “*Candidatus*” *Planktophila limnetica*. Из эукариот – *Pedimonos minor* (*Viridiplantae*).

Сравнение микробного разнообразия, выявленного на основе двух областей (v3-v5 и v4-v8) гена 16S рРНК, показало существенное различие, как на уровне филумов, так и на уровне филотипов. Например, только по области v3-v5 были выявлены филум *OD1* и класс δ -*proteobacteria*, тогда как по области v4-v8 филум *Planctomycetes*, класс β -*proteobacteria* и мтДНК страменопиллов. Это указывает на недостаточность использования для характеристики микробного разнообразия только одной области гена 16S рРНК, амплифицированной с любыми из известных универсальных праймеров.

Экспрессия генов, кодирующих белки саркомера, при гипертрофии миокарда в модели коарктации аорты

Князева А. А.¹, Смолина Н. А.², Костарева А. А.²

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

² *Институт молекулярной биологии и генетики СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова,
Санкт-Петербург, Россия*

knyazeva.aa26@gmail.com

Патологическая гипертрофия миокарда является необратимым процессом утолщения стенок желудочков за счет увеличения размеров кардиомиоцитов, развивается при таких нарушениях сердечно-сосудистой системы, как аортальный стеноз или гипертензия, и сопровождается неадаптивным изменением гемодинамических и биохимических параметров организма. Ключевым посредником восприятия внешних механических стимулов является элемент саркомера – Z-диск, связанные с ним белки отвечают за поддержание сократительного аппарата клетки, а также вовлечены в различные сигнальные взаимодействия.

В представленной работе был проведен анализ экспрессии генов, кодирующих белки Z-диска в миокарде, при реализации экспериментальной модели коарктации аорты в зависимости от длительности приложенной нагрузки. Крысам-самцам линии Вистар в возрасте 8 недель были выполнены операции по перевязке дуги аорты, животные были разделены на группы в соответствии с периодом действия модели – 1, 2, 8 и 10 недель, а также на контрольные группы – интактные и ложноперирированные животные. После выделения РНК из всех частей миокарда (правый и левый желудочки, межжелудочковая перегородка) и обратной транскрипции оценивали экспрессию генов *Nppa* (маркер гипертрофии), *Actn2* (структурный белок), *Fhl1* (сигнальный белок) методом ПЦР в режиме реального времени с гидролизной пробой.

Результаты показали, что отношение массы миокарда к массе тела увеличивается в группе 10 недель по сравнению с контрольной группой, экспрессия гена-маркера гипертрофии *Nppa* возрастает в группах 8, 10 недель во всех частях миокарда, что указывает на постепенное установление гипертрофического процесса к поздним срокам. В левом желудочке, первостепенно отвечающем на перегрузку данного типа, показано снижение экспрессии генов *Actn2* и *Fhl1* на ранних сроках (1, 2 недели) с последующим возрастанием до контрольных значений. Соответствующие мышечно-специфические белки ACTN2 и FHL1 отвечают соответственно за организацию саркомера и передачу сигнала в нем. Таким образом, измененный профиль экспрессии генов может свидетельствовать о проявлении адаптационного процесса при гипертрофических стимулах на уровне как структурных, так и сигнальных свойств белков.

Лучевая терапия опухолей глиомы человека в Сибирском центре синхротронного и терагерцового излучения

Козырев Е. А.^{1, 2}, Купер К. Э.¹, Мошкин М. П.³

¹ *Институт ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

³ *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

e.a.kozyrev@inp.nsk.su

Лидирующее место в структуре нейроонкологических заболеваний занимают глиобластомы – нейроэктодермальные опухоли головного мозга человека, заболеваемость которыми с каждым годом продолжает расти. Микроручковое синхротронное излучение является одним из самых перспективных направлений в современной лучевой терапии. Для проведения испытаний по микроручковой томографии, в рамках настоящего проекта, на базе станции СИ фазово-контрастной рентгеновской микроскопии и микротомографии была разработана установка для фиксации и облучения лабораторных животных [1]. Разработанная модель позволяет максимально корректно зафиксировать животное для облучения без причинения ему вреда с сохранением всех жизненно важных функций.

Одновременно вышеуказанными исследованиями проводилась оценка динамики гибели опухолевых клеток после облучения в сочетании с насыщением их наночастицами оксида марганца. Такая комбинация может вызывать синергический эффект, основанный на образовании активных радикалов, чей окислительный эффект усиливается наночастицами марганца. При облучении глиобластомы дозой 2 Гр и в присутствии MnO в концентрации 500 мкг/мл клетки гибли в течение часа после облучения. А при наличии MnO в ростовой среде в концентрации 50 мкг/мл полный цитоллиз клеток был зафиксирован через 18 часов после облучения. Облучение дозой 2 Гр без насыщения питательной среды оксидом марганца не влияло на продолжительность жизни клеток U87. Также с использованием лабораторных животных было показано, что введение препарата, содержащего наночастицы оксида марганца, приводит к его накоплению в опухолевых тканях.

1. K.E. Kuper et al. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 575, (2007).

Структурно-функциональная организация рецептора сигма-1

Корбан С. А.^{1, 2}, Жемков В. А.^{1, 2}, Кульминская А. А.²,
Безпрозванный И. Б.^{1, 3}, Ким М. В.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 Юго-западный медицинский центр Университета Техаса, Даллас, США
sa_korban@mail.ru

Рецептор сигма-1 (С1Р) – это интегральный мембранный белок с обширным спектром биологических функций.

Известно, что С1Р является белком-шапероном и внутриклеточным модулятором, а также вовлечен в процессы развития многих нейропатологий [1–3]. В ряде исследований было показано, что агонисты С1Р обладают терапевтическими свойствами при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Хантингтона [4–8]. Таким образом, С1Р выступает как новая многообещающая терапевтическая мишень при нейропатологиях. Однако, на настоящий момент механизмы регуляции функций С1Р, а также его структурно-функциональные отношения остаются неизвестными.

В данной работе биохимические и структурные исследования проводились на рекомбинантном С1Р, слитым с мальтозо-связывающим белком (МВР) и экспрессированном в бактериальной системе *E. coli*. Белок был выделен и очищен до гомогенного состояния методами аффинной хроматографии на амилозной смоле и методом гель-фильтрации.

С помощью методов гель-фильтрации и нативного голубого электрофореза была детально охарактеризована четвертичная структура С1Р, и было показано, что С1Р в мембранах организован в виде гомоолигомеров (предположительно, тетрамеров), тогда как очищенный рекомбинантный белок существует в виде полидисперсной смеси из олигомерных и мономерных форм. Результаты исследований влияния лигандов (3-PPP, NE-100 и PRE-084) на четвертичную структуру С1Р показали, что стимуляция лигандом стабилизирует олигомерные формы С1Р, а также вызывает процессы олигомеризации мономерных субъединиц С1Р, причем этот процесс является температурно-зависимым.

Методами молекулярного клонирования были получены отдельные домены С1Р (трансмембранный TM10-116 и С-терминальный STD116-223), и проведен анализ их нативной структурной организации. В настоящий момент ведутся работы по кристаллизации С-терминального домена С1Р.

Результаты данной работы будут иметь важное практическое применение, поскольку С1Р является перспективной молекулярной

мишенью для разработки лекарственной терапии при нейродегенеративных заболеваниях человека.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда, проект № 14-25-00024.

1. Ishikawa M. and Hashimoto K. The role of sigma-1 receptors in the pathophysiology of neuropsychiatric diseases. *J. Receptor Ligand Channel Res.*, 3, 25–36 (2010).
2. T. Maurice and T.-P. Su. *Pharmacol. Ther.*, 124(2), 195-206 (2009).
3. T. Hayashi and T. Su. *Curr. Neuropharmacol.*, 3(4) 267-280 (2005).
4. V. Villard et al. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, 34(6), 1552-1566 (2009).
5. V. Villard et al. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.*, 25(8) 1101-1117 (2011).
6. N. Uchida et al. *Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry*, 13(12), 1062-1066 (2005).
7. A. Marrazzo et al. *Neuroreport*, 16(11) 1223-1226 (2005).
8. J. Meunier, J. Ieni, and T. Maurice. *Br. J. Pharmacol.*, 149(8), 998-1012 (2006).

Преждевременное старение мезенхимных стволовых клеток человека, индуцированное субцитотоксическими дозами антиоксидантов

*Корниенко Ю. С.^{1, 2}, Люблинская О. Г.¹,
Пуговкина Н. А.¹, Никольский Н. Н.¹*

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

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

kornienko.js@gmail.com

Известно, что повышенный уровень внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) может приводить к окислительному стрессу и вызывать запуск в клетках программ стресс-индуцированного преждевременного старения или апоптоза. Различные антиоксиданты, элиминирующие АФК, оказались эффективными агентами для предотвращения последствий искусственно индуцированного в клетках окислительного стресса. Однако в ряде недавно опубликованных работ было обнаружено, что обработка антиоксидантами пролиферирующих клеточных культур изменяет физиологически-релевантный уровень внутриклеточных АФК и нарушает функционирование сигнальных путей, регулирующих клеточную пролиферацию. В настоящей работе впервые показано, что воздействие высоких доз различных антиоксидантов может не только негативно влиять на пролиферацию мезенхимных стволовых клеток человека, но и вызывать эффект преждевременного старения.

В работе исследован ответ мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека (МСКэ) на обработку субцитотоксическими дозами антиоксидантов (темпол, ресвератрол, NAC, DPI, апоцинин). Под субцитотоксическими дозами подразумеваются высокие дозы, существенно понижающие внутриклеточный уровень АФК, но не приводящие к гибели клеток. Установлено, что обработка антиоксидантами МСКэ вызывает продолжительный блок пролиферации и генотоксический стресс. Обнаружено, что действие антиоксидантов приводит к деградации одного из важнейших белков-регуляторов клеточного цикла на стадии фазы синтеза ДНК – циклина А, что является одной из возможных причин блока пролиферации и накопления разрывов ДНК. Кроме того, в работе исследован отсроченный ответ культур МСКэ на генотоксический стресс, индуцированный антиоксидантами. Установлено, что блок клеточной пролиферации, сохраняющийся после отмывки от антиоксидантов, сопровождается ростом размера клеток и внутриклеточного уровня АФК, а также накоплением ассоциированной со старением β -галактозидазы, что указывает на запуск программы преждевременного старения.

Таким образом, в работе показано, что обработка МСКэ субцитотоксическими дозами антиоксидантов нарушает регуляцию клеточного цикла и вызывает генотоксический стресс, что приводит к преждевременному старению клеток.

Создание и применение сенсibiliзирующих и визуализирующих генетических конструкций в контексте активности транскрипционного фактора Окт4

Кузьмин А. А., Лисковых М. А., Томилин А. Н.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

a.kuzmin@incras.ru

Транскрипционный фактор Окт4 (он же Pou5f1) – ключевой фактор в поддержании плюрипотентности стволовых клеток [1]. Изучение механизмов его работы, наряду с выявлением новых функций и исследованием регуляции его активности требует широкого спектра молекулярно-биологических подходов. В последнее время широкое применение получили методы редактирования генома: на основе цинковых пальцев, систем TALEN и CRISPR/Cas9 [2]. Последняя – наиболее эффективная и универсальная, применяется нами для создания линий стволовых клеток и в будущем – мышей, несущих в локусе гена Окт4 генетические конструкции, направленные на сенсibiliзацию и в перспективе, визуализацию Окт4-позитивных клеток.

На данный момент подобные конструкции в основном применяются в виде лентивирусных трансгенов, содержащих регуляторные элементы, идентичные исследуемым локусам, которые имеют как минимум два недостатка: первый – неспецифический сайленсинг, второй – отсутствие идентичной эндогенной эпигенетической регуляции [3].

Сконструированные нами и успешно встроенные конструкции – P2A-dTK-IRES-Puro и P2A-Puro, позволяют осуществлять положительный (за счет Puro) и негативный (за счет dTK, при добавлении ганцикловира) отбор Окт4-экспрессирующих клеток. В первом случае это необходимо для обогащения популяции стволовых клеток, подверженных спонтанной дифференцировке для последующего применения в тканезаместительной терапии, а также исследованиях, основанных на изучении поддержания стволовости клеток. Негативный отбор также важен в контексте тканезамещения, т. к. решает проблему туморогенности стволовых клеток, введенных в организм.

В данный момент создаются конструкции с включением флуоресцентного маркера, необходимые для отслеживания экспрессии Окт4 в реальном времени, что поможет в поиске его новых функций, особенностей и механизмов регуляции.

1. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. Nature Genetics, 24(4), 372-6 (2000).
2. Gaj T., C.A. Gersbach et al., Trends Biotechnol., 31(7), 397-405 (2013).
3. Hofmann A., Kessler B. et al., Mol. Ther., 13(1), 59-66 (2006).

Влияние rs2619364, rs11931074, rs356219, rs2583988 гена альфа-синуклеина (SNCA) на риск развития болезни Паркинсона и уровень альфа-синуклеина крови

Кулабухова Д. Г.^{1,2}, Гараева Л.¹, Емельянов А. К.^{1,2}, 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*

* *KulabuhovaDarya@gmail.com*

Болезнь Паркинсона (БП) одно из распространенных нейродегенеративных заболеваний, обусловленное гибелью 80 % дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга.

На данный момент гибель нейронов связывают с образованием белковых агрегаций белка альфа-синуклеина. Альфа-синуклеин кодируется геном *SNCA*, в котором описан ряд однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОМП), ассоциированных с риском развития БП по данным GWAS, которые нуждаются в репликации на отдельных этнических группах.

Целью данной работы является оценка ассоциации полиморфных вариантов гена *SNCA* (rs2619364 (A/G), rs11931074 (G/T), rs356219 (A/G), rs2583988 (C/T)) с БП, а также с уровнем общего альфа-синуклеина и уровнем экспрессии белка в CD45+ клетках крови. Выбор в качестве объекта исследования популяции CD45+ клеток крови связан с тем, что они могут отражать процессы нейродегенерации, происходящие в головном мозге, а применяемый метод магнитного сортирования позволяет исключить фактор гемолиза, искажающий значения уровня альфа-синуклеина.

ДНК выделяли из периферической крови методом хлор-фенольной экстракции. Идентификацию ОМП проводили методом ПЦР и рестрикционного анализа. Сортирование CD45+ клеток крови осуществлялось с использованием магнитного ручного сепаратора MACS (Miltenyi Biotec, США) и колонок miniMACS типа MS (Miltenyi Biotec, США). Лизис CD45+ клеток крови осуществлялся с использованием набора Total Protein Extraction Kit (Chemicon (Millipore), США). Измерение уровня общего белка в клеточных лизатах было проведено с использованием набора Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, США). Выравнивание по 6 мкг общего белка на лунку.

Уровень альфа-синуклеина оценивался методом ИФА с использованием набора Human alpha-synuclein ELISA kit (Invitrogen, США).

При проведении реплекативных исследований выявлено, что все исследованные ОМП показали влияние на риск развития БП в Северо-Западном регионе России. Наиболее значимая ассоциация показана для ОМП rs2619364 (A/G) и rs11931074 (G/T): носительство генотипа GG (rs2619364) увеличивает риск развития БП в 3,5 раза, аллеля Т (rs11931074) –

в 1,7 раза. При этом необходимо отметить, что гомозиготы (ТТ) по аллелю риска Т (rs11931074) выявлены только у пациентов с БП, но не в контрольной группе.

Обнаружено увеличение уровня белка альфа-синуклеина в группе контроля у носителей генотипа АG (rs356219) по сравнению с носителями генотипа АА ($p = 0,025$). Влияние других ОНП на уровень белка не выявлено.

Полученные данные подтверждают значимость локуса гена *SNCA* в развитии БП.

Исследование поддержано грантом РФФИ №16-54-76009 ЭРА_а.

Исследование физиологических показателей и активности ферментов в листьях винограда (*Vitis vinifera* L.), зараженных вирусом GLRaV 3

*Курбанова У. А., Султанова Н. Ф., Байрамова Н. К.,
Алиева Д. Р., Гусейнова И. М.*

*Институт молекулярной биологии и биотехнологий
Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан*

mehvaliyeva-ulduza@rambler.ru

Согласно современным данным известно около 70 вирусов, относящихся к 20 семействам, заражающие виноградное растение (*Vitis vinifera* L.) В результате заболевания вирусной болезнью нарушаются различные аспекты метаболизма (дыхание, фотосинтез и др.) и в большинстве случаев больные растения погибают. Кластевироз GLRaV 3, относящийся к роду Ампливирус, семейства *Clasteroviridae*, наносит серьезный экономический ущерб основным винодельческим регионам. Заболевание этим вирусом приводит к таким физиологическим изменениям как задержка созревания, уменьшение количества продукции и др. В результате ухудшается качество продукции и вина.

Для проведения молекулярной диагностики вирусных заболеваний растений винограда, выделяли РНК из позитивных образцов согласно результатам серологического анализа и проводили RT-PCR-анализ. При RT-PCR-амплификации были подобраны праймеры LR3 8504v (3'-ATGGCATTGAACTGAAATT-5') и LR3 9445c (5'-СТАСТТСТТТТГСААТАГТТ-3') специфичные для вируса листьев винограда. В результате был синтезирован фрагмент ожидаемого размера длиной в 942 bp.

Исследования биохимических изменений происходящих у растений винограда под воздействием инфекции GLRaV 3 имеет огромное значение.

Тогда как активность НАД-малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37) [2] увеличивалась, активность аланинаминотрансферазы (АлАТ, КФ 2.6.1.2) уменьшалась у всех инфицированных образцов по сравнению со здоровыми растениями винограда. У больных растений не обнаруживаются значительное изменение в активности [1] аспартатаминотрансферазы (АсАТ, КФ 2.6.1.1)

1. Gaufichon L., Steven J.R., Akira S. Asparagine metabolic pathways in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, doi: 10.1093/pcp/pcv184 (2015).
2. Nunes N.A., Carrari F. et al. Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol.*, 137, 611-622 (2005).
3. Hørdler M., Rej R. Alanine aminotransferase. In: *Methods of enzymatic analysis* (H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Grabl, eds.). 3rd Ed. Germany: Chemie, Weinheim, Verlag, 3, 444-456 (1983).

Влияние дофамина на экспрессию гена альфа-синуклеина *in vitro* при болезни Паркинсона

Лавринова А. О.¹, Емельянов А. К.^{1, 2, 3}, Литусова Е. М.¹,
Николаев М. А.^{1, 2, 3}, 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 *Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический
университет РАН, Санкт-Петербург, Россия*

lavrinoва.anna@gmail.com

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) является наиболее частым нейродегенеративным заболеванием, развитие которого обусловлено гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга. В настоящее время считается, что основной механизм нейродегенерации при БП связан с агрегацией пресинаптического белка альфа-синуклеина. Предполагается, что гибель дофаминергических нейронов при БП может быть опосредована влиянием дофамина на процесс олигомеризации альфа-синуклеина через эпигенетические пути регуляции экспрессии гена *SNCA*.

Цель. Изучение влияния дофамина на экспрессию гена *SNCA in vitro* у пациентов с БП и в контроле.

Материалы и методы. В данное исследование включены 20 пациентов (средний возраст 65,5±5,32 лет) с БП, не принимающих Л-ДОФА препараты и 15 индивидуумов (средний возраст 62,38±7,97 лет) контрольной группы.

Было проведено культивирование лимфоцитов, выделенных из периферической крови пациентов и контроля в присутствии хлорида дофамина (Sigma-Aldrich, США) в количестве 100 мкМ. Клетки культивировались в CO₂-инкубаторе (5 % CO₂, 37°C) в течение трех суток. С использованием ПЦР в режиме реального времени и интеркалирующего красителя SYBR Green 1 (SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad, США) был оценен уровень мРНК гена *SNCA* в культивированных лимфоцитах указанных групп как в присутствии хлорида дофамина, так и без него. Относительный уровень мРНК гена *SNCA* оценивался относительно двух референсных генов (*18S rRNA*, *GNB2L1*) с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Сравнение вариационных рядов между исследуемыми группами проводилось с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Все расчеты были проведены с использованием программы SPSS версия 12.0. Значения $p < 0.05$ считались статистически значимыми.

Результаты. Значения уровня мРНК гена *SNCA* составили: при культивации клеток без хлорида дофамина – группа пациентов с БП – ($n = 18$, медиана (мин-макс): 0,28 (0,0033-0,71)), контроль – ($n = 15$, медиана (мин-макс): 0,16 (0,08-0,97)); при культивации клеток с добавлением в питательную среду хлорида дофамина – в группе с БП – ($n = 19$, медиана (мин-макс): 0,07 (0,0013-0,32)), в контроле – ($n = 14$, медиана (мин-макс): 0,07 (0,02-0,32)). Было обнаружено снижение уровня мРНК гена *SNCA* для клеток, культивированных в присутствии хлорида дофамина, как в случае группы пациентов с БП ($p = 0,02$), так и в контроле ($p = 0,003$).

Выводы. Полученные данные, свидетельствующие о снижении уровня мРНК гена *SNCA* при воздействии дофамина на лимфоциты периферической крови *in vitro*, позволяют предполагать его участие в эпигенетической регуляции экспрессии гена *SNCA* при БП.

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-04-01187.

Компьютерное моделирование материалов на основе антибиотиков и целлюлозы

Меженская Д. А.¹, Фалькович С. Г.²

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

² Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия
dasmez@mail.ru

Инфекции являются серьезной проблемой в медицине, в том числе при имплантации, при лечении ран или ожогов [1]. В настоящее время во многих лабораториях мира ведутся разработки новых материалов для имплантации, а также раневых покрытий, которые обладали бы антимикробными свойствами. Одним из перспективных вариантов является использование материалов на основе кристаллической целлюлозы (КЦ) с адсорбированными на ее поверхности антибиотиками. Недавние исследования показали, что полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ-Cl) проявляет широкий спектр дезинфицирующих свойств против различных бактерий, грибов и вирусов [2]. Также на рынке имеется и другой антибиотик – полигексаметиленбигуанидин гидрохлорид (ПГМБ-Cl), обладающий схожими, но более глубоко изученными свойствами [3].

Для создания лекарственной системы из КЦ и антибиотика необходимо, прежде всего, доскональное понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе формирования нового соединения, а также влияния различных факторов окружающей такую систему среды. В дальнейшем такие знания помогут не только предсказать поведение лекарственной системы при имплантации в организм человека, но и осуществить постепенное отсоединение антибиотиков с поверхности КЦ, обеспечивая тем самым более длительный лечебный эффект.

В данном исследовании были созданы компьютерные модели КЦ и антибиотиков и отработана методология их моделирования в вакууме и водном окружении. Оценка энергии связывания указывает на стабилизацию комплексов при связывании антибиотиков с КЦ в вакууме и водном окружении. Также отсутствуют различия между энергиями связываний для ПГМГ и ПГМБ. Исследование механизма формирования комплекса свидетельствует о наличии водородных связей между гидроксидами целлюлозы и ионами хлора, однако, ионы хлора не вносят существенный энергетический вклад.

1. Kukharenko O. et al. Eur. Polym. J., 247, 8 (2014).
2. Mathurin Y.K. et al. J. Food Protect., 1167, 5 (2012).
3. Llorens E. et al. Materials Science and Engineering C. 74, 10 (2015).

Ген *sws Drosophila melanogaster* как регулятор аксонного транспорта

Мелентьев П. А.^{1,2}, Рябова Е. В.¹, Шувалова П. К.¹,
Голомидов И. М.¹, Саранцева С. В.¹

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

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

Ген *sws Drosophila melanogaster* кодирует трансмембранный белок, регулирующий взаимодействие нейронов и глиальных клеток. Мутации в гене *sws* приводят к прогрессирующей с возрастом нейродегенерации, изменению морфологии глиальных клеток, нарушению липидного обмена. Ортолог *sws* у человека – ген *NTE*, ассоциирован с отложенной нейропатией, вызванной органическими фосфатами (organophosphorus compound-induced delayed neuropathy, OPIDN) – тяжелым заболеванием, вызванным интоксикацией органическими фосфатами, приводящей к необратимому ингибированию NTE. Более того, мутации *NTE* ведут к одной из форм наследственной спастической параплегии (SPG39), для которой характерна прогрессирующая с возрастом дегенерация аксонов. Таким образом, дисфункция белка *sws/NTE*, вызванная мутацией в гене или ингибированием белка органическими фосфатами, ведет к нейродегенерации. Тем не менее, механизмы нейродегенерации в этих случаях мало изучены.

Мы оценили распределение белка в клетках нервной системе личинок дрозофилы. Также мы определили влияние мутации *sws* (*sws*¹, *sws*⁷⁶⁻¹⁵, *sws*^{olfE}) и нокдауна *sws* на образование сети микротрубочек в нейромышечных окончаниях и в мышечных клетках. Мы изучили распределение митохондрий у особей, экспрессирующих GFP, где этот флуоресцентный белок встраивается в мембрану митохондрий.

Мы обнаружили, что экспрессия *sws* заметна преимущественно в глиальных клетках, а также в нейронах личинок. Мы показали, что мутации в гене *sws* нарушают образование сети микротрубочек в нейромышечных соединениях. Значительное уменьшение кластеров митохондрий найдено во всех линиях с измененной экспрессией *sws*.

Мы полагаем, что уменьшение количества митохондрий в аксонах и нейромышечных контактах является следствием нарушения образования сети микротрубочек. Мы впервые выявили роль *sws* как регулятора стабильности микротрубочек.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-09041.

Возможности использования метода динамической спекл-интерферометрии для исследования живых клеток в культуре

Михайлова Ю. А.^{1, 2}, Владимирова А. П.^{1, 2}, Бахарев А. А.²

¹ Уральский федеральный университет им. Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

² Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций,
Екатеринбург, Россия

julia_mikhailova2104@mail.ru

В настоящее время внедрение лазерных технологий в биологию и медицину требует разработки новых экспрессных методов, диагностических методик и устройств, обладающих надежностью получаемых результатов. Перспективным является метод динамической спекл-интерферометрии (англ. *speckle* – крапинка, пятнышко). Динамика спеклов наблюдается при освещении лазерным излучением живых объектов вследствие изменения во времени амплитуд и фаз рассеянных волн. В литературе часто само это явление обозначается как биоспеклы [1].

Целью доклада является ознакомление слушателей с авторскими разработками по применению метода динамической спекл-интерферометрии для изучения процессов, протекающих в живой клетке.

Теория динамической спекл-интерферометрии тонких биологических объектов была опубликована в работе [2]. Метод был успешно применен авторами для исследования метаболической активности трех клеточных культур L-41, Vero и ЛЭЧ-3, зараженных вирусом простого герпеса первого типа [3] и в отсутствие вируса [4]. Также с помощью метода была оценена реакция клеточных культур на изменение температуры от 26 до 37 °С.

В качестве параметра, характеризующего метаболическую активность клеток, предложено использовать среднеквадратическое отклонение разности оптических путей волн σ_u , зондирующих клетки.

Обработка и анализ экспериментальных данных показали, что наличие вируса в клетках можно обнаружить через 10 минут после начала эксперимента.

Показано, что в процессе увеличения температуры от 26 до 37 °С в течение часа, имеют место значительные флуктуации величины σ_u в пространстве и во времени. При стабилизации температуры в течение 30 минут флуктуации практически прекращаются, а при изменении температуры на десятые доли градусов наблюдается хорошая корреляция между параметром σ_u и температурой.

1. Rabal H.J., Braga Jr. R.A. Dynamic Laser Speckle and Applications. New York: CRC Press (2008).
2. Владимирова А.П. Известия вузов. Радиофизика, 57, 8-9 (2014).
3. Владимирова А.П., Малыгин А.С., Михайлова Ю.А., Бахарев А.А., Порываева А.П. Медицинская техника, 4 (2014).
4. Владимирова А. П., Малыгин А. С., Михайлова Ю. А., Бородин Е. М., Бахарев А. А., Порываева А. П. Известия вузов. Радиофизика, 57, 8-9 (2014).

Макрофаги человека как модель для изучения дисфункций глюкоцереброзидазы при болезни Гоше и GBA-ассоциированной болезни Паркинсона

Николаев М. А.^{1,2}, Копытова А. Э.¹, Емельянов А. К.^{1,2}, 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*

Almaflex@mail.ru

Болезнь Паркинсона (БП) это нейродегенеративное заболевание при котором гибель нейронов ассоциирована с агрегацией белка альфа-синуклеина, который обнаруживают и при лизосомных болезнях накопления. Одной из них является болезнь Гоше, обусловленная мутациями в гене лизосомного фермента глюкоцереброзидазы (GBA). Мутации в гене *GBA*, приводящие к снижению активности фермента, являются наследственным фактором развития БП. Для изучения молекулярного механизма развития БП в следствие дисфункций GBA, а также для выбора стратегий терапии болезни Гоше и GBA-БП, актуальным является выбор объекта исследования.

Цель: сопоставить возможность оценки активности GBA с различными методами культивирования клеток крови человека.

Ферментативная активность GBA была оценена с помощью масс-спектрометрического анализа в сухих пятнах при нанесении лимфоцитов и макрофагов на фильтр в различных концентрациях, после культивирования. Клетки помещались в питательную среду с разными условиями на 5 дней с ежедневной заменой среды при 37 °С; 5 % CO₂. Общий объем – 20 мл: 2 мл бычьей сыворотки крови (БиолоТ), 17,8 мл среды RPMI (Gibco), 200 мкл антибиотика (Gibco). В 1-м случае добавлялся колоние-стимулирующий фактор роста макрофагов M-CSF (Gibco) до конечной концентрации 4 нг/мл, во 2-м – сыворотка крови человека, заменяющая бычью сыворотку и в 3-м – сокращено время культивирования до 2-х дней.

Популяция макрофагов отличалась присутствием множества клеток неправильной формы, подтвержденной с помощью световой микроскопии. Положительная активность фермента GBA выявлялась в результате культивирования первыми двумя методами, а в лимфоцитах не детектировалась. Кроме того, значение активности существенно зависело от концентрации клеток, нанесенных на фильтры, и при концентрации выше $2,52 \cdot 10^6$ кл/мл наблюдалось отсутствие линейной зависимости.

Выводы. Макрофаги человека, полученные с использованием метода культивирования в присутствии M-CSF, являются удобным объектом исследования ферментативной активности GBA. При оценке активности

GBA методом тандемной масс-спектрометрии целесообразно на фильтры наносить клетки с концентрацией в $2 \cdot 10^6$ кл/мл.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-04-00764.

Наночастицы серебра вызывают апоптозоподобную гибель клеток *Escherichia coli* и влияют на метаболизм меди у млекопитающих

Орлов Ю. А.^{1,2}, Рожкова Н. А.², Бабич П. С.³, Ильичева Е. Ю.^{1,2}

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

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

³ Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

orlov239@gmail.com

Наночастицы серебра (AgNP) – широкий класс современных функциональных материалов. AgNP отличаются простотой синтеза и своими антибактериальными свойствами. Принято считать, что AgNP не токсичны для млекопитающих, не смотря на отсутствие исчерпывающих данных подтверждающих это. Абиогенное Ag(I) – изоэлектронный двойник Cu (I), опосредующей активность купроэнзимов, что делает возможным нарушение метаболизма меди AgNP. Учитывая постоянный рост сферы применения AgNP, оценка их токсичности, в особенности для млекопитающих, – важная задача. Целью работы стало исследование свойств новых AgNP, а также оценка влияния этих AgNP на модельные организмы.

AgNP были синтезированы методом химического восстановления ионов серебра в мицеллах. Методами UV/vis спектрометрии, рентгеновской дифрактометрии, атомно-силовой и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) обнаружили, что полученный раствор содержит частицы сферической формы диаметром до 50 нм. Частицы имели кристаллическую решетку, образованную атомами серебра.

Действие AgNP на бактерии носило время- и дозозависимый характер. На ПЭМ изображениях клеток *E. coli* после инкубации с AgNP видно, что частицы распределяются по бактерии равномерно и не удаляются ресуспендированием и центрифугированием. Проточная цитометрия клеток *E. coli*, инкубированных в растворе AgNP, с красителями FITC-Annexin V и PI показала, что сначала растет количество клеток, связавших только FITC-Annexin V, а уже потом оба красителя.

Основная часть AgNP, введенных животным внутривентриально, аккумулировалась в печени, селезенке и легких. Выводилось серебро через желчь, как и медь. При высоких дозах AgNP, Ag также обнаруживали в моче. Концентрация Ag в печени не уменьшилась через полторы недели после прекращения введения AgNP, тогда как в сыворотке снизилась только на 20 %.

После семи суток ежедневного введения AgNP оксидазная активность (ОА) церулоплазмينا (ЦП) падала до 10 % от первоначального значения, в то время как синтез, секреция и концентрация белка ЦП в сыворотке крови не менялись. Через 9 дней после отмены AgNP ОА восстанавливалась до 60 % от первоначальной.

Приведенные данные свидетельствуют о способности AgNP нарушать метаболизм меди у млекопитающих.

Методологические подходы к клонированию гена десмина для проведения функциональных исследований его мутаций

Павлов Г. С.¹, Смолина Н. С.², Киселев А. М.², Костарева А. А.²

¹ Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

GeorgesPavl@gmail.com

Десмин – специфичный для мышечной ткани белок Z-диска, являющийся промежуточным филаментом. Его функции: сохранение клеточной целостности, обеспечение устойчивости клетки к механическому стрессу, взаимодействие с клеточными органеллами и определение их расположения, участие в передаче механических стимулов из внеклеточного пространства к ядру. Мутации гена десмина приводят к развитию кардиомиопатии. Однако механизм развития заболевания изучен недостаточно и требуется проведение функциональных исследований мутаций десмина. Для этого необходима клеточная модель, которой могут служить мышечные клетки, трансдуцированные лентивирусами, несущими мутантные формы десмина [1].

Цель работы – создание лентивирусов, кодирующих ген десмина дикого типа и мутантную форму, а также зеленый и красный флуоресцентный белок соответственно. Они позволят изучить влияние мутаций гена десмина на мышечные клетки в клеточной культуре, где часть клеток экспрессирует десмин дикого типа, а часть мутантную форму. Флуоресцентные белки позволят отличить каждый тип клеток в культуре и оценить их взаимодействие.

Для получения векторов применяли молекулярное клонирование. кДНК гена десмина мыши дикого типа (NM_010043.2) была амплифицирована с помощью праймеров, несущих сайт рестрикции EcoRI, для клонирования в вектора LeGO-iG2 (addgene #27341), LeGO-iT2 (addgene #27343). Мутантная форма гена получена путем сайт-направленного мутагенеза. Во время рестрикции вектор и вставка обрабатывались щелочной фосфатазой и полинуклеотидкиназой T4 соответственно. Для трансформации использовались химически компетентные клетки Stbl. Точность клонирования была оценена с помощью секвенирования по Сенджеру, а эффективность работы полученного вектора проверяли при трансфекции его в клетки линии НЕК с последующим анализом на проточном цитометре и иммунофлуоресцентной окраской на десмин.

В результате выполненной работы были получены лентивирусные вектора, кодирующие ген десмина дикого типа и зеленый флуоресцентный белок и мутантную форму и красный флуоресцентный белок.

1. Гудкова А.Я., Смолина Н.А., Семернин Е.Н. и др.; Трансляционная медицина, 62(3), (2014).

Изменение экспрессии гена адипонектина в эпикардиальной жировой ткани при ишемической болезни сердца

*Пантелеева А. А.¹, Мирошникова В. В.¹, Семенова И. А.¹,
Разгильдина Н. А.¹, Баженова Е. А.², Беркович О. А.², 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*

alekspanteleeva@gmail.com

Современные исследования позволяют предположить, что эпикардиальная жировая ткань (ЭКЖТ) может играть ведущую роль в развитии и прогрессировании коронарного атеросклероза. В пользу этой гипотезы свидетельствует анатомическая, функциональная связь ЭКЖТ, коронарных артерий и миокарда, которая делает возможным тесное взаимодействие и интенсивный обмен веществ между этими структурами. Доказано, что в ЭКЖТ вырабатывается множество биологически-активных веществ, участвующих в процессах воспаления, атерогенеза и эндотелиальной дисфункции. Однако молекулярные механизмы влияния ЭКЖТ на обмен липидов и формирование атеросклеротических бляшек коронарных артерий, а также развитие дисфункции миокарда в настоящее время не установлены.

Адипонектин (ADIPOQ) – один из наиболее важных адипокинов, секретируемый ЭКЖТ. Адипонектин регулирует энергетический гомеостаз путем регуляции метаболизма глюкозы и липидов. Показано, что адипонектин может оказывать влияние на обмен липидов и иметь протективное значение в отношении развития сердечно-сосудистой патологии.

Целью нашего исследования стало изучение ассоциации адипонектина со степенью тяжести коронарного атеросклероза.

Исследование было выполнено на 38 образцах эпикардиальной жировой ткани, полученных в ходе проведения аортокоронарного шунтирования. Уровень мРНК гена адипонектина оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Было показано, что у пациентов с окклюзиями коронарных артерий уровень мРНК адипонектина был достоверно ниже, чем у пациентов с меньшей степенью тяжести атеросклеротических повреждений (отсутствие окклюзий), $p < 0,05$.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что прогрессирование атеросклероза коронарных артерий ассоциировано со снижением уровня экспрессии гена адипонектина в эпикардиальной жировой ткани.

Взаимодействие ламинов А/С с сигнальным путем Notch при дифференцировке клеток

Перепелина К. И., Малашичева А. Б.

*Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия*

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

kseniya.perepelina@mail.ru

Ядерные ламины являются основными белками ядерной оболочки и обеспечивают прочность ядерной мембраны клетки, а также взаимодействие внеядерных структур с компонентами ядра клетки [1]. В последнее время стало понятно, что ламины играют не только структурную, но и регуляторную роль в клетке. Точечные мутации гена *LMNA*, кодирующего белок ламин А/С, приводят к нарушению дифференцировки клеток. Природа этого явления, как и механизмы, посредством которых ламины могут регулировать дифференцировку клеток, остаются слабо изученными [2, 3]. Сигнальный путь Notch является одним из ключевых путей, регулирующих дифференцировку клеток. Целью данной работы было изучить взаимодействие ламинов А/С с сигнальным путем Notch при дифференцировке клеток.

В работе использовали мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека и стволовые клетки сердца (СКС) человека, так как эти клетки легко дифференцируются в адипогенном и остеогенном направлении при добавлении специфических индукторов в среду культивирования. Ген *LMNA* дикого типа, либо мутантный, вносили в клетки на лентивирусном носителе. Активацию сигнального пути Notch проводили при помощи введения в клетки активированного домена Notch1 на лентивирусном носителе. Клетки дифференцировали и затем оценивали влияние мутантного *LMNA* на дифференцировку и активацию Notch, используя *LMNA* дикого типа в качестве контроля. Методом ПЦР в реальном времени проводили оценку экспрессии специфических генов дифференцировки. Также дифференцированные клетки окрашивали при помощи специфических красителей.

Введение мутантной формы *LMNA* в клетки приводило к изменению активности сигнального пути Notch, а также к изменению дифференцировочного потенциала клеток в отношении обоих исследованных типов дифференцировки. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что ламин А/С взаимодействует с сигнальным путем Notch в ходе дифференцировки клеток; мутации в гене *LMNA* модулируют это взаимодействие и, таким образом, могут влиять на дифференцировку клеток.

1. Burke B., Stewart C.L. The Nuclear Lamins: Flexibility in Function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(1), 13-24 (2013).
2. De Las Heras, Jose I. et al. Tissue Specificity in the Nuclear Envelope Supports Its Functional Complexity. *Nucleus*, 4(6), 460–77 (2013).
3. Manju K., Muralikrishna B., Parnaik V.K. Expression of Disease-Causing Lamin A Mutants Impairs the Formation of DNA Repair Foci. *J. Cell Sci.*, 119(Pt 13), 2704–14 (2006).

Сравнительное исследование липосомальной, полиплексной и микрокапсульной внутриклеточной доставки противовирусных коротких интерферирующих РНК для терапии вируса гриппа А

Петрова А. В.¹, Тимин А. С.², Муслимов А. Р.³, Васин А. В.^{1, 4}

¹ Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия

² RASA-центр Томского политехнического университета, Томск, Россия

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

⁴ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Вирус гриппа А человека (ВГА) представляет большую угрозу для человечества, являясь причиной крупных эпидемий и пандемий. Современные противовирусные препараты обеспечивают ограниченную защиту. Использование механизма РНК-интерференции для сайленсинга генов вируса является перспективным подходом в антивирусной терапии. Однако его внедрение в клиническую терапию осложнено задачей эффективной доставки киРНК в клетку. В данном исследовании мы сравнили коммерческую систему липоплексной доставки сиРНК LipofectamineRNAiMAX (Lip), полиплексные системы на основе полиэтиленимина (PEI), хитозана (Ch), а также гибридные органические-SiO₂ микрокапсулы по эффективности противовирусного действия.

Для оценки ингибирования эталонного штамма ВГА А/PR/8/34 (H1N1) на клеточной модели MDCK прежде всего были подобраны шесть киРНК-кандидатов, имеющих мишени в консервативных областях мРНК нуклеопротеина вируса NP (NP-717, NP-733, NP-1004, NP-1155, NP-1341 и NP-1496). киРНК трансфицировали в клетки с использованием коммерческой системы Lip и полиплексной системы PEI, через 24 часа клетки отмывали и проводили заражение ВГА. Противовирусное действие кандидатов-сиРНК оценивали по выраженности цитопатического действия вируса на клеточный монослой, а также проводили реакцию геммаглютинации супернататов, содержащих вирусное потомство, с куриными эритроцитами. В результате, в случае обеих систем доставки,

были выбраны три наиболее эффективно ингибирующих вирус сиРНК: NP-717, NP-1155 и NP-1496.

В предварительных экспериментах было обнаружено 4–8 кратное снижение репродукции вируса для PEI и Ch полиплексных систем, и снижение уровня целевого белка NP до 40 % в клетках, свидетельствующее о сопоставимом ингибирующем действии, не превосходящим по эффективности действия чистых полимеров.

Далее было показано ингибирующее действие трех отобранных сиРНК, трансфицируемых микрокапсулами в концентрациях, превышающих полиплексную доставку. Через 24 и 72 часов после заражения было обнаружено 4–8 кратное снижение титра вторичного потомства вируса, а также снижение уровня белка NP более чем на 90 %, по сравнению с контрольными инфицированными клетками; был продемонстрирован доза-зависимый эффект.

Методы электронной и электронно-ионной микроскопии в исследовании микроструктуры пород баженовской свиты

Пичкур Е. Б., Михуткин А. А.

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

Применение современных методов растровой электронной микроскопии (РЭМ), просвечивающей/растровой электронной микроскопии (П/РЭМ) и рентгеновского микроанализа (РМА) к исследованию нефте- и газоносных сланцев дает возможность проведения многомасштабных исследований микроструктуры и состава образцов, в частности, «органопористости», распределение керогена в породе, с численным анализом параметров пор и их связности [1]. Масштаб исследований, в зависимости от применяемого метода, составляет от десятков микрометров (РЭМ и ФИП) до единиц нанометров (П/РЭМ). Безусловно, более полную картину дает объединение и с методами рентгеновской томографии, позволяющей локализовать место последующего анализа вышеперечисленными методами.

В настоящей работе на примере образцов нефтеносных пород баженовской свиты приведены возможности исследования микроструктуры и численные оценки параметров органических включений в породу и пустотного пространства с помощью двухлучевых ФИП-РЭМ (РЭИМ) Helios NanoLab 600 и FEI Scios (оба FEI, США) с привлечением П/РЭМ Titan 80-300 Tecnaï и Osiris (оба FEI, США). Для постобработки изображений использовалось программное обеспечение Avizo/Amira (FEI) и ImageJ.

Показаны возможности трехмерной реконструкции пористых областей керогена с дальнейшей оценкой пустотного пространства с разрешением до 25 нм. Перечисленные методы позволяют восстановить многомасштабную трехмерную картину, характеризующую микроструктуру и состав образцов, позволяет сделать вывод о присутствии органического вещества.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, шифр проекта RFMEFI58114X0008. Исследования частично выполнены на оборудовании РЦ ЗЭМ КК НБИКС-технологий НИЦ «Курчатовский институт».

1. Исследования морфологии пустотного пространства керогена баженовской свиты. А.Л. Васильев, Е.Б. Пичкур, А.А. Михуткин и др. Нефтяное хозяйство, 10, 28–31 (2015).

Использование MALDI-MS для изучения взаимодействия триазавирина с объектами белковой природы

Протасов А. В.¹, Миргородская О. А.¹, Козьмин Ю. П.², Васин А. В.¹

¹ *Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия*

² *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Проблема вирусных инфекций сохраняет актуальность из-за уникальной способности вирусов к изменчивости путем мутаций, рекомбинаций и реассортации генов, что сопровождается модификацией биологических свойств возбудителя и является причиной неконтролируемого распространения инфекции. Несмотря на успехи в создании вакцин, средств химиопрофилактики и терапии, ежегодно вирусные эпидемии охватывают страны и континенты. Азолозины являются синтетическими аналогами пуринов. У некоторых соединений этого класса обнаружена высокая противоопухолевая и противовирусная активность. В настоящей работе изучены некоторые свойства этого типа соединений, которые содержат в своей структуре нитрогруппу. В их числе триазавирин (TZV) и ряд его аналогов. С учетом наличия нитрогруппы представлялось целесообразным оценить ее вклад во взаимодействия с рядом вероятных объектов белковой природы.

Рассмотрено взаимодействие нового противовирусного препарата триазавирин (натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она) и некоторых его аналогов с рядом объектов белковой природы – модельными биологически активными пептидами (как нативным, так и их синтетическими аналогами), а также одним из

функциональных белков сыворотки крови человека. В качестве основного метода исследования использован масс-спектрометрический метод MALDI-MS.

Установлено, что исследуемые соединения обладают способностью к взаимодействию с соединениями белковой природы по широкому спектру – от участия в химической модификации до участия в ингибировании ангиотензин-конвертирующего фермента. Показано, что химическое воздействие на тиолы обусловлены участием в этих процессах нитрогруппы, вызывающее их окисление с образованием сульфидных мостиков в изучаемых пептидах.

Авторы благодарят В. Л. Русинова за предоставленные образцы азолоазинов (Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина).

Изучение генетической стабильности холодоадаптированного вируса гриппа, экспрессирующего туберкулезный антиген ESAT6

Пулькина А. А.^{1,2}, Синцова К. С.^{1,2}, Комиссаров А. Б.¹, Сергеева М. В.¹

¹ *Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия*

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

pulkina.a@yandex.ru

Вакцина БЦЖ защищает от туберкулеза лишь детей грудного и раннего возраста, ее поствакцинальный иммунитет снижается по истечении 3–7 лет [1]. Разработка противотуберкулезной вакцины – своевременная и актуальная задача. Конструирование векторной вакцины на основе аттенуированного вируса гриппа – перспективный подход, имеющий ряд преимуществ: интраназальное введение, формирование иммунного ответа на уровне слизистых оболочек, безопасность [2]. Гриппозный вектор имеет ряд особенностей – однонитевой минус-РНК геном со сложной вторичной структурой [3]; небольшой размер генома, кодирующий 17 белков за счет альтернативного сплайсинга мРНК, неканонической трансляции, не-АТГ и повторной инициации [4].

Был получен холодоадаптированный вирус гриппа с химерным геном NS, содержащим вставку туберкулезного антигена ESAT6. Вирус был выбран из делеционных мутантов, полученных после сборки штамма с двойной вставкой (ESAT6/Ag85A) методом обратной генетики. Клоны с делецией были отобраны методом ПЦР и секвенированы по Сенджеру. В большинстве случаев делеция приходилась на Ag85A. Экспрессия

туберкулезного белка ESAT6 была показана методами иммунофлуоресценции и Вестерн-блот.

Было отмечено, что делеция пришлась на область, близкую к региону 497-564, характеризующемуся консервативной вторичной структурой у диких вирусов [5]. С помощью ресурса RNAfold WebServer [6] были смоделированы вторичные структуры участка 497-564 вирусной РНК генов NS с делециями и без. Вторичная структура участка 497-564 в последовательности с двойной вставкой не совпадала со структурой «дикого» типа, что могло повлечь утрату вставки. Однако и в делеционном мутанте вторичная структура этого участка не восстанавливалась. Похожая структура была обнаружена в участке 511-577. Возможно, она является компенсирующей.

Таким образом, одной из возможных причин генетической нестабильности вставки антигена в гриппозном векторе может быть отсутствие консервативной вторичной структуры вирусной РНК, отвечающей за адаптацию к организму хозяина.

Работа поддержана грантом «УМНИК» Фонда содействия развитию № 7934ГУ/2015 и грантом Правительства Санкт-Петербурга 2016 года для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга.

1. Клевцова Г. А., Минина Н.А. и др. Тр. Перм. мед. Института, 160, 8 (1984).
2. Stukova M.A., Sereinig S. et al. Tuberculosis (Edinb), 86(3-4), 236 (2006).
3. Bin Zhou, Matthew E. et al. J. Virol., 83(19), 10309 (2009).
4. Vasin A.V, Petrova A.V. et al. BMC Res. Notes, 9, 279 (2016).
5. Vasin A.V., Temkina O.A. et al. Virus Res., 185, 53 (2014).
6. Gruber A.R., Lorenz R., et al. Nucleic Acids Res., 36, 70 (2008).

Генно-модифицированные компоненты в сельскохозяйственных культурах (кабачки)

Рейхардт А. В., Штефля А. С., Власенков С. А., Сарсенгалиев А. Ж.

Астраханский государственный университет, Астрахань, Россия

condr70@mail.ru

Генетически модифицированные организмы и вопрос потенциала их использования, а также степени их влияния на метаболизм и наследственность потребителей, по-прежнему не теряет актуальности [1]. Для получения ГМО используется технология рекомбинантных молекул. Несмотря на то, что на территории Российской Федерации выращивание и продажа таких продуктов ограничена, важно исследовать ввозимые сорта на наличие трансгенных участков. В частности, на наличие в них терминатора NOS, обнаруженного в ряде генетически модифицированных сельскохозяйственных культур [2, 3].

Объектом проведенного исследования стали кабачки, традиционно выращиваемые в ряде восточных стран. Экстракцию ДНК проводили с использованием комплект реагентов «Ампли Сенс ДНК-сорб-С» (Москва), амплификацию – комплектом реагентов «Ампли Сенс Терминатор NOS-Erh» согласно прилагаемой инструкции.

В результате проделанной работы по проведению скрининга и выявлению генетически модифицированных компонентов исследовано 7 образцов. Последовательность терминатор NOS-Erh в образцах не обнаружена. Чувствительность используемой нами тест-системы выше порога (0,9 %), установленного правительством РФ. Следовательно, требования по наличию генно-модифицированных компонентов, не нарушены, представленные культуры могут быть использованы в хозяйственных целях.

1. Алексеев Я.И., Т.В. Хотяинцева, С.В.Боровская и др. 35S промотор вируса мозаики норичника (P-FMV) – новая мишень для анализа на содержание генетически модифицированных организмов. Известия ТСХА, 6, 156-161 (2011).
2. Кузнецов В.В., А.С. Баранов, В. Лебедев. Генетически модифицированные организмы: наука и жизнь. Электрон. журн. - Наука и жизнь. Москва, 6, – режим доступа: <http://www.nkj.ru> свободный (2008).
3. Сороколетова Н.Е., Ломтева Н.А., Кондратенко Е.И., Нетипанова Н.В. Современные аспекты использования генно-модифицированных компонентов в продуктах питания и методы их обнаружения. ТППП АПК, 4, (2014).

Исследования структуры нанодисков с помощью вариации контраста в малоугловом рентгеновском рассеянии

Рижиков Ю. Л.¹, Забельский Д. В.¹, Николаев М. Ю.^{1, 2}, Куклин А. И.^{1, 3}

¹ *Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия*

² *Федеральная политехническая школа Лозанны, Швейцария*

³ *Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия*

rizhikov@phystech.edu

Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) [1] представляет собой мощный метод структурных исследований биологических объектов, таких как белки, мембраны, макромолекулы и т. д.

В данной работе метод вариации контраста [2, 3] был применен в МУРР-экспериментах для получения информации о структуре фосфолипидных нанодисков – мембрано-имитирующих систем, состоящих из фрагмента липидного бислоя и двух мембранных каркасных белков (MSP) [4]. Нанодиски были приготовлены из липидов DMPC и белков MSP1E3D1.

Измерения МУРР проводились на установке BioSAXS BM29, ESRF, Гренобль, Франция [5]. Были приготовлены растворы нанодисков в буферах с содержанием сахарозы 0, 80, 160, 240, 320 и 400 мг/мл.

Для каждой концентрации сахарозы были вычислены функции Паттерсона, радиусы инерции и интенсивности в нулевой угол. Наблюдалась нелинейная зависимость форм-фактора в нулевой угол от электронной плотности растворителя. Были выявлены изменения структуры нанодисков, находящихся в растворах, содержащих сахарозу.

С помощью аппроксимации концентрации сахарозы к нулю были получены средняя электронная плотность, парциальный объем и количество электронов для нанодисков. Вычисленный объем эквивалентен объему цилиндра с высотой 35 Å и диаметром 120 Å. Количество электронов в нанодисках приблизительно соответствует стехиометрическому соотношению MSP1E3D1/DMPC = 1/160 [4].

Было показано, что электронный заряд нанодисков, а также, возможно, их объем, уменьшаются при увеличении концентрации сахарозы в растворе. Возможная причина явления заключается в уменьшении числа молекул воды, ассоциированных с липидным бислоем. В соответствии с этим объяснением, была получена зависимость минимально возможного числа таких водных молекул от концентрации сахарозы в растворе.

Работа проводилась при поддержке проекта 5-100.

1. D.I. Svergun, L.A. Feigin. New York/London, XIII, (1987) - 335 p.

2. Yu.M. Ostanevich, I.N. Serdyuk. Usp. Fiz. Nauk (in Russian), 137, 85-116 (1982).

3. H.B. Struhmann, R. G. Kirste, Z. Phys. Chem. (*Frankfurt am Main*), 46, 247-250 (1965).
4. T.K. Ritchie et al., *Methods in Enzymology*, 464, 211–231 (Chapter 11) (2009).
5. P. Pernot, A. Round, R. Barrett et al., *J. Synchrotron Rad.*, 20, 660–664 (2013).

Исследование особенностей структуры амилоидных фибрилл с использованием флуоресцентного зонда тиофлавина Т

Родина Н. П.^{1, 2}, Сулацкая А. И.¹, Кузнецова И. М.¹, Туроверов К. К.^{1, 2}

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

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

Natalia240994@gmail.com

Многим тяжелым заболеваниями, таким как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, прионные болезни и другие, сопутствует образование и накопление в организме упорядоченных нерастворимых белковых агрегатов, называемых амилоидными фибриллами. Исследования последних лет показали различия в структуре амилоидных фибрилл на основе различных белков и даже на основе одного и того же белка. Структурные различия амилоидных фибрилл могут лежать в основе природной вариабельности различных амилоидозов. Целью настоящей работы стало исследование структурных различий амилоидных фибрилл на основе лизоцима, бета-2-микроглобулина и альфа-синуклеина, накопление которых сопутствует системному лизоцимовому амилоидозу, гемодиализному амилоидозу и болезни Паркинсона, соответственно.

Для диагностики образования и исследования особенностей структуры амилоидных фибрилл широко и эффективно применяется флуоресцентный зонд тиофлавин Т (ThT). Уникальность ThT заключается в том, что данный краситель специфически взаимодействует с амилоидными фибриллами. При этом квантовый выход его флуоресценции, который в водном растворе очень мал, при встраивании красителя в фибриллы может возрасти в десятки тысяч раз.

В настоящей работе было изучено взаимодействие ThT с амилоидными фибриллами на основе лизоцима, полученными при различных условиях фибрилlogenеза, альфа-синуклеина, а также бета-2-микроглобулина и его укороченных форм. С использованием специально разработанного подхода, основанного на спектроскопическом исследовании растворов, подготовленных методом равновесного микродиализа, были определены параметры связывания (константы связывания и количество мест связывания) красителя с амилоидными фибриллами, а также рассчитаны характеристики связанного с фибриллами красителя (квантовый выход флуоресценции и

коэффициент молярной экстинкции). Кроме того, структура амилоидных фибрилл была изучена с использованием методов КД-спектроскопии и электронной микроскопии. Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о различии структуры исследуемых амилоидных фибрилл.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 14-04-01604_а и 16-54-00230 Бел_а, Программы «МКБ» РАН и стипендии Президента РФ СП-1982.2015.4.

Исследование сывороточных альбуминов и их комплексов с ионами металлов методом малоуглового рассеяния

Романов Н. М.¹, Арефьев М. И.^{1,2}, Травкина В. И.¹, Поляничко А. М.^{1,3}

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

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

³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

nikmromanov@gmail.com

В работе были исследованы размеры комплексов мономеров и димеров бычьего сывороточного альбумина (БСА) с ионами двухвалентных металлов при значениях рН в диапазоне от 2 до 11, а также с координационными соединениями платины.

Измерения проводили на установке ДИКСИ в НИЦ «Курчатовский Институт». Обработка данных осуществлялась в пакете ATSAS. Были получены оценки величин радиусов инерции, максимальных размеров комплексов и построены функции распределения (ЧЕГО) по расстояниям. Были получены следующие значения радиусов инерции: R_g составили 2,75 нм и ~ 4,2 нм для мономеров и димеров БСА, соответственно.

Для мономеров БСА в присутствии цис- и транс-дихлородиамминплатины были получены оценки величин радиусов инерции и максимальных размеров, которые соответственно составили 7,2 и 29 нм для цис-, и 6,9 и 22 нм для транс-изомеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-08-06876 и № 15-04-06993). Часть работ была выполнена с использованием оборудования ресурсных центров Санкт-Петербургского государственного университета: «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Исследование структуры и плотности бинарных смесей ДПФХ и ПОФХ методами денсиметрии и малоуглового рассеяния нейтронов вблизи точки фазового перехода

Рулев М. И.^{1, 2}, Соловьев Д. В.^{1, 3, 4}, Иванов А. И.^{1, 3, 4}, Рижиков Ю. Л.³,
Рогачев А. В.^{1, 3}, Ковалев Ю. С.^{1, 3}, Горделий В. И.^{5, 6}, Куклин А. И.^{1, 3*}*

¹ Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

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

³ Московский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Россия

⁴ Институт проблем безопасности АЭС, Чернобыль, Украина

⁵ Institute of Structural Biology, Grenoble, France

⁶ ICS-6, Forschungszentrum Juelich GmbH, Germany

* rulevmaksim@jinr.ru

Актуальность исследования фазового перехода в необычных состояниях вещества (двумерные структуры) в 2016 году была подтверждена Нобелевской премией по физике [1]. Исследование свойств липидных мембран вблизи фазового перехода (ФП) имеет важное значение не только с физической, но и с биологической точек зрения, так как клеточная мембрана играет ключевую роль в биологических процессах [2]. Поэтому липидные мембраны являются хорошей моделью для биофизических исследований. Биологическая клеточная мембрана состоит из большого количества липидов, различных по своим свойствам, в т. ч. и температурам ФП.

В настоящей работе представлены результаты исследования многослойных мембран липидных смесей в тяжелой воде двумя методами: малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) и измерением зависимости плотности от температуры. Использовались 2 различных липида: ДПФХ (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) с температурой точки главного фазового перехода $T_1=41.6^\circ\text{C}$ и ПОФХ (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) с температурой точки главного фазового перехода $T_2=-4^\circ\text{C}$. Измерения МУРН были выполнены на малоугловом спектрометре ЮМО (ИБР-2, ОИЯИ, Дубна, Россия) [3]. Данные измерения плотности были получены на плотномере Anton Paar DMA5000M с точностью по температуре 0.001°C и точностью по плотности $5 \cdot 10^{-6} \text{ г/см}^3$ [4]. Мы обнаружили, что период повторяемости *ripple*-фазы этой смеси уменьшается при увеличении отношения массы ДПФХ:ПОФХ (г·%/г·%). Важно отметить, что для температурной точки главного фазового перехода не обнаружено каких-либо существенных изменений в пределах ошибки метода и прибора. Полученные результаты сравниваются с приведенными в литературе особенностями поведения мембран при исследовании структуры [5, 6].

1. Kosterlitz J., Michael. Kosterlitz–Thouless physics: a review of key issues. Reports on Progress in Physics. 79.2 026001 (2016).
2. Kharakoz D. P. On a possible biological role of the phase transition liquid-solid in biological membranes. Usp. Biol. Khim., 41, 333-364 (2001).
3. Kuklin A.I., A. Kh Islamov and V. Gordeliy. Scientific reviews: Two-detector system for small-angle neutron scattering instrument. Neutron News, 16.3 16-18, (2005).
4. <http://www.anton-paar.com/corp-en/products/details/density-and-sound-velocity-meter-dsa-5000-m/>
5. Soloviov D.V. et al. Ripple phase behavior in mixtures of DPPC/POPC lipids: SAXS and SANS studies. Journal of Physics: Conference Series. 351(1), IOP Publishing (2012).
6. Zhernenkov M. et al. Revealing the mechanism of passive transport in lipid bilayers via phonon-mediated nanometre-scale density fluctuations. Nature communications, 7 (2016).

Роль сигнального пути Notch в остеогенной дифференцировке мезенхимных стволовых клеток

Семенова Д. С., Малашичева А. Б.

*Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия*

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

daria.semenova1994@gmail.com

Сигнальный путь Notch играет ключевую роль в развитии и регуляции органов и тканей в эмбриогенезе, а также в поддержании гомеостаза тканей во взрослом организме [1]. Нарушения, связанные с функционированием этого сигнального пути, приводят к возникновению широкого спектра патологий, связанных в большей степени с различными отклонениями в развитии костной ткани, а также с заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

Роль сигнального пути Notch в запуске дифференцировки МСК остается неясной, так как в литературе имеются данные о том, что активация этого сигнального пути может приводить как к усилению, так и к подавлению остеогенной дифференцировки [2, 3].

Целью данной работы было изучить влияние нескольких различных компонентов сигнального пути Notch на остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток человека (МСК).

Остеогенную дифференцировку МСК запускали при помощи добавления в среду для культивирования специфических индукторов. Оценку дифференцировки проводили при помощи анализа экспрессии генов остеодифференцировки методом количественной ПЦР, а также путем окраски культур клеток ализариновым красным на отложения фосфатов

кальция. Активацию сигнального пути Notch проводили путем введения в клетки на лентивирусном носителе одного из четырех различных компонентов Notch: Maml1, Dll4, Jag1, NICD – Notch intracellular domain, активированный внутриклеточный домен Notch1.

Мы показали отсутствие влияния факторов Maml1 и Dll4 на остеогенную дифференцировку МСК. В то же время, введение Jag1, либо NICD дозо-зависимо усиливало индукцию остеогенной дифференцировки клеток. Также мы показали, что эффективность остеогенной дифференцировки и степень активации сигнального пути Notch зависит от межклеточных взаимодействий. Полученные в данной работе результаты говорят о тканеспецифичном действии разных компонентов семейства Notch, а также о его способности модулировать остеогенную дифференцировку, влияя на ее эффективность за счет силы сигнала, который передается клеткам.

1. Fre S., Bardin A. et al. Notch signaling in intestinal homeostasis across species: the cases of *Drosophila*, *Zebrafish* and the mouse. *Exp. Cell Res.*, 317, 19 (2011).
2. Canalis E. Notch signaling in osteoblasts. *Science Signaling*, 1, 17 (2008).
3. Liu P., Ping Y. et al. Anabolic actions of Notch on mature bone. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 113, 15 (2016).

Изменчивость гена F штаммов респираторно-синцитиального вируса человека, выделенных в 2013–2016 годах в Санкт-Петербурге

*Синцова К. С.^{1,2}, Фадеев А. В.¹, Кривицкая В. З.¹,
Петрова Е. Р.¹, Комиссаров А. Б.¹*

¹ Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия

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

kseniya.sintsova1994@gmail.com

Целью работы являлась молекулярно-генетическая характеристика штаммов респираторно-синцитиального вируса человека (РСВ), циркулировавших на территории Санкт-Петербурга в период 2013–2016 гг.

РСВ – одна из причин, вызывающих серьезные нарушения в работе дыхательной системы среди детей, пожилых людей, а также людей с иммунодефицитами. На данный момент не существует вакцин от РСВ, а также направленных против данного вируса лекарственных препаратов.

РСВ принадлежит к роду *Pneumovirus* семейства *Paramyxoviridae*. Изоляты разделяют на две антигенные группы: А и В. Геном РСВ представлен несегментированной однонитевой антисмысловой РНК, которая содержит 10 генов. Наибольший интерес представляют поверхностные гликопротеины: F (белок слияния) и G (белок присоединения). F-белок обеспечивает слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной, а также мембран соседних инфицированной и неинфицированной клеток (fusion- механизм) [1].

Методом ПЦР из 6207 образцов, полученных от пациентов, госпитализированных с ОРВИ в 2013–2016 гг. в С.-Петербурге, РСВ был обнаружен в 1745 образцах (28,11 %). При этом более 31 % образцов, положительных на РСВ, приходилось на детей в возрасте до полугода, более 54 % – на детей от полугода до 5 лет.

Для анализа изменчивости гена F было проведено капиллярное секвенирование 24 изолятов, выделенных в 2014–2016 гг. По результатам ОТ-ПЦР в реальном времени они были отнесены к антигенной группе А. Согласно критериям Кимуры [2], 19 изолятов можно отнести к генотипу GA2, для которого характерны аминокислотные замены (по сравнению со штаммом Long) V384I и N276S. Особый кластер составили 5 штаммов, у которых выявлена замена V384I, и отсутствует мутация в положении 276. Поскольку замена V384I характерна для всех выделенных Кимурой генотипов РСВ-А, а другие установленные нами мутации не укладываются в предложенную им схему, классифицировать эту группу изолятов на данный момент не представляется возможным. Следует отметить, что 276 положение находится в антигенном сайте II, а 384 – в антигенном сайте I [3]. Филогенетический анализ данных изолятов показал близость 19 из них к эталонному штамму, принадлежащему к генотипу ON1,

отдельную группу составили 5 штаммов, которые оказались ближе к вирусам-прародителям (Long, A2).

1. Lamb R.A., Parcs G.D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe D.M., Howley P.M., editors. Fields Virology. 5.1. Wolters Kluwer: Lippencott Williams and Wilkins. 1449–1496 (2007).
2. Kimura H., Nagasawa K. et al. Molecular evolution of the fusion protein gene in human respiratory syncytial virus subgroup A. Infect. Genet. Evol. 43, 398-406 (2016).
3. Tapia L.I., Shaw C.A. et al. Gene sequence variability of the three surface proteins of human respiratory syncytial virus (HRSV) in Texas. PLoS One, 9(3), e90786 (2014).

Конформационные изменения полиаминокислот в условиях молекулярного краудинга

Ситдикова А. К.^{1, 2}, Фонин А. В.¹, Кузнецова И. М.¹, Туроверов К. К.^{1, 2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

asia28298@yandex.ru

Белки функционируют во внутриклеточном пространстве в условиях молекулярного краудинга, т. е. в условиях, когда свободный объем, занятый молекулами, существенно ограничен. Условия краудинга моделируются *in vitro* высококонцентрированными растворами инертных полимеров (краудинг агентов). Одним из таких краудинг-агентов является полиэтиленгликоль (ПЭГ). Известно, что молекулярный краудинг может оказывать существенное влияние на структуру, стабильность и фолдинг белков [1]. Целью данной работы было на примере конформационных изменений двух гомополипептидов – полилизина (PLK) и полиглутаминовой кислоты (PLE) смоделировать рН-индуцированные структурные изменения нативных неупорядоченных белков в условиях молекулярного краудинга. Исследования были выполнены в растворах ПЭГ различной молекулярной массы (12000, 4000 и 600 Да) и концентрации (80, 200 и 300 мг/мл). Известно, что структура PLK в кислой и нейтральной среде является неупорядоченной, при сдвиге рН в щелочную область наблюдается образование этим пептидом α -спирали. Переход неупорядоченный клубок – α -спираль PLE наблюдается при сдвиге рН из нейтральной в кислую область [2]. Показано, что в высококонцентрированных (200 и 300 мг/мл) растворах ПЭГ 12000 и 4000 Да наблюдается существенное смещение ($pH > 2$) середины перехода между развернутым и упорядоченным состояниями полилизина в более кислую область. Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях краудинга полилизин значительно легче образует упорядоченную структуру по сравнению с разбавленными растворами.

Установлено, что структура и фазовый переход полиглутаминовой кислоты практически не зависят ни от концентрации, ни от молекулярной массы, ни от наличия в растворе краудинг-агентов в целом. Возможно, различное действие ПЭГ на полилизин и полиглутаминовую кислоту связано с различными зарядами боковых групп данных полиаминокислот.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 14-24-00131).

1. Kuznetsova, I.M. et.al. Int. J. Mol. Sci., 15(12), 23090-140 (2014).
2. M. Fändrich, Ch.M. Dobson. EMBO J., 21(21), 5682–5690 (2002).

Действие составных пептидов и фуллеренолов на формирование фибрилл пептидом Аβ *in vitro*

Слободина А. Д.^{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

sashylikslobodina@mail.ru

Наиболее распространенной формой нейродегенеративных заболеваний в современном обществе является болезнь Альцгеймера (БА), сопровождающаяся прогрессирующим когнитивным снижением, расстройством памяти и речи, накоплением в головном мозге фибриллярных агрегатов амилоидного пептида бета, состоящего из 42 аминокислот (Аβ₄₂). Сегодня ведутся интенсивные работы по поиску препаратов, способных замедлять или предотвращать агрегацию амилоидов, а также разрушать уже сформировавшиеся агрегаты.

В ходе работы были определены пептиды, блокирующие различные стадии образования амилоидных фибрилл: TTR 37-43 – ADDTWER, SH5 – RRKIRR и SH8 – RHVLPKVQA. Однако эти пептиды не могли проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), поэтому мы присоединили к ним вектора, способные проходить через клеточные мембраны и ГЭБ. В качестве векторов были использованы короткие пептиды – домены белковой трансдукции – TP2 и Arg9, а также пептид-миметик аполипопротеина Е – Cog14-10.

Аβ-индуцированный окислительный стресс, по мнению многих исследователей, является одной из причин возникновения БА. В качестве соединений, предотвращающих негативные последствия окислительного стресса, можно использовать фуллерены и их производные.

Цель работы – исследование эффекта составных пептидов (пептид-ингибитор + пептидный вектор) и фуллеренолов C₆₀(ОН)₃₀, C₇₀(ОН)₃₀,

C₁₂₀O(OH)_n на агрегацию синтетического Aβ₄₂ и оценка их способности ингибировать рост фибрилл *in vitro*. Для этого были использованы методы электронной и атомно-силовой микроскопии.

Методами электронной и атомно-силовой микроскопии показано, что инкубация Aβ₄₂ с изучаемыми составными пептидами или фуллеренолами снижает агрегацию Aβ₄₂. Следовательно, фуллеренолы и составные пептиды, как и одиночные, обладают антиамилоидной активностью. Полученные результаты открывают перспективы для создания на основе этих соединений терапевтических препаратов для лечения БА.

Работа поддержана грантами РФФИ № 15-29-01350 офи_м.

Роль модификаций хроматина в жировой дифференцировке

Смирнов Д. Д.¹, Дмитриева Р. И.^{1, 2}

¹ Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

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

mitya.smirnov@gmail.com

Введение. Рост жировой ткани происходит как за счет увеличения количества липидов в уже существующих адипоцитах (гипертрофия), так и в результате дифференцировки преадипоцитов в новые жировые клетки (гиперплазия). Гипертрофия ведет к «перегрузке» адипоцита липидными каплями, в результате чего развиваются резистентность к инсулину, метаболические нарушения, воспалительные реакции. Гипертрофия и гиперплазия регулируются множеством механизмов. В работе был выполнен анализ экспериментальных подходов, позволяющих исследовать различные механизмы роста жировой ткани.

Методы и результаты. Анализ корреляции экспрессии регуляторов роста и функций жировой ткани на разных стадиях адипогенеза подтвердил возможность использования *in vitro* модели для исследования механизмов дифференцировки и для изучения функциональных свойств адипоцитов. Скрининг экспрессии регуляторов эпигенетических модификаций выявил различия в динамике экспрессии HDAC класса IIa на разных этапах адипогенеза. Были обработаны и проанализированы Sage данные по экспрессии при *in vitro* дифференцировке преадипоцитов в адипоциты из базы данных FANTOM5. Посредством метода главных компонент было выявлено значительное отличие в профиле экспрессии генов на 4 и 8 дни адиподифференцировки. Между 8 и 12 днем адиподифференцировки существенных различий не наблюдалось, что было подтверждено анализом

дифференциально экспрессирующихся генов. Посредством пакета limma для R были получены гены, дифференциально экспрессирующиеся в ходе адиподифференцировки, которые были кластеризованы по динамике экспрессии с помощью R-пакета Time-course gene set analysis, проаннотированы в программном обеспечении DAVID Gene Ontology с визуализацией посредством веб-приложения ReviGO. Данный подход по анализу дифференциальной экспрессии был реализован как для полного массива данных, так и для группы из 664 генов, отвечающих за эпигенетические модификации, отобранных на основе данных литературы и баз данных.

Заключение: было показано, что механизмы гиперплазии и гипертрофии можно исследовать *in vitro* на ранних (1–4 день) и поздних (8–12 день) сроках дифференцировки.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-15-1078 от 18.05.2016.

Получение термостабильных форм глюкоамилазы гриба *Aspergillus awamori* с помощью случайного мутагенеза

*Соболева Е. В.¹, Шмидт А. Е.², Сергеев В. Р.¹,
Швецов А. В.², Суржик М. А.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

Глюкоамилаза (КФ 3.2.1.3. 1,4- α -D глюкан-глюкогидролаза, ГА) катализирует гидролиз α -1-4-гликозидных связей с отщеплением глюкозных остатков от нередуцирующих концов крахмала, гликогена, мальтоолигосахаридов. Фермент имеет температурный оптимум в интервале 55–60 °С.

ГА активно применяется в составе ферментативных смесей для гидролиза крахмала в промышленном производстве фруктозо-содержащих сиропов и биоэтанола [1, 2]. Большинство технологических процессов проходят при температурах выше 80 °С. Используемая в настоящее время ГА необратимо инактивируется при температурах выше 60 °С, что вынуждает производителей вводить дополнительный этап охлаждения промежуточного продукта до более низких температур. Получение высокоактивной термостабильной ГА позволит осуществлять одностадийный комбинированный гидролиз крахмала, что приведет к значительному уменьшению себестоимости конечных продуктов.

Для получения термостабильных форм ГА была разработана методика, которая включала в себя несколько этапов. Первый этап заключался в создании спонтанных мутаций в гене ГА. Для этого был проведен случайный мутагенез части гена, кодирующей каталитический домен, методом ошибочной полимеразной цепной реакции. На втором этапе продукты ПЦР клонировали в новую эписомную плазмиду рРЕН α . Таким образом, была создана библиотека плазмид. Далее проводили трансформацию в клетки GS115 *Pichia pastoris*. На третьем этапе проводили отбор трансформантов по специфической ферментативной активности. Четвертый этап заключался в селекции термостабильных мутантных форм ГА.

В результате скрининга 1500 дрожжевых клонов было отобрано 3 клон, которые экспрессировали ГА с повышенной термостабильностью. Результаты измерений подтвердили, что у всех отобранных белков скорости инактиваций были значительно ниже, чем у белка дикого типа, что свидетельствует об их повышенной термостабильности. Далее полученные мутации были идентифицированы.

В данной работе оптимизирован метод направленной эволюции для получения термостабильных форм ГА гриба *Aspergillus awamori* в клетках *Pichia pastoris*. С помощью данного метода получены мутантные формы ГА, обладающие повышенной термостабильностью по сравнению с белком дикого типа.

1. Coutinho P.M., Reilly P.J. Glucoamylase structural, functional, and evolutionary relationships. *Proteins*, 29, 334-347 (1997).
2. Linares-Pasten J., Andersson M., N Karlsson E. Thermostable glycoside hydrolases in biorefinery technologies. *Curr. Biotechnol.*, 3(1), 26-44 (2014).

Посттрансляционные модификации ядерных белков хроматина HMGB1 и HMGB2 в дифференцированных клетках и ЭСК

Старкова Т. Ю., Чихиржина Е. В., Томилин А. Н.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

HMGB1 и HMGB2 относятся к большому семейству структурно-регуляторных негистоновых белков хроматина HMGB (от англ. High Mobility Group Box), принадлежность к которому опосредована наличием в их структуре двух высоко консервативных ДНК-связывающих «HMGB-доменов». Общепринятым считается, что HMGB1/2, взаимодействуя с ДНК, линкерным гистоном H1, а также с рядом транскрипционных факторов (например, TF1 и TF2), принимают участие как в структурной организации хроматина, так и в регуляции транскрипции, репликации и репарации ДНК. При этом детальные механизмы взаимодействия HMGB1/2 с ДНК и другими белками до конца не изучены. Они могут включать как изменение заряда полипептидной цепи белковых молекул посредством посттрансляционных модификаций, так и изменение структуры самих белков при переходе в активное состояние.

Цель работы – выявление модификаций белков HMGB1/2 дифференцированных и эмбрионально стволовых клеток (ES-HMGB1/2) мыши. Согласно литературным данным, окислительно-восстановительное состояние HMGB1/2 является ключевым аспектом функциональной активности белков. Анализ модификаций исследованных белков показал, что ES-HMGB1/2 характеризуются большим числом сайтов окисления метионина по сравнению с белками из дифференцированных клеток. Последнее может приводить к изменению их функциональной активности.

Впервые показано, что положение посттрансляционных модификаций ДНК-связывающих доменов белков HMGB1 и HMGB2 различно. Ацетилирование (ac) HMGB1 дифференцированных клеток мыши (зобная железа) в положениях acK50, acK59, acK65, acK68, acK81, acK86-88, acK90, acK162, метилирование (me) в положениях meR70/73, meK76, meK154, meK157, meK167, meK171 и фосфорилирование (p) в pT51/S53, pT77/Y78, pY155 положениях выявлено впервые. При этом AcK57, acK76, acK85, acK152, acK154, meK82, pY78 характерны только для белка HMGB2.

Полученные данные существенны для понимания роли негистоновых белков HMGB1/2 как в структурной организации хроматина, так и их участия в основных регуляторных клеточных процессах.

Работа выполнена на базе ФГБУН ИНЦ РАН при финансовой поддержке РФФИ (16-34-60174, 15-04-06993).

Нарушения Т-тубулярной системы миокарда крыс в условиях экспериментальной эдемы

Степанов А. В.^{1,2}, Бобков Д. Е.¹, Сакута Г. А.¹, Кубасов И. В.², Дерке Ш.^{2,3}

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

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

³ *Университет штата Огайо, Колумбус, США*

botanik2407@gmail.com

Т-трубочки кардиомиоцитов представляют собой упорядоченную систему инвагинаций плазматической мембраны. Они проводят электрический сигнал внутрь миоцита для активации внутриклеточного высвобождения ионов Ca^{2+} , что приводит к сокращению мышцы. Значительное remodelирование Т-тубулярной системы обычно связывают с нарушением сократительной функции миокарда при различных хронических патологиях сердца, включая сердечную недостаточность. Тем не менее, последствия острого стресса, такие как интерстициальный отек (эдема), который часто наблюдается при инфаркте миокарда, и их влияние на систему Т-трубочек недостаточно изучены. В настоящей работе мы исследовали влияние экспериментального отека миокарда на структурную целостность системы Т-трубочек в интактных сердцах, перфузируемых по методу Лангендорфа. Для визуализации Т-трубочек перфузию сердец осуществляли раствором с добавлением связывающегося с мембранами красителя Di-8-ANEPPS и водорастворимого красителя Родамин В. Исследование субэпикардальных слоев миокарда проводили с помощью конфокального микроскопа. Интерстициальную эдему (ИЭ) индуцировали путем увеличения осмолярности перфузирующего раствора путем добавления маннитола (140 мМ/л). Мы обнаружили, что ИЭ приводит к значительным нарушениям организации Т-трубочек, в том числе к их вакуолизации. Для оценки изменений структурной целостности Т-трубочек в условиях ИЭ после перфузии раствором с добавлением флуоресцентных красителей (Di-8-ANEPPS и Родамин В) проводилась их отмывка. В условиях ИЭ скорость отмывки красителей снижалась; значительная интенсивность флуоресценции оставалась даже через 30 минут после прекращения подачи красителя, чего не наблюдалось в контрольных сердцах. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что ИЭ приводит к выраженным нарушениям структурной целостности системы Т-трубочек миокарда. Подобная дезорганизация Т-трубочек может способствовать развитию сократительной дисфункции при заболеваниях сердца, связанных с ИЭ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 15-15-20008).

Влияние экспрессии N-терминального конца пресенилина-1 на депо-управляемый кальциевый вход в клеточной модели болезни Альцгеймера

Суслова М. А.¹, Скобелева К. В.²

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

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

liren@list.ru

Введение. Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной причиной деменции. В гене белка пресенин-1 (PS1) обнаружено наибольшее число мутаций (44 %), ассоциированных с наследственной БА. PS1 катализирует работу γ -секретазного комплекса, разрезающего белок предшественник амилоида (APP) до β -амилоида (A β). Некоторые мутации в гене белка PS1 приводят к нарушению разрезания APP и накоплению агрегатов A β , что является гистологическим признаком болезни Альцгеймера. В ходе созревания полноразмерный PS1 подвергается автокаталитическому разрезанию на N- и C-терминальные фрагменты. В нейронах больных БА нарушен кальциевый гомеостаз, в том числе работа внутриклеточных кальциевых депо. Считается, что PS1 участвует в регуляции активности кальциевых каналов. Накопление полноразмерной формы PS1 приводит к увеличению депо-управляемого входа кальция. Механизм такого патологического увеличения входа кальция не известен. Нами было сделано предположение о конкуренции между полноразмерным белком PS1 и его терминальными фрагментами за связь с мишенью, вовлеченной в регуляцию кальциевого гомеостаза.

Цель работы. Исследовать влияние экспрессии N-терминального фрагмента PS1 на увеличенный депо-управляемый вход в клеточной модели болезни Альцгеймера.

В качестве модельных клеток были использованы клетки Neuro2a с экспрессией различных форм PS1. Внутриклеточное содержание Ca²⁺ измеряли с помощью флуоресцентного зонда Fura-2AM. Депо-управляемый кальциевый вход развивался после опустошения внутриклеточных кальциевых депо. Опустошение кальциевых депо осуществляли блокатором кальциевой АТФазы эндоплазматического ретикулума тапсигаргином.

В ходе работы было экспериментально показано, что экспрессия N-терминального конца PS1 совместно с его полноразмерной формой (мутант PS1 с делецией девятого экзона) снижает депо-управляемый кальциевый вход. При этом экспрессия N-терминального фрагмента PS1, а также его совместная экспрессия с PS1 дикого типа не приводит к изменению депо-управляемого входа кальция.

Методические подходы к детекции процесса аутофагии в мышечных клетках

*Сухарева К. С.¹, Смолина Н. А.², Головкин А. С.², Худяков А. А.²,
Князева А. А.¹, Мишанин А. И.², Костарева А. А.²*

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

² Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

k.sukhareva@gmail.com

Аутофагия – процесс, при котором компоненты клетки подвергаются деградации под действием лизосомальных ферментов, в результате чего формируется аутофагосома. В настоящее время процесс аутофагии рассматривается как одна из точек приложения ряда фармакологических подходов, в частности, при наследственной, орфанной патологии, а также при старении и сердечной недостаточности. Существенное значение для методической оценки процесса аутофагии имеет объект исследования и свойства изучаемой клеточной культуры. В данной работе проводился подбор оптимальных условий оценки процесса аутофагии в мышечных клетках мышцы линии C2C12.

В работе проводился подбор условий для реализации таких методов оценки аутофагии, как проточная цитометрия, иммуноцитохимия и иммуноблоттинг (Western Blot). Проводился поиск оптимальных условий пермеабиллизации клеток различными детергентами, подбор температурных условий, времени фиксации материала и компонентов лизирующих растворов.

Показано, что обязательным условием отдельной экстракции белка LC3 из раствораи мой и нерастворимой цитоплазматической фракции является применение детергента дигитонина в концентрации 0,025 %. При проведении проточной цитометрии обязательными являются фиксация образцов и сокращенное время отмывки, позволяющее сохранить оптимальное количество клеток для анализа на фоне применения детергентов. Показано, что использование трансфекции клеток плазмидой, несущей LC3, приводит к увеличению необходимого времени сывороточной депривации.

Оптимизированные протоколы оценки процесса аутофагии при помощи детекции отдельных фракций белка LC3 в клетках мышечной линии C2C12 могут быть эффективно использованы при изучении фундаментальных молекулярных и клеточных механизмов развития миопатий и кардиомиопатий.

1. Elliott P., Andersson B., Arbustini E. et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.*, 29(2), 270-276 (2008).
2. Vanderpluym C., Graham D., Almond C. et al. Survival in patients removed from the heart transplant waiting list before receiving a transplant. *J. Heart Lung Transplant.*, 33(3), 261-269 (2014).
3. Bhuiyan M., Pattison J., Osinska H. et al. Enhanced autophagy ameliorates cardiac proteinopathy. *J. Clin. Invest.*, 123(12), 5284-5297 (2013).

Изучение специфической противовирусной активности терапевтических антител в отношении вируса гриппа А

*Тараскин А. С.^{1,2}, Барановская И. Л.^{1,2},
Клотченко С. А.¹, Сергеева М. В.¹*

¹ Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия

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

taraskin_07@bk.ru

Вирус гриппа А является наиболее распространенным и опасным возбудителем респираторной инфекции у человека и вызывает ежегодные эпидемии в мире [1]. В настоящий момент список эффективных специфических противовирусных препаратов, способных справиться с данным заболеванием, очень ограничен. Учитывая постоянную изменчивость возбудителя, необходимо универсальное лекарство, чувствительное сразу к нескольким подтипам вируса [2].

Терапевтические антитела являются удобным препаратом, обладающим высокой специфичностью, эффективностью и малой токсичностью [3]. Сотрудниками МГУ им. М. В. Ломоносова был получен набор различных иммуноглобулинов человека, кросс-специфичных к гемагглютиниnam различных подтипов вируса гриппа А. В работе представлены характеристики данных препаратов и проверена их противовирусная эффективность *in vivo*. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) была продемонстрирована возможность связывания исследуемых антител с различными штаммами вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2. Для проверки противовирусной активности *in vivo* был выбран пандемический штамм A/California/07/2009 (H1N1pdm09), в качестве исследуемых животных – мыши породы BALB/c, самки. Мышам интраназально вводили исследуемые препараты, содержащие терапевтические антитела, по 40 мкг на мыш. Через 8 часов мышей интраназально заражали вирусом гриппа A/California/07/2009 (H1N1pdm09), по 30 мкл на мыш, содержащих 10⁵ 50%-х мышинных

летальных доз. Через 72 часа после начала эксперимента у 5 мышей из каждой группы была установлена вирусная нагрузка в гомогенатах легких методами ИФА и с помощью титрования на клетках MDCK. У остальных мышей в течение 14 дней с начала эксперимента проверяли смертность и массу тела. Полученные результаты позволяют установить наличие статистически значимых различий между контрольной группой, получавшей плацебо (фосфатно-солевой буфер), и группами, получавшими исследуемые препараты, что позволяет сделать вывод об эффективности данных лекарственных соединений в отношении вируса гриппа А. Таким образом, разработанные терапевтические антитела могут претендовать на роль нового противовирусного средства против гриппа, однако требуют дальнейших доклинических испытаний.

1. Ghebrehewet S., P. MacPherson and A. Ho. Influenza. The BMJ, 355, i6258 (2016).
2. Laborda P., Wang S. Y., Voglmeir J. Influenza Neuraminidase Inhibitors: Synthetic Approaches, Derivatives and Biological Activity. Molecules, 21(11), 1513 (2016).
3. Yang F., Wen W., Qin W. Bispecific Antibodies as a Development Platform for New Concepts and Treatment Strategies. Int. J. Mol. Sci., 18(1), 48 (2016).

Использование магнитных наночастиц для исследования тропизма мезенхимальных стволовых клеток на крысиной модели глиомы

*Тимин Г. В.^{1, 2}, Толкунова Е. Н.¹, Николаев Б. П.³,
Рыжов В. А.⁴, Шевцов М. А.¹*

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

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

³ *Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург, Россия*

⁴ *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

grifonsky@rambler.ru

Феномен направленной миграции мезенхимальных стволовых клеток (МСК) к опухоли мозга открывает возможности для применения МСК в таргетинговой противоопухолевой терапии глиом. Известно, что при внутривенном введении МСК, несущих терапевтический агент, только часть клеток достигает опухолевого очага, тогда как оставшаяся часть оседает в здоровых органах, тем самым делая их побочными мишенями противоопухолевой терапии. В данной работе мы ставим целью получить биораспределение МСК в организме, и тем самым оценить эффективность

использования МСК для доставки противоопухолевых веществ по отношению к возможным рискам.

В качестве модели опухоли мозга нами была выбрана крысиная ортотопическая модель глиомы С6. В качестве способа мечения МСК для детекции их в организме крысы после внутривенного введения были выбраны магнитные наночастицы (МНЧ), концентрацию которых можно надежно определить методом регистрации второй гармоники намагниченности продольного нелинейного отклика на слабое *ac* магнитное поле в зависимости от напряженности параллельного ему *dc* поля [1]. Данный метод обладает высокой чувствительностью и был успешно применен ранее для получения биораспределения конъюгатов МНЧ с белком теплового шока Hsp70 у крыс с инфарктом миокарда [2].

Клеточная линия МСК была получена из первичной культуры клеток красного костного мозга бедренных и большеберцовых костей взрослой крысы и охарактеризована по экспрессии поверхностных молекулярных маркеров (CD34, CD44, CD73, CD90, CD105) методом проточной цитометрии. МНЧ из магнетита, покрытые декстраном, были синтезированы и охарактеризованы по размеру, агрегационной устойчивости и магнитным свойствам по методике, отработанной ранее [3]. С помощью электронной микроскопии и гистологической окраски на ионы железа, мы показали, что МСК можно пометить магнитными наночастицами путем добавления МНЧ в среду культивирования. Результаты исследования биораспределения в настоящий момент находятся на стадии накопления данных для последующей статистической обработки.

1. Рыжов В.А., Завацкий Е.И. Устройство для исследования магнитных свойств магнетиков. Патент № 2507527 от 20.02.2014.
2. Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Ryzhov V.A. et al. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 12(3), 611-621 (2016).
3. Nikolaev B.P. et al. 8th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers. 1311(1), AIP Publishing (2010).

Акустический пинцет как метод изучения аппарата биосинтеза белка

*Толичева О. А.^{1, 2, 3}, Побегалов Г. Е.², Полесскова Е. В.¹,
Ходорковский М. А.², Коневега А. Л.^{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*

³ *Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия*

Синтез белка в клетке – тонко регулируемый многостадийный процесс, происходящий на рибосомах. Силу взаимодействия между рибосомой и ее естественными субстратами можно изучать с помощью одномолекулярных методов, в т. ч. с использованием «акустического пинцета» [1]. В работе использована установка AFS (LUMICKS, Нидерланды). Нами была разработана и опробована конструкция, позволяющая измерять силу разрыва между мРНК и рибосомным комплексом в различных функциональных состояниях. Взаимодействие мРНК-рибосома зависит от функционального состояния комплекса, буферных условий, наличия специфических ингибиторов трансляции. Представленный экспериментальный подход впервые применен к прокариотической системе биосинтеза белка. Преимуществами метода являются: малые количества используемого материала; возможность наблюдения за большим количеством (50–200 шт.) индивидуальных молекул (комплексов) одновременно. Рабочий диапазон сил, измеряемых в данной системе, составляет от 3 до 100 пН, что позволяет как измерить силу разрыва между мРНК и рибосомой (ожидается значение около 15 пН), так и проверить прочность остальных соединений в изучаемой конструкции. Актуальным применением данной системы в будущем может стать отбор веществ, претендующих на роль антибиотиков – ингибиторов биосинтеза белка.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 14-34-00023.

1. Sitters G. et al. Acoustic force spectroscopy. Nature methods, 12(1), 47-50 (2015).

Изучение взаимодействия белков с дихлородиамминплатиной методом ИК-спектроскопии

Травкина В. И.¹, Белая И. А.¹, Чихиржина Е. В.², Поляничко А. М.^{1, 2}

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

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

travkinaveronika@gmail.com

В настоящее время лечение злокачественных новообразований является актуальной задачей. В медицинской практике применяется ряд противоопухолевых препаратов, созданных на основе координационных соединений платины, среди которых одним из самых известных и распространенных является цисплатин (*цис*-дихлородиамминплатина(II), *цис*-ДДП). Эти лекарственные препараты нацелены на взаимодействие с ДНК и белками в клетке. Однако, молекулярные механизмы действия данных соединений остаются до конца не ясными. Вместе с тем, понимание этих механизмов необходимо как для усовершенствования уже имеющихся лекарств, так и для создания новых препаратов.

В данной работе изучали взаимодействие *цис*- и *транс*-ДДП с бычьим сывороточным альбумином (БСА) методом ИК-спектроскопии. Применение ИК-Фурье-спектроскопии позволило изучить комплексы ДДП / БСА в растворах D₂O с использованием концентрации белка близкой к физиологическому уровню (30 мг/мл) в диапазоне молярных соотношений платины к БСА от 1:1 до 150:1. В этих условиях мы наблюдали образование относительно слабых нековалентных межмолекулярных белковых комплексов. Анализ ИК-спектров в области полосы амид I' показал, что при образовании комплексов доля α -спиральных участков в белке уменьшается от ~ 65 % до примерно 55 % и 48 % в присутствии *цис*- и *транс*-ДДП, соответственно. Вместе с тем, наблюдается увеличение количества β -структур с ~ 15–20 % в свободном белке до 20–30 % в его комплексах с *цис*-ДДП и до 35–40 % в комплексах с *транс*-ДДП.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-08-06876 и № 15-04-06993). Часть работ была выполнена с использованием оборудования ресурсных центров Санкт-Петербургского государственного университета: «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники» и «Оптические и лазерные методы исследования веществ».

Флуоресцентномеченые тРНК для изучения трансляции

Трескова Д. А.^{1, 2, 3}, Максимова Е. М.^{1, 2}, Касацкий П. С.^{1, 2},
Полесскова Е. В.¹, Коневега А. Л.^{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

³ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Высокая изменчивость генетического материала бактерий обеспечивает высокий уровень приспособляемости патогенов к антибактериальной терапии, стимулируя научное сообщество к поиску новых антибиотиков.

Данный проект представляет собой этап разработки тест-системы, для идентификации новых веществ-ингибиторов отдельных реакций биосинтеза белка, которые можно в дальнейшем рассматривать как потенциальные антибиотики. Тест-система чувствительна к ингибиторам реакции аккомодации, процессу доставки аминоацил-тРНК в А-сайт рибосомы в процессе биосинтеза белка. Нарушения на данном этапе трансляции приводят к гибели клетки. Тест-система состоит из 70S рибосомы *Escherichia coli*, мРНК, молекулы тРНК в Р-сайте, содержащей флуорофор (донор), и молекулы тРНК, содержащей нефлуоресцентный хромофор (акцептор), доставляемой в А-сайт. *In vitro* была получена не содержащая модификаций тРНК^{Phe}, которая была специфически модифицирована с образованием тиюридина в положении 8. Получены меченая хромофором-акцептором транскрибированная тРНК^{Phe} и меченная хромофором-донором инициаторная тРНК-fMet. Функциональная активность соединений была подтверждена в реакциях аминоацилирования, получены гомогенные препараты аминоацил-тРНК. Была проведена серия экспериментов остановленного потока с тРНК^{fMet}, меченной хромофором-донором, в которых удалось посредством методики FRET оценить вклады специфических и неспецифических взаимодействий А-сайтовой тРНК с рибосомным комплексом в присутствии антибиотика тетрациклина, конкурирующих немеченых тРНК^{fMet}, мРНК, кодирующая пептид Met-Val, для выявления уровня взаимодействия в отсутствие комплементарного кодона. В дальнейшем планируется повторить эти эксперименты с участием транскрибированной флуоресцентномеченой тРНК^{Phe}, подтвердить и уточнить качественные и количественные отличия сигналов флуоресценции в присутствии и в отсутствие тетрациклина с учетом вклада неспецифических взаимодействий.

Работа выполнена при поддержке РФФИ 14-34-00023.

Сравнительный анализ фокусов белков репарации γ H2AX и Rad51 при остром и пролонгированном облучении в пролиферирующих и покоящихся мезенхимальных стволовых клетках

Цветкова А. Д., Озеров И. В., Пустовалова М. В., Грехова А., Осипов А. Н.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия
Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна, Москва, Россия
Федеральное медико-биологическое агентство России, Москва, Россия*

Наиболее критической формой повреждения ДНК после воздействия ионизирующего излучения являются двунитевые разрывы (ДР) ДНК. От соотношения процессов индукции и репарации ДР ДНК зависит дальнейшее выживание клетки или вступление на один из путей клеточной гибели. В свою очередь, процессы индукции и репарации ДНК зависят от режима облучения (в частности, для редкоионизирующего рентгеновского излучения). В данной работе исследованы процессы индукции и репарации ДР ДНК в пролиферирующих и покоящихся субпопуляциях мезенхимальных стволовых клеток человека при остром и пролонгированном облучении.

В работе показано, что процессы индукции и репарации отличаются как в зависимости от режима облучения, так и от пролиферативной активности клеток. Показано достоверное отличие количества фокусов белка γ H2AX и Rad51 в контроле для двух субпопуляций клеток. Количество фокусов γ H2AX достоверно больше в пролиферирующих клетках в контроле, белок Rad51 отсутствует в покоящихся клетках вовсе. Таким образом, ДР ДНК образуются в контроле только в пролиферирующих клетках. В экспериментальных облученных клетках число фокусов γ H2AX возрастает линейно при остром облучении и выходит на плато при пролонгированном режиме. Таким образом, при пролонгированном облучении процессы индукции и репарации ДР ДНК приходят в динамическое равновесие. При пролонгированном облучении число фокусов γ H2AX достоверно больше для пролиферирующих клеток, чем для покоящихся. Также при пролонгированном облучении достоверно отличается количество фокусов белка Rad51 в покоящихся и пролиферирующих клетках. При этом фокусы Rad51 практически отсутствуют в покоящихся клетках, в то время как в пролиферирующих клетках их число возрастает линейно с возрастанием времени облучения.

Таким образом, в работе показаны отличия в особенностях репарации ДР ДНК в пролиферирующих и покоящихся клетках при пролонгированном режиме облучения. Данные результаты могут быть интересны, как в отношении радиационной безопасности, так и в отношении радиотерапии злокачественных новообразований.

Метод сингулярного разложения в анализе структурной кинетики формирования пресинаптического комплекса белка RecA по данным времяразрешенного малоуглового рентгеновского рассеяния

*Черемных Т. А.^{1,2}, Байтин Д. М.², Швецов А. В.²,
Лебедев Д. В.², Исаев-Иванов В. В.²*

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

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

st013998@student.spbu.ru

Белок RecA является ферментом, играющим ключевую роль в процессах гомологической рекомбинации и рекомбинационной репарации в прокариотических клетках. Функция данного белка заключается в поиске гомологичных участков и осуществлении обмена нитями между двунитевой и однострелевой ДНК. Этим процессам предшествует пресинаптическая стадия, включающая мультимеризацию белка RecA вдоль однострелевой ДНК в присутствии АТФ и ионов магния.

Процесс образования активного пресинаптического филамента представляет интерес для изучения, так как механизмы поиска гомологии еще не могут считаться до конца установленными. Метод времяразрешенного малоуглового рентгеновского рассеяния (ВР-МУРР) позволяет напрямую отследить изменение структуры комплекса на сравнительно коротких временах протекания реакции, что особенно актуально для исследования биологических объектов в условиях, близких к нативным.

Анализ структурной кинетики комплекса по данным ВР-МУРР был проведен методом сингулярного разложения (SVD), который является эффективным методом для определения минимального числа элементов, необходимых для восстановления набора данных, собранных во время изменения ряда экспериментальных условий. В результате анализа данных были получены характерные компоненты изменений спектра рассеяния белка RecA и определены их кинетические параметры.

Применение современных методов молекулярного моделирования совместно с экспериментальными данными

Швецов А. В.

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

Бурное развитие методов молекулярного моделирования, а также вычислительной техники в последнее десятилетие делает возможным использовать полноатомные модели совместно с различными экспериментальными данными. Методы молекулярной динамики позволяют сейчас рассчитывать системы, содержащие до нескольких миллионов атомов на временах порядка микросекунд, что уже позволяет производить прямое сравнение полученных моделей с экспериментальными данными. В качестве них могут выступать данные малоуглового рассеяния нейтронов, нейтронного спинового эха, криоэлектронной микроскопии, FRET, а также различные биохимические методики. Полноатомные молекулярные модели позволяют предсказать такие параметры, как контакты между субъединицами, возможные конформации связывания субстратов в макромолекулярных комплексах, определять «жесткие домены» в белках и другие различные структурные параметры.

Все перечисленные выше методы так же требуют разработки новых подходов и методик к анализу данных полученных методами молекулярной динамики. Для упрощения реализации новых методов необходимо иметь инструментарий, который позволяет использовать любую информацию доступную в траекториях молекулярной динамики.

Мы рассмотрим современное состояние возможных методов сравнения данных полученных с помощью методов молекулярной динамики с различными экспериментальными данными, разработанными как зарубежными коллегами, так и нами.

Микробные сульфатазы и их практическое применение

Швецова С. В., Кульминская А. А.

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

shvetsova_sv@npfi.nrcki.ru

Сульфатазы – ферменты класса гидролаз (ЕС 3.1.6), способные катализировать гидролиз ароматических эфиров серной кислоты. Эти ферменты выделены из бактерий, дрожжей, грибов, тканей животных и человека [1]. Научный интерес к сульфатазам обусловлен, в первую очередь, потребностью детально выяснить механизмы их действия, чтобы в дальнейшем иметь возможность влиять на их функциональные свойства. С другой стороны, эти ферменты находят применение в биотехнологической отрасли, сельском хозяйстве и медико-фармакологических исследованиях. В частности, их используют для десульфатирования крупных полисахаридов из природных источников, в допинговом анализе, для определения качества почвы, биоремедиации, в качестве усилителей натурального аромата сыров и молока [2].

Недавно нами обнаружен и идентифицирован штамм мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1, способный синтезировать комплекс ферментов, включающий несколько сульфатаз, которые интересны для их дальнейшего внедрения в биотехнологии и медицине [3]. В ходе работы были подобраны оптимальные условия роста и разработана схема выделения сульфатазы из *F. proliferatum* LE1 (FpS). Показано, что FpS является внутриклеточным ферментом с молекулярной массой 55 kDa. В результате нескольких стадий получен частично очищенный ферментный препарат FpS. Определены основные физико-химические параметры фермента и его кинетические характеристики в гидролизе синтетического субстрата *n*-нитрофенил сульфата (pNPS).

Работа поддержана грантом РФФИ №16-38-00881 «мол_а».

1. Hanson S.R. et al. *Angew Chemie Int. Ed. Engl.*, 43, 5736–5763 (2004).
2. Stressler T. et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(21), 9053-9067 (2016).
3. Shvetsova S.V. et al. *J. Basic Microbiol.*, 55(4), 471-9 (2015).

Противовирусная активность гетероциклических производных дегидроабиетиламина в отношении пандемического вируса гриппа

*Штро А. А.¹, Ковалева К. С.^{2,3}, Яровая О. И.^{2,3}, Шернюков А. В.²,
Зарубаев В. В.¹, Оршанская Я. Р.¹, Салахутдинов Н. Ф.^{2,3}*

¹ Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия

² Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Грипп является опасным респираторным заболеванием, которое ежегодно вызывает эпидемии, охватывающие широкие слои населения. Несмотря на большое количество существующих лекарственных средств, а также вакцинопрофилактику, эта инфекция остается актуальной для большинства стран мира. Вирус гриппа легко мутирует, вырабатывая лекарственную устойчивость, что приводит к необходимости разрабатывать новые противовирусные средства.

В настоящей работе исследовали противовирусную активность гетероциклических производных дегидроабиетиламина в отношении вируса гриппа А/California/7/09 (H1N1)pdm09. Дегидроабиетиламин – это производное дегидроабиетиновой кислоты, содержащейся в живицах хвойных растений, относящихся к родам *Pinus*, *Picea*, *Abies* и *Larix*, т. е. вещество, получаемое из дешевого и доступного в больших количествах сырья.

Из шести исследованных в настоящей работе соединений среднюю противовирусную активность проявили два – вещество **2**, несущее азепановый цикл, а также **6**, имеющее в молекуле пиррольный цикл. Полученные данные свидетельствуют о том, что группа имеет потенциал для разработки противовирусных средств, однако необходима дальнейшая оптимизация структуры соединений.

Внутренние теломерные повторы и свободные концы ДНК в развитии

*Шубернецкая О. С.¹, Оловников А. М.², Евфратов С. А.¹, Скварцов Д. А.¹,
Стрелкова О. С.³, Черепанинец В. Д.³, Жиронкина О. А.³, Зверева М. Э.^{1,3},
Донцова О. А.^{1,3}, Киреев И. И.³*

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

² *Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия*

³ *Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

olgasb21@gmail.com

Генетический материал эукариотических организмов, расположенный в ядрах, организован в виде линейных молекул ДНК, хромосом, концы которых защищены от деградации, слияний или репарации специализированными структурами – теломерами. Последовательности ДНК в составе теломер, как правило, консервативны, и у позвоночных состоят из шестинуклеотидных повторов (TTAGGG). Однако, кроме теломерных повторов на концах хромосом, функции которых хорошо изучены, практически во всех геномах существуют также внутренние теломерные повторы, роль которых не ясна.

Мы предположили, что подобная организация геномов высших эукариот может быть вызвана тем, что в ходе клеточной дифференциации могут возникать относительно стабильные во времени разрывы во внутренних областях, либо могут появляться линейные амплификаты ряда хромосомных локусов. Концы подобных участков должны быть защищены от узнавания системами репарации, и, таким образом, маркированы как дозволенные разрывы ДНК.

На модели *D. rerio* была проведена избирательная амплификация и последующее секвенирование последовательностей ДНК, заключенных между теломерными повторами, которые сопряжены с разрывами. Было показано, что подобные последовательности обнаруживаются, их набор различается в разных типах тканей, а также зависит от стадии развития организма. Последовательности, заключенные между внутренними теломерными повторами, часто оказываются сопряжены и с другими повторяющимися элементами генома. Для некоторых из них была показана транскрипционная активность, а также участие транскрипта в образовании специфических ядерных структур в фибробластах *D. rerio*, дезинтегрирующих в стареющих клетках [1].

1. Shubernetskaya O.S., Skvortsov D.A., Evfratov S.A., Rubtsova M.P., Belova E.V., Strelkova O.S., Cherepaninets V.D., Zhironkina O.A., Olovnikov A.M., Zvereva M.E., Kireev I.I., Dontsova O.A. Mol. Biol., 48(4), 563-572 (2014).

Анализ способности пептидов, блокирующих амилоидогенез амилоидного пептида бета, и фуллеренолов проходить внутрь клеток и через ГЭБ *Drosophila melanogaster*

Шувалова П. К., Большакова О. И., Шварцман А. Л., Саранцева С. В.

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

polina.shuwalowa@yandex.ru

В ранней фазе болезнь Альцгеймера (БА), являющейся наиболее распространенной формой первичных нейродегенеративных заболеваний пожилого возраста, характеризуется прогрессирующим нарушением памяти и когнитивных функций, а на более поздних стадиях происходит полный распад интеллекта и психической деятельности. Многочисленные исследования предполагают, что в основе раннего нарушения памяти и когнитивных функций лежит дисфункция синапсов, связанная с накоплением в мозге больных токсических олигомеров амилоидного пептида бета (Абета), основного компонента амилоидных бляшек, найденных у пациентов с БА. В наших предыдущих работах мы определили последовательность пептидов, ингибирующих различные стадии агрегации Абета и одновременно разработали модель БА на *Drosophila melanogaster*. В настоящей работе мы модифицировали уже созданные пептиды-ингибиторы амилоидогенеза с целью их проникновения через клеточные барьеры и гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Для этого мы использовали для этого векторные пептиды, способные проникать через клеточные мембраны (TP2, Arg9). Целью данной работы являлось исследование способности составных пептидов (пептид и векторный пептид) и фуллеренолов, проходить внутрь клеток и ГЭБ *Drosophila melanogaster*. Чтобы понять, проходят ли исследуемые нами пептиды через ГЭБ, мы провели эксперименты *in vivo* на *Drosophila melanogaster*. Для этого мы применили разработанный нами ранее метод инъекций пептидов в абдомен мух с последующей их детекцией в мозге методом конфокальной микроскопии через определенные промежутки времени. В результате исследования мы показали, что изучаемые пептиды с разной эффективностью проходят через ГЭБ. Мы также исследовали способность фуллеренолов C60, C70 и C120 проходить через ГЭБ и динамику накопления фуллеренолов в мозге *Drosophila melanogaster* через определенные промежутки времени. Для анализа использовали первичные антитела к фуллеренам и вторичные, меченые флуорохромом. Анализировали относительный уровень флуоресценции в мозге. В результате было показано, что исследованные нами фуллеренолы проходят ГЭБ и равномерно распределяются в мозге.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-29-01350.

Амилоидогенный пептид из белка РВ1 вируса гриппа, обладающий противовирусной активностью

Ягудина Я. А.¹, Шалджян А. А.¹, Лебедев Д. В.², Егорова М. А.¹,
Куклин А. И.^{3,4}, Матусевич О. В.¹, Егоров В. В.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

⁴ Московский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Россия

zabryaka@yandex.ru

На данный момент существует весьма ограниченное число препаратов для лечения гриппа. Полимеразный комплекс вируса гриппа – перспективная мишень для создания новых противовирусных средств. Известно, что участок с 1-й по 25-ю а.о. субъединицы РВ1 полимеразного комплекса вируса гриппа (далее РВ1(1-25)) играет ключевую роль при взаимодействии с субъединицей РА [1]. Причем такое взаимодействие происходит в случае, если участок РВ1(1-25) находится в альфа-спиральной конформации [2, 3].

В малых концентрациях пептид РВ1(6-13) способен взаимодействовать с N-концевым участком субъединицы РВ1 в пептидной модели [4] с образованием агрегатов. С другой стороны, пептид РВ1(6-13) обладает противовирусной активностью, показанной на клеточной модели *in vitro* [5].

В данной работе обнаружили, что пептид РВ1(6-13) в высоких концентрациях образует агрегаты. При изучении связывания агрегатов с красителем Конго красный обнаружили характерный для амилоидоподобных фибрилл сдвиг спектра поглощения данного красителя. Данные о форме фибрилл получили методами атомно-силовой микроскопии и малоуглового рассеяния нейтронов.

По совокупности полученных данных можно выдвинуть гипотезу о предполагаемом механизме действия пептида РВ1(6-13): пептид способен изменять конформацию N-концевого участка РВ1 из альфа-спирали в бета-структуру, вследствие чего нарушается связывание субъединиц РВ1 и РА, что, в свою очередь, обуславливает противовирусную активность пептида. Эту гипотезу также подтверждают данные SPR, указывающие на высокую склонность пептида к гомоолигомеризации.

Следует отметить, что по данным МУРН пептид РВ1(6-13), образовавший амилоидоподобные фибриллы, не способен взаимодействовать с пептидом РВ1(6-25). Таким образом, для осуществления противовирусного действия пептид должен находиться в растворимой форме.

1. Wunderlich K., Mayer D. et al. PLoS One, 4(10), e7517 (2009).
2. He X., Zhou J. et al. Nature, 454(7208), 1123–6 (2008).
3. Chang S., Sun D. et al. Mol. Cell, 57(5), 925–35 (2015).
4. Egorov V.V., Matusевич O.V. et al. Int. J. Pept., 2013, 370832 (2013).
5. Matusевич O.V., Egorov V.V. et al. Antiviral Res., 113, 4–10 (2015).

Пептид-ингибитор белка RecA и SOS-ответа у *Escherichia coli*

Якимов А. П.¹, Бахланова И. В.¹, Побегалов Г. Е.²,
Петухов М. Г.¹, Байтин Д. М.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

yaleks@omrb.pnpi.spb.ru

Основные классы современных антибиотиков влияют на очень ограниченное количество белков, участвующих в ключевых клеточных процессах, таких как биосинтез белков и компонентов клеточных мембран, репликации и репарации ДНК. Известно, что бактериальные клетки адаптируются к воздействию антибиотиков через активацию клеточного механизма реакции SOS-ответа и связано с повышенным мутагенезом и реструктуризацией бактериального генома. Известно, что короткие аминокислотные последовательности природных альфа-спиралей обычно не обладают достаточной конформационной стабильностью и поэтому подвержены действию различных протеаз. Поэтому для конструирования пептидов с высокой конформационной стабильностью был использован метод конструирования альфа-спиральных пептидов SeqOPT, реализующий глобальную оптимизацию их аминокислотных последовательностей. Метод позволяет получать аминокислотные последовательности с максимально возможной конформационной стабильностью при любых заданных условиях окружающей среды и при этом произвольно фиксировать любые комбинации аминокислот, если они нужны для функциональной активности пептида.

Одним из основных инициаторов бактериального SOS-ответа является белок RecA. В данной работе, на основе короткого фрагмента белка RecX (естественного ингибитора RecA) [1], методами молекулярного моделирования и программы SeqOPT [2], мы разработали новый класс коротких α -спиральных пептидов, способных эффективно ингибировать АТФазную активность RecA, реакцию переноса нитей, разбирать RecA-дцДНК-филамент и полностью блокировать бактериальный SOS-ответ как *in vitro*, так и *in vivo* в клетках *E. coli*. Пептиды являются

конформационно стабильными, состоят из немодифицированных природных аминокислот и высокоспецифичны для их белка-мишени. Разработанный нами подход может применяться для разработки ингибиторов и других белок-белковых комплексов, имеющих в своем интерфейсе α -спирали.

1. Shvetsov A., Lebedev D. et al. FEBS Lett., 588, 948-955 (2014).
2. Yakimov A., Rychkov G., Petukhov M. Methods Mol. Biol., 1216, 1-14 (2014).

Индекс

A	
Alshanaa O.R.	60
B	
Balakishiyeva G.Sh.	61
Bayramova J.Y.	61
Beljantseva Jelena	62
D	
Dzhygyr Eugene	62
F	
Fonin A.V.	60
H	
Hauryliuk Vasili	62
Huseynova I.M.	61
K	
Kudrin Pavel	62
M	
Madadli A.M.	61
O	
Oliveira Sofia	62
P	
Payoe Roshani	62
Pohl Milón	78
R	
Rejman Dominik	62
Rychkov G.N.	60
S	
Shalguev V.I.	60
T	
Tenson Tanel	4, 62
Turoverov K.K.	60
V	
Varik Vallo	62

A	
Абдуллаева Г. Р.	63
Аветисов В. А.	5
Азимов Ж.	27
Алексеева Е. А.	64
Алехина И. А.	93
Алиева Д. Р.	101
Арефьев М. И.	121
Артамонова Т. О.	72
Артеменко М. Р.	65
Астахова Л. А.	17
Афанасьев М. В.	77
Афанасьева Д. М.	66
Афоница Ж. А.	68
Аширметов А. Х.	27
B	
Бабич П. С.	108
Баженова Е. А.	111
Байдакова Г. В.	13
Байдюк Е. В.	7
Баймухаметов Т. Н.	68
Байрамова Н. К.	101
Байтин Д. М.	142, 149
Баранова Ю. Г.	69
Барановская И. Л.	70, 135
Баталова А. А.	71
Бахарев А. А.	106
Бахланова И. В.	149
Бахмет Е. И.	72
Безпрозванный И. Б.	96
Белая И. А.	139
Беркович О. А.	111
Бобков Д. Е.	6, 7, 132
Бобров К. С.	73
Богушевская В. Д.	75
Большакова О. И.	147
Бондаренко А. Б.	77
Бояринова Ю. Г.	17
Букреева Т. В.	92
Булат С. А.	93
B	
Васильев А. Л.	68, 92
Васин А. В.	8, 70, 113, 115

Величковский Б. М.	10
Верлов Н. А.	65
Виноградова Д. С.	78
Владимиров А. П.	106
Власенков С. А.	118
Власов А. В.	79
Волков В. В.	12
Володькина В. А.	80
Г	
Гагарская Ю. А.	81
Галкина С. А.	80
Гараева Л.	100
Головкин А. С.	134
Голомидов И. М.	105
Горделий В. И.	79, 122
Горшков А. Н.	77, 83
Грехова А.	141
Грудинин М. П.	84
Грунина М. Н.	86
Гусейнова И. М.	101
Д	
Дерке Ш.	7, 132
Дмитриева Р. И.	89, 128
Докшин П. М.	82
Донцова О. А.	146
Е	
Евстюхина Т. А.	64
Евфратов С. А.	146
Егоров В. В.	83, 148
Егорова А. А.	84
Егорова М. А.	148
Емельянов А. К.	100, 102, 107
Ершов Е. Е.	86
Ж	
Жемков В. А.	96
Жиронкина О. А.	146
Журишкина Е. В.	73
З	
Забельский Д. В.	119
Заботина А. М.	86
Зайцева А. К.	88
Зарубаев В. В.	145
Захарова Е. Ю.	13
Зверева М. Э.	146

Згода В. Г.	73
Зыкин П. А.	14
И	
Иванен Д. Р.	73
Иванова О. А.	89
Иванова Ю. С.	90
Иваньков А. И.	122
Ильин В. А.	68
Ильина Ю. А.	91
Ильичева Е. Ю.	108
Иоффе А. И.	16
Исаев-Иванов В. В.	21, 142
К	
Кавокин К. В.	17
Каганский А. М.	18, 19
Кадирова И.	27
Камышинский Р. А.	92
Карлов Д. С.	93
Карпушев А. В.	88
Касацкий П. С.	78, 140
Керимова К. Е.	66
Ким М. В.	96
Киреев И. И.	146
Киселев А. М.	110
Киселев О. И.	83
Клотченко С. А.	70, 135
Князева А. А.	94, 134
Ковалев Ю. С.	122
Ковалева З. В.	90
Ковалева К. С.	145
Ковальчук М. В.	68
Кожина Т. Н.	64
Кожухарова И. В.	90
Козырев Е. А.	95
Козьмин Ю. П.	115
Комиссаров А. Б.	84, 116, 125
Конев А. Ю.	91
Конева А. Л.	78, 138, 140
Копылова М. Р.	66
Копытова А. Э.	107
Корбан С. А.	96
Корниенко Ю. С.	97
Королев В. Г.	64
Королев Д. В.	75
Костарева А. А.	94, 110, 134

Краснощекова Е. И.	14
Кривицкая В. З.	125
Крупицкий Е. М.	86
Кубасов И. В.	7, 132
Кузнецова И. М.	81, 120, 126
Кузьмин А. А.	99
Куклин А. И.	79, 83, 119, 122, 148
Кулабухова Д. Г.	100
Кульминская А. А.	73, 96, 144
Купер К. Э.	95
Курбанова У. А.	101
Л	
Лавринова А. О.	102
Лебедев Д. В.	20, 21, 83, 142, 148
Лисковых М. А.	99
Литусова Е. М.	102
Люблинская О. Г.	90, 97
М	
Максимова Е. М.	140
Малашичева А. Б.	82, 112, 123
Малек А. В.	22
Мальшев А. Ю.	23
Мари Д.	93
Марченко И. В.	92
Матусевич О. В.	148
Меженская Д. А.	104
Мелентьев П. А.	105
Минеев К. С.	24, 25
Миргородская О. А.	115
Мирошникова В. В.	111
Михайлова Ю. А.	106
Михуткин А. А.	92, 114
Мишанин А. И.	134
Мошкин М. П.	95
Муслимов А. Р.	113
Н	
Назаров И. Б.	72
Нарыжный С. Н.	73
Насырова Р. Ф.	86
Николаев Б. П.	136
Николаев М. А.	102, 107
Николаев М. Ю.	119

Никольский Н. Н.	90, 97
Нургалиев И.	27
О	
Огнева И. В.	26, 27
Озеров И. В.	141
Оксенгендлер Б. Л.	27
Оловников А. М.	146
Орлов Ю. А.	108
Оршанская Я. Р.	145
Осипов А. Н.	141
П	
Павлов Г. С.	110
Павлов И. Ю.	73
Паевский А. С.	29, 50
Пантелеев А. А.	30, 32
Пантелеева А. А.	111
Парахонский Б. В.	92
Пахомов А. Ф.	17
Перепелина К. И.	112
Петрова А. В.	70, 77, 113
Петрова Е. Р.	125
Петухов М. Г.	149
Печникова Е. В.	68
Пешехонов В. Т.	64
Пичкур Е. Б.	114
Побегалов Г. Е.	138, 149
Поварова О. И.	81
Полев Д. Е.	73
Полесскова Е. В.	138, 140
Поляничко А. М.	69, 71, 121, 139
Предеус А. В.	33, 34
Протасов А. В.	115
Прохорчук Е. Б.	35, 36
Пуговкина Н. А.	90, 97
Пулькина А. А.	116
Пустовалова М. В.	141
Пчелина С. Н.	86, 100, 102, 107, 111
Р	
Разгильдина Н. А.	111
Рейхардт А. В.	118
Рижиков Ю. Л.	79, 119, 122
Рогачев А. В.	122
Родина Н. П.	120

Рожкова Н. А.	108
Романов Н. М.	69, 121
Рулев М. И.	122
Рустамова С. М.	63
Рыжов В. А.	136
Рябова Е. В.	105
С	
Сазбанова А. Д.	67
Сайфитдинова А. Ф.	80
Сакута Г. А.	7, 132
Салахутдинов Н. Ф.	145
Саранцева С. В.	37, 105, 127, 147
Сарсенгалиев А. Ж.	118
Северинов К. В.	38
Семенова Д. С.	123
Семенова И. А.	111
Сергеев В. Р.	129
Сергеева М. В.	116, 135
Синенко С. А.	72
Синцова К. С.	116, 125
Ситдикова А. К.	126
Скварцов Д. А.	146
Скобелева К. В.	133
Слободина А. Д.	127
Сломинский П. А.	39, 40
Смирнов Д. Д.	128
Смолина Н. А.	94, 110, 134
Соболева Е. В.	129
Соловьев Д. В.	122
Сорокин А. О.	41
Сорокин И. И.	68
Сосин Д. Н.	86
Сосина К. А.	86
Старкова Т. Ю.	131
Степанов А. В.	7, 132
Стрелкова О. С.	146
Стрельников В. В.	43, 44
Сулацкая А. И.	120
Султанова Н. Ф.	101
Сумачева А. Д.	73
Сумбатьян Д. А.	93
Суржик М. А.	129
Суслов Д. А.	79
Суслова М. А.	133

Сухарева К. С.	134
Сухорукова Т. В.	66
Т	
Тараскин А. С.	135
Тараскина А. Е.	86
Тимин А. С.	113
Тимин Г. В.	136
Ткаченко Л. А.	14
Толичева О. А.	138
Толкунова Е. Н.	136
Томилин А. Н.	45, 72, 99, 131
Топерверг Б. П.	46, 47
Торопова Я. Г.	75
Травкина В. И.	69, 71, 121, 139
Трашков А. П.	65
Трескова Д. А.	140
Туроверов К. К.	81, 120, 126
Ф	
Фадеев А. В.	125
Фалькович С. Г.	104
Федоров Д. В.	64
Фирсов М. Л.	48, 49
Фонин А. В.	126
Х	
Ходорковский М. А.	72, 138
Хоружая А.	50
Худяков А. А.	134
Ц	
Цветков В. Б.	70
Цветкова А. Д.	141
Ч	
Чербунин Р. В.	17
Черемных Т. А.	142
Черепанинец В. Д.	146
Чернецов Н. С.	17
Чернов Ю. О.	51, 52
Чесноков Ю. М.	92
Чихиржина Е. В.	71, 131, 139
Чувочина М. С.	93
Ш	
Шалджян А. А.	83, 148
Шварцман А. Л.	147
Швецов А. В.	129, 142, 143
Швецова С. В.	73, 144

Шевцов М. А.	136
Шернюков А. В.	145
Широков В. А.	68
Шмидт А. Е.	129
Штефля А. С.	118
Штро А. А.	145
Шубернецкая О. С.	146
Шувалова П. К.	105, 147

Э	
Энейская Е. В.	73
Ю	
Юдина А. Ю.	53
Я	
Ягудина Я. А.	83, 148
Якимов А. П.	149
Яровая О. И.	145

Отпечатано в типографии ФГБУ «ПИАФ» НИЦ «Курчатовский институт»

188300, Гатчина Ленинградской обл., мкр. Орлова роща, д. 1

Зак. 66, тир. 150, уч.-изд. л. 10; 15.02.2017 г.