

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»**

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

**XXI Зимняя молодежная школа
по биофизике и молекулярной биологии**

24–29 февраля 2020 г.

**Тезисы докладов
Молодежной конференции
Том 2**

В данном выпуске представлены материалы XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. Том 1. Научная программа. Том 2 (электронный). Тезисы докладов Молодежной Конференции, состав участников Школы.

Организатор: НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ

При поддержке: Благотворительный фонд им. В.Н. Фомичева
SkyGen ООО «Компания Хеликон»
Компания MILLAB ООО «Сниптех»
Merck ООО «Диаэм»
АО «Ритверц»

Научный руководитель школы: Ковальчук М.В.

Программный комитет:

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

Василов Р.Г. д.б.н.
Демин В.А. к.ф.-м.н.
Еремин И.И. к.мед.н.
Кириллов С.В. д.б.н.
Конев А.Ю. к.б.н.
Лебедев Д.В. к.ф.-м.н.
Максимов В.И. к.тех.н
Патрушев М.В. к.б.н.
Полесскова Е.В. к.б.н.
Пчелина С.Н. д.б.н.
Санду Р.А. д.х.н.
Трашков А.П. к.мед.н.
Шабалин К.А. к.ф.-м.н.
Яненко А.С. д.б.н.

Организационный комитет:

Председатель Коневега А.Л.
Заместитель председателя Полесскова Е.В.

Виноградова Д.С.
Доронин М.В.
Иванова Т.А.
Касацкий П.С.
Лапина И.М.
Никитина Н.В.
Орлова Е.А.
Потапова Т.А.
Рычков Г.Н.
Толичева О.А.
Швецова С.В.
Шуленина О.В.
Якимов А.П.

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

Обложка: Полесскова О.В.

Примечание: материалы напечатаны в авторской редакции.

ISBN 978-5-86763-440-7

© НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, 2020

Уважаемые коллеги, дорогие друзья!

Рад приветствовать участников и гостей XXI Зимней молодежной Школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии в Репино - одном из красивейших мест на побережье Финского залива.

Своим нынешнем именем курорт (бывшая финно-русская деревня Куоккала) обязан выдающемуся русскому живописцу Илье Репину, прожившему здесь, в усадьбе «Пенаты», последние 30 лет своей жизни. Репино стало излюбленным местом работы и отдыха отечественной творческой и научной элиты. С именами Максима Горького, Владимира Маяковского, Сергея Есенина, Александра Куприна, Ивана Бунина, Корнея Чуковского, Федора Шаляпина, Владимира Бехтерева, Ивана Павлова неразрывно связана история этого уютного и живописного места.

Репино – пригород Санкт-Петербурга, поэтому вам открывается прекрасная возможность побывать в Северной столице, насладиться величием памятников архитектуры, посетить лучшие музеи, наконец, просто совершить увлекательную прогулку по городу на Неве.

Программа Школы включает в себя лекции ведущих ученых, круглые столы и молодежную конференцию, состоящую из докладов и стендовых сессий.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» как головная площадка, Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, ГосНИИГенетика и другие организации Курчатовского института обладают уникальным научным потенциалом в области биофизики и молекулярной биологии. Во многом, залогом развития этих научных направлений станет успешная реализация двух федеральных научно-технических программ, которым был дан старт Указами Президента Российской Федерации: развития генетических технологий и развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры. Курчатовский институт является головной научной организацией этих масштабных долгосрочных программ. Амбициозные задачи в области молекулярной биологии и генетики предстоит решать организованному в 2019 году Курчатовскому геномному центру, в котором ПИЯФ является ключевым участником консорциума.

Зимние школы ПИЯФ имеют многолетние традиции. Все эти годы отличительными особенностями Школы являлись высокий уровень приглашаемых лекторов, созидательная и творческая атмосфера, возможность неформального общения, поэтому уверен, что и в этот раз совместная работа участников будет способствовать получению новых знаний, расширению контактов и плодотворной деятельности на благо российской науки.

Приглашаю к сотрудничеству и желаю всем участникам, гостям Школы благополучия, новых свершений и реализации самых амбициозных проектов!

Научный руководитель Школы,
президент НИЦ «Курчатовский институт»
М.В. Ковальчук

**Тезисы докладов
Молодежной конференции**

Том 2

Конформационные переходы филамента RecA *Deinococcus Radiodurans* в ходе гидролиза АТФ

Алексеев А. А.¹, Сердаков М. Д.¹, Побегалов Г. Е.¹, Бахланова И. В.²,
Байтин Д. М.², Ходорковский М. А.¹

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

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

В ходе рекомбинационной репарации ДНК активный филамент RecA осуществляет поиск гомологии и катализирует обмен гомологичных участков ДНК [1]. Ранее для филамента RecA *E. coli* показано наличие обратимых конформационных изменений при переходе из АТФ-богатой среды в среду без АТФ [2, 3]. Механические свойства двух конформаций филамента EcRecA отличны [3]. Переключения между двумя конформациями также были обнаружены у филамента Rad51 – гомолога RecA в организме человека [4].

Экстремофильная бактерия *Deinococcus Radiodurans* известна своей чрезвычайно высокой устойчивостью к действию ионизирующего излучения. Механизмы рекомбинационной репарации в *Deinococcus Radiodurans* значительно отличаются от других организмов [5].

В данной работе при помощи комбинации метода оптического захвата и пятиканальной микрофлюидной системы (Lumicks) исследуется филамент DrRecA на одонитевой ДНК на предмет конформационных перестроек при смене нуклеотидного кофактора. Сформированный на одонитевой ДНК филамент DrRecA переносили между каналом, содержащим 1 мМ АТФ и каналом, содержащим буферный раствор без АТФ. При переносе к филаменту прикладывали постоянную силу натяжения 2 пН и регистрировали его длину. При переходе в канал без АТФ длина филамента сокращалась на 30 %, что соответствует переходу в неактивную конформацию. При возвращении скомпактизованного филамента в АТФ-среду наблюдалось восстановление длины до значения, близкого к исходной длине. Циклы сокращения и восстановления длины филамента воспроизводились при последующих повторных переносах между каналом с АТФ и каналом, не содержащим АТФ.

Впервые обнаруженные конформационные изменения филамента DrRecA идентичны конформационным переходам филамента EcRecA. Ввиду значительных отличий механизмов гомологической рекомбинации в *Deinococcus Radiodurans* и *E. coli*, полученные данные свидетельствуют о высококонсервативном характере конформационных изменений нуклеопротеиновых комплексов семейства рекомбиназ при смене нуклеотидного кофактора.

Работа частично выполнена в рамках Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий № 075-15-2019-1663 (И.В.Б, Д.М.Б.).

1. Cox M.M. Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein // Progress in nucleic acid research and molecular biology. – Academic Press, 1999. – V. 63. – P. 311–366.
2. Nishinaka T. *et al.* Elastic behavior of RecA-DNA helical filaments // Journal of molecular biology. – 2007. – V. 370. – No. 5. – P. 837–845.
3. van Loenhout M.T.J. *et al.* Dynamics of RecA filaments on single-stranded DNA // Nucleic acids research. – 2009. – V. 37. – No. 12. – P. 4089–4099.
4. Robertson R.B. *et al.* Structural transitions within human Rad51 nucleoprotein filaments // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – V. 106. – No. 31. – P. 12688–12693.
5. Slade D. *et al.* Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans* // Cell. – 2009. – V. 136. – No. 6. – P. 1044–1055.

**Влияние мутации в С-концевом домене киназы Rad53
на him1-зависимый УФ-индуцированный мутагенез дрожжей
*Saccharomyces cerevisiae***

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

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

alekseeva_ea@npi.nrcki.ru

Протеин киназа Rad53 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* является частью сигнального каскада, участвующего в ответе на повреждения ДНК и остановку вилки репликации ДНК. Также одной из функций киназы Rad53 является повышение уровня дезоксирибонуклеотидов (dNTP) в клетке, и тем самым подавления активности Sml1p [1]. Продукт гена *SML1*, является репрессором dNTP-синтазного комплекса RNR [2].

Также известно, что протеин киназа Rad53 участвует в активации, другой чекпойтной киназы - Dun1, функция, которой состоит в поддержании в клетке адекватного уровня dNTP, по средствам регуляции активности рибонуклеотид редуктаз (RNR) [2].

У киназы Rad53 есть FHA домены, представляющие собой консервативные последовательности из 65-100 аминокислотных остатков. Этот домен, как полагают, опосредует межбелковые взаимодействия. FHA домены киназы Rad53 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, являются фосфо-специфическими мотивами межбелкового взаимодействия и имеют важное значение для механизмов внутриклеточной передачи сигналов [3].

У протеин киназы Rad53 выделяют два FHA домена, N-концевой домен FHA1 и С-концевой домен FHA2.

Также у киназы Rad53 есть человеческий гомолог Chk2, мутации в котором приводят к развитию рака у человека [2].

В наших исследованиях, мы совместили мутацию в гене *HIM1* с мутацией в С-концевом домене киназы Rad53. И посмотрели, влияние УФ-света на чувствительность и частоту индуцированного мутагенеза этого штамма, и сравнили полученные данные с другими исследуемыми штаммами.

Как оказалось, мутация в С-концевом домене киназы Rad53 приводит к уменьшению частоты him1-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза до уровня дикого типа.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00540 мол_а и частично выполнена в рамках Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий № 075-15-2019-1663.

1. P.R. Dohrmann and R.A. Sclafani. J. Gen. Soc. of America, No. 174, p.87–99 (2006).
2. X. Zhao and R. Rothstein. J. PNAS, V. 99, No. 6, p. 3746–3751 (2002).
3. D. Durocher, J. Henckel, A.R. Fersht, and S.P. Jackson. J. Mol. Cell. V. 4, p. 387–394 (1999).

Исследование комплексов из больших и малых белков теплового шока в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния

Амарантов С. В.

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

Известно, что структура белков в растворе может заметно отличаться от структуры белка в кристалле или, из-за ее отсутствия, модели взятой из Protein_Model_Data_Base (PMDB). С целью проверки конформационных изменений белка шаперона человека (PMDB id: PM0076412) [1] в растворе, были проведены исследования Hsp70 с использованием метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Предполагалось, что два домена из которых состоит Hsp70 – АТФ – и пептид-связывающего, имеют различные пространственные ориентации друг относительно друга в растворе и кристалле. Другими методами, использованными в нашей работе, был метод кругового дихроизма (КД) и аналитического ультрацентрифугирования (АУ). Методом КД был проведен анализ вторичной структуры с определением разупорядоченных областей в полипептидной цепи для исследуемого белка в растворе [2]. Также исследовались методом МУРР комплексы бактериального GroEL и вирусного (фаговый) GP146 шаперонинов, образованные из мономеров «большого белка теплового шока» Hsp60 [3, 4].

Еще одним белком с функцией шаперона исследуемым этим методом был белок хрусталика глаза альфа-кристаллин. α -кристаллин – олигомерный полидисперсный белок массой около 700–800 кДа, сформированный из мономеров α A- и α B-кристаллина, играет важнейшую роль в поддержании прозрачности хрусталика глаза. Третичная структура субъединиц α -кристаллина и их расположение в олигомерах α -кристаллина (четвертичная структура) остаются неизвестны [5].

1. Черноризов К. А., Швядас В. К. Acta nature. 2010. Т. 2. № 4(7). С. 74–79.
2. Амарантов С. В., Троянова Н. И., Шевченко М. А., Сапожников А. М. Acta Nature, Спецвыпуск (2017). Научные труды. Объединенный научный форум. Международная научная конференция по биоорганической химии. VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды». С.116.
3. Амарантов С. В. ЖЭТФ. 2009. Т. 135. Вып. 4. С. 721–737.
Амарантов С. В., Налётова И. Н., Курочкина Л. П. ЖЭТФ. 2011. Т. 140. Вып. 2(8). С. 368–386.
5. A.Y. Mirarefi, S. Boutet, S. Ramakrishnan *et al.* Biochimica et Biophysica Acta. 2010. V. 1800. P. 556–564.

**Исследование физико-механических свойств
композиционных материалов на основе хитозана
с наполнением из трикальцийфосфата**

Антипова К. Г., Несмелов А. А., Камышинский Р. А., Луканина К. И.

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

antipova_kg@nrcki.ru

Тканевая инженерия – перспективная научная область, целью которой является создание искусственных тканей и органов. Одна из важных задач этого направления исследований – разработка и изучение функциональных свойств биосовместимых и биодеструктируемых клеточных матриксов. В настоящее время для решения этой задачи активно применяют природные и синтетические полимеры. Регулирование механических свойств в широких пределах осуществляют посредством модификации материалов различными наполнителями [1, 2].

В нашей прошлой работе были изучены высокопористые композиционные материалы на основе хитозана с добавлением хитиновых нанокристаллов [3]. В настоящей работе разработаны хитозановые композиты с добавлением трикальцийфосфата (ТКФ), изучены их морфология и физико-механические характеристики в сухом и набухшем состоянии.

Для получения материалов приготовлен 2,0 в/в % раствор хитозана (Primex ChitoClear, 43040 – 600 кДа) в 2,0 в/в % уксусной кислоте/H₂O. Концентрация ТКФ варьировалась в пределах от 0 об. % до 25 об. %. Все образцы подвергались химической сшивке 2,5 % раствором глутарового адельгида (из расчета 1,0 % от массы полимера). С целью формирования различной архитектуры, одну половину гомогенизированных растворов замораживали в рефрижераторе, а вторую подвергали градиентной заморозке в жидком азоте. Замороженные растворы высушивали методом сублимационной сушки на установке Martin Christ Alpha 2-4LSC в течение 48 часов.

Морфологию образцов изучали методом сканирующей электронной микроскопии. Физико-механические свойства материалов до и после набухания исследовали на универсальной разрывной машине Instron 5965 при сжатии.

В ходе работы выявлена зависимость равновесной степени набухания материала от концентрации трикальцийфосфата. Определена оптимальная концентрация наполнителя, усиливающая прочностные свойства композитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ № 1362 от 25.06.2019 г.).

1. David Williams. Benefit and risk in tissue engineering // Materials Today. 2004. No. 5. P. 24–29.
2. Robert Langer, Joseph P. Vacanti. Tissue Engineering // Science. 1993. No. 260. P. 920–926.
3. Антипова К. Г., Истомина А. П. Модификация высокопористых материалов на основе хитозана хитиновыми нанокристаллами // Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019». 2019. С. 120.

**Оценка влияния термоиндуцированного сжатия
на морфологию биodeградируемых капсул
из поли-L-аргинин/сульфат декстрана с магнитными наночастицами**

*Атанова А. В., Трушина Д. Б., Суфиянова А. Э.,
Бородин Т. Н., Хмеленин Д. Н.*

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

Развитие медицины, направленное на повышение эффективности диагностики и лечения заболеваний, связано с разработкой микро- и наноструктур. Такие структуры могут использоваться в частности для адресной доставки биологически активных веществ и их контролируемого высвобождения. Полиэлектrolитные микрокапсулы, получаемые методом последовательной адсорбции молекул на поверхности коллоидных частиц, являются перспективным средством доставки активных веществ [1, 2]. Функционализация оболочек капсул магнитными наночастицами позволяет управлять локализацией капсул и их проницаемостью. На данный момент разработанные полиэлектролитные капсулы имеют средний диаметр 0,5–1 мкм, в то время как оптимальный размер объекта для эффективного эндоцитоза составляет не более 200 нм [3]. В данной работе для минимизации размеров биodeградируемых капсул из трех бислоев поли-L-аргинин/сульфат декстрана, модифицированных магнитными наночастицами оксида железа, впервые использовали методику термоиндуцированного сжатия.

Визуализацию капсул проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа FEI Tecnai Osiris (200 кВ), оснащенного системой SuperX EDS для сверхбыстрого элементного картирования, что при работе с полимерными образцами позволяет получать качественные карты распределения элементов без деградации материала и не требует специальной пробоподготовки.

Исследования показали, что капсулы имеют преимущественно сферическую форму как до, так и после термоиндуцированного сжатия. В результате воздействия температуры оболочка капсул уплотняется, а их средний размер уменьшается от 850 ± 300 до 410 ± 120 нм. Показано, что наночастицы не агрегируют в оболочке в результате термоиндуцированного сжатия, их распределение остается относительно равномерным.

Исследования проведены на оборудовании ЦКП ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения работ по государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

1. S. De Koker *et al.* Polyelectrolyte Microcapsules as Antigen Delivery Vehicles to Dendritic Cells: Uptake, Processing, and Cross-Presentation of Encapsulated Antigens. *Angew. Chemie*, vol. 121, no. 45, pp. 8637–8641, Oct. 2009.
2. B.G. De Geest *et al.* Polymeric multilayer capsule-mediated vaccination induces protective immunity against cancer and viral infection. *ACS Nano*, vol. 6, no. 3, pp. 2136–2149, 2012.
3. A. Prokop and J.M. Davidson. Nanovehicular intracellular delivery systems. *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 9, pp. 3518–90, Sep. 2008.

Пространственная структура димера бутирилхолинэстеразы, полученная с помощью криоэлектронной микроскопии

Баймухаметов Т. Н.¹, Бойко К. М.², Массон П.³

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

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

³ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

baymukhametov.timur@gmail.com

Бутирилхолинэстераза (БХЭ) и ацетилхолинэстераза (АХЭ) человека являются структурно близкими ферментами, относящимися к классу сериновых гидролаз. В головном мозге и в нервно-мышечных соединениях БХЭ может дублировать функции АХЭ, имея при этом важное токсикологическое и фармакологическое значение для организма благодаря способности гидролизовать различные сложные эфиры.

Известно, что данный фермент функционирует в виде различных олигомерных состояний – тетрамера (преимущественная и наиболее активная форма), димера и мономера. Структура мономерной формы БХЭ была установлена методом рентгеноструктурного анализа [1], а структура тетрамера – реконструирована по данным криоэлектронной микроскопии [2, 3].

В данной работе мы провели повторный анализ экспериментальных данных криоэлектронной микроскопии, полученных в ESRF (Гренобль, Франция) в 2018 году. В ходе классификации данных были выявлены две различные пространственные структуры, соответствующие димеру БХЭ. Результаты проведенного анализа позволят исследовать процесс распада тетрамера БХЭ на димеры.

В части обработки данных криоэлектронной микроскопии работа поддержана грантом РФФИ № 18-41-06001.

1. Nicolet Y. *et al.* Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – V. 278. – No. 42. – P. 41141–41147.
2. Boyko K.M. *et al.* 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD // Biochimie. – 2019. – V. 156. – P. 196–205.
3. Leung M.R. *et al.* Cryo-EM structure of the native butyrylcholinesterase tetramer reveals a dimer of dimers stabilized by a superhelical assembly // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – V. 115. – No. 52. – P. 13270–13275.

Длина теломер и частоты цитогенетических повреждений в лимфоцитах больных раком легкого

Баранова Е. Д.

Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

Рак легких (РЛ) – наиболее распространенное злокачественное образование в мире, а также наиболее частая причина летальных исходов среди онкологических патологий [2]. Сложные механизмы биологии РЛ известны, но существует значительный пробел в знаниях о взаимодействии ключевых биомаркеров в этиологии и прогрессировании РЛ. Целью настоящего исследования является показать связь между длиной теломер, частотой хромосомных aberrаций (ХА) и частотой микроядер (МЯ) в лимфоцитах у пациентов с диагностированным РЛ, до начала терапии. Биоматериал был взят у 67 пациентов с РЛ (мужчины) и 77 контрольных пациентов (мужчины), средний возраст (59.49 ± 6.61 лет). Результаты показали значительное увеличение длины теломер у пациентов с РЛ по сравнению с контрольной группой ($2,12 \pm 1,43$ против $1,24 \pm 0,88$; $p = 0,00001$). Наше исследование впервые показало связь между длиной теломер у больных РЛ и aberrациями хромосомного типа, а также отрицательную корреляцию длины теломер с частотой лимфоцитов на стадии апоптоза. Частота МЯ была значительно увеличена у пациентов с РЛ по сравнению с контрольной группой, но достоверной связи с длиной теломер не было. В группе здоровых людей не было обнаружено связи между длиной теломер и цитогенетическими повреждениями. Парадокс длины теломер широко обсуждается в последние годы. С одной стороны, известно, что пожилые люди, чьи теломеры в соматических клетках короче, чем у молодых, имеют повышенную склонность к раковым заболеваниям [2, 3]. С другой стороны, конститутивно длинные теломеры могут обеспечить дополнительные раунды деления клеток, что увеличивает риск накопления соматических мутаций способных блокировать пути старения и апоптоза, приводя к онкогенезу.

Исследование поддержано грантом РНФ № 18-14-00022.

1. IARC. Stewart BW, Wild CP (2014). World Cancer Report. Lyon: IARC.
2. Maser RS, DePinho RA. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. Science. 2002; 297:565–569. [PubMed: 12142527]
3. Tomasetti C., Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. Science. 2015; 347:78–81. [PubMed: 25554788]

Репродуктивные свойства вирусов гриппа А с различной вторичной структурой РНК гена NS в живых системах

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

¹ Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

irina.baranovskaja.1992@gmail.com

Вторичные структуры РНК являются важным элементом функционирования РНК-содержащих вирусов [1]. Ранее мы сконструировали 4 вируса гриппа А, обладающие различной вторичной структурой РНК в областях (82-148) и (497-564) гена NS [2]. Различия в формировании вторичной структуры РНК мы экспериментально подтвердили методом электрофоретического разделения. Кроме того, мы показали, что вирусы, содержащие шпильку в области (82-148) гена NS, характеризуются более высоким уровнем экспрессии белка NS1 на ранней стадии вирусной инфекции *in vitro* [3].

В данной работе мы сравнили репродуктивные свойства полученных вирусов в живых системах *in vitro* (МДСК, A549, Vero) и *in vivo* (мыши BALB/c). Несмотря на то, что повышение экспрессии NS1 в первые часы инфекции не влияло на репликативные свойства вирусов в системе *in vitro*, мы обнаружили различия при определении летальной и инфекционной доз вирусов на модели лабораторных животных. Полученные результаты согласуются с тем, что активная экспрессия на ранних сроках инфекции белка NS1, являющегося ключевым антагонистом иммунного ответа [4], может способствовать усилению патогенности вируса *in vivo*.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 18-74-00130.

1. Ferhadian D. *et al.* Structural and functional motifs in influenza virus RNAs // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 559.
2. Барановская И., Сергеева М., Васин А. Вторичная структура РНК генного сегмента NS вируса гриппа А влияет на экспрессию рамок считывания NS1/NEP на ранней стадии вирусной инфекции // *Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии*. Гатчина, 2019. – С. 83–84.
3. Baranovskaya I., Sergeeva M. *et al.* Changes in RNA secondary structure affect NS1 protein expression during early stage influenza virus infection // *Virology journal*. – 2019 (принято к печати).

4. Hale B.G. *et al.* The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses // Journal of general virology. – 2008.

Металлизация ДНК через образование комплексов с соединениями серебра

Барышев А. В., Касьяненко Н. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Наночастицы благородных металлов, таких как золото и серебро, обладают широким спектром биологических свойств. Отмечены, например, их противовоспалительная, противогрибковая, противораковая активности [1, 2]. Основные свойства наночастиц, которые отвечают за их биологическую активность: размер, форма, отношение площади поверхности к объему и другие. Также наночастицы являются отличными компонентами для создания различных наноструктур. Для создания определенных структур может также использоваться молекула ДНК в качестве матрицы, на которой будет происходить восстановление наночастиц [3]. Такая система может быть использована, например, при создании наноплатформ, которые могут найти применение в тераностике. Это приводит к выводу о необходимости исследования ДНК, металлизированной серебром в растворах, в качестве модельной системы.

Металлизация ДНК в растворе происходит по следующей схеме: с азотистыми основаниями ДНК связываются ионы серебра, которые затем восстанавливаются путем химического восстановления. Источником серебра является AgNO_3 , восстановителем выступает NaBH_4 . Было проведено сравнение конформационных параметров ДНК с ионами серебра и с восстановленным серебром. Было показано, что различное соотношение концентраций ДНК и нитрата серебра приводят к образованию различных типов систем. Изменения в спектрах поглощения ДНК с серебром указывают на связывание серебра с N7 гуанина в большой бороздке ДНК. Еще были получены данные о третичной структуре ДНК в рассматриваемых системах с помощью низкоградиентной вискозиметрии и двойного лучепреломления в потоке. Было установлено, что объем ДНК уменьшается при образовании комплексов с серебром. При изучении данных систем с помощью метода двойного лучепреломления в потоке при использовании источника излучения с длиной волны около 405 нм было получено возрастание оптической анизотропии. Полученные данные представлены в работе [4].

1. Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. J. Colloid Interface Sci. 2004, 275, 177–182.
2. Xi-Feng Zhang, Zhi-Guo Liu, Wei Shen and Sangiliyandi Gurunathan. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 1534.

3. C. Brun, C. Tidiane-Diagne, C. Carmignani, S. Torrenco, P.H. Elchinger, P. Reynaud, A. Thuaire, S. Cheramy, D. Gasparutto, R. Tiron, A. Filoramo and X. Baillin. Development of a Statistical Approach for DNA-Based Nanowires Electrical Study. Microelectronics Packaging Conference (2015).
4. Nina A. Kasyanenko, Anastasia A. Andreeva, Andry V. Baryshev, Vladimir M. Bakulev, Maria N. Likhodeeva, Pavel N. Vorontsov-Velyaminov. DNA Integration with Silver and Gold Nanoparticles. Enhancement of DNA Optical Anisotropy. The Journal of Physical Chemistry B, 2019, ISSN: 1520-6106. DOI: 10.1021/acs.jpcb.9b07341

Разнообразие культивируемых анаэробных фототрофных бактерий из озер Кулундинской степи (Алтайский край, Россия)

Бахмутова Е. Д., Комова А. В., Намсараев З. Б.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

Соленые и содовые озера Кулундинской степи (Алтайский край, Россия) характеризуются широким диапазоном физико-химических условий, в которых развиваются уникальные микробные сообщества, обладающие значительным филогенетическим и функциональным разнообразием [1]. В июне-июле 2018 года были отобраны образцы проб из озер Малиновое (минерализация 90 г/л, pH 8.2) и Танатар IV (2.4 г/л и pH 9).

Из образцов было выделено семь штаммов фототрофных бактерий, растущих анаэробно: два из озера Малиновое и пять из озера Танатар IV. Морфологически представители всех штаммов были идентифицированы как представители анаэробных фототрофных бактерий, сфероиденсодержащие пурпурные несерные бактерии. Анализ последовательностей генов 16S рРНК выделенных штаммов показал, что новые изоляты относятся к родам *Rhodovulum* и *Roseibacterium* с уровнем сходства последовательностей от 98,3 до 100 % [2]. Было показано, что все пять штаммов, выделенных из озера Танатар IV, близки к *Rhodovulum steppense*, что наряду с ранее полученными данными показывает широкое распространение данного вида в озерах крио-аридной зоны Евразии [3]. Два штамма, выделенные из озера Малиновое, несмотря на морфофизиологические характеристики, свойственные представителям анаэробных фототрофных бактерий, филогенетически близки к роду *Roseibacterium* – морским аэробным бактериохлорофилл а-содержащим хемоорганотрофным бактериям [4].

Полученные штаммы представляют интерес как потенциальные продуценты биополимеров и других промышленно важных соединений. Анаэробные фототрофные бактерии являются продуцентами биodeградируемого полимера полигидроксиалканоата [5]. Кроме того, представители рода *Rhodovulum* могут использоваться как эффективные продуценты водорода [6].

1. Sorokin D.Y., Banciu H.L., Muyzer G. Functional microbiology of soda lakes // Current opinion in microbiology. – 2015. – V. 25. – P. 88–96.
2. Yarza P. et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences // Nature Reviews Microbiology. – 2014. – V. 12. – No. 9. – P. 635.

3. Kompantseva E.I., Komova A.V., Kostrikina N.A. *Rhodovulum steppense* sp. nov., an obligately haloalkaliphilic purple nonsulfur bacterium widespread in saline soda lakes of Central Asia // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2010. – V. 60. – No. 5. – P. 1210–1214.
4. Suzuki T., Mori Y., Nishimura Y. *Roseibacterium elongatum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from the west coast of Australia // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2006. – V. 56. – No. 2. – P. 417–421.
5. Xiao N., Jiao N. Formation of polyhydroxyalkanoate in aerobic anoxygenic phototrophic bacteria and its relationship to carbon source and light availability // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V. 77. – No. 21. – P. 7445–7450.
6. Cai J., Wang G. Hydrogen production from glucose by a mutant strain of *Rhodovulum sulfidophilum* P5 in single-stage photofermentation // International journal of hydrogen energy. – 2014. – V. 39. – No. 36. – P. 20979–20986.

**Экспрессия генов, кодирующих ферменты и белки мембран лизосом,
в патогенезе болезни Паркинсона,
ассоциированной с мутациями в гене GBA**

Безрукова А. И.¹, Богданова Д. А.¹, Милыхина И. В.^{1, 3}, Сенкевич К. А.^{1, 2},
Пчелина С. Н.^{1, 2, 3}, Усенко Т. С.^{1, 2}

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

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

³ *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

bz.nastya96@gmail.com

Введение. Молекулярный механизм развития болезни Паркинсона (БП), ассоциированной с мутациями в гене *GBA* (*GBA*-БП), остается неизвестным [1]. Предполагается, что дисфункция мембранных белков лизосом, вовлеченных в процесс аутофагии, транспорт глюкоцереброзидазы, а также других ферментов лизосом может способствовать развитию БП у носителей мутаций в гене *GBA* [2, 3].

Цель исследования заключалась в экспрессии *GALNS*, *GLA*, *LAMP2*, *SCARB2* в CD45+ клетках во всех исследуемых группах.

Материалы и методы. В исследование включены 9 пациентов с *GBA*-БП, 9 бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA* (*GBA*-носители), 37 пациентов с БП, 56 неврологически здоровых индивидуумов (контроль). Экспрессия исследуемых генов была оценена в CD45+ клетках методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием зондов TaqMan. В качестве референсных генов использованы *GNB2L1*, *ACTB*. CD45+ клетки крови получены методом магнитной сепарации (Miltenyi Biotec, США).

Результаты. Экспрессия *LAMP2*, *SCARB2* в CD45+ клетках понижена в группе *GBA*-носителей, у пациентов с *GBA*-БП относительно пациентов с БП (*LAMP2*: $p < 0.0001$, $p = 0.021$ соответственно; *SCARB2*: $p = 0.01$, $p = 0.045$ соответственно). Выявлена сниженная экспрессия *LAMP2* в группе *GBA*-носителей, пациентов с *GBA*-БП относительно контроля ($p < 0.029$, $p < 0.0001$) и *SCARB2* у *GBA*-БП относительно контроля ($p = 0.046$). Показано снижение экспрессии *LAMP2* в CD45+ у *GBA*-БП по сравнению с *GBA*-носителями ($p = 0.024$).

Экспрессия *GALNS* повышена в группе *GBA*-носителей относительно пациентов с БП и контроля ($p = 0.028$, $p = 0.0069$ соответственно). Выявлено повышение экспрессии *GLA* в CD45+ у пациентов с БП относительно контроля ($p = 0.028$).

Заключение. Впервые выявлено увеличение экспрессии гена *GALNS* в CD45+ клетках крови у GBA-носителей на фоне снижения экспрессии генов *LAMP2*, *SCARB2* в CD45+ клетках у GBA-носителей и пациентов с GBA-БП относительно пациентов с БП, которое возможно может свидетельствовать о компенсаторном механизме у GBA-носителей, препятствующем развитию БП.

Исследование поддержано грантом РФФ № 19-15-00315.

1. O'Regan G., deSouza R.M., Balestrino R., Schapira A.H. Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. *J Parkinsons Dis*, 2017. – V. 7. – P. 411–422.
2. Do J., McKinney C., Sharma P. *et al.* Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Mol Neurodegener*, 2019. – V. 14. – P. 36–52.
3. Alcalay R.N., Wolf P., Levy O.A. *et al.* Alpha galactosidase A activity in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 2018. – V. 112. – P. 85–90.

Состояние бактериальной ДНК в ходе инфекции клеток бактериофагом фKZ

Белоусова В. В., Курдюмова И. В., Якунина М. В.

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

Гигантский бактериофаг фKZ во время инфекции бактерии *Pseudomonas aeruginosa* образует внутри клетки сферическую структуру, состоящую из белковой оболочки и ДНК. Образующаяся структура удерживается в центре бактериальной клетки с помощью тубулиноподобных фаговых белков [1]. Внутри данной структуры были обнаружены белки, участвующие в репликации и транскрипции ДНК фага [2]. Таким образом, образующая структура по своим функциям и форме напоминает ядро эукариотической клетки и была обозначена как «псевдо-ядро». Изучение всех аспектов функционирования псевдо-ядра является чрезвычайно интересной задачей. Одним из первых вопросов является специфичность упаковки ДНК внутрь данной структуры, а именно попадает ли внутрь нее только ДНК бактериофага или также геномная ДНК бактерии. Для ответа на этот вопрос необходимо понять, разрушается ли бактериальная ДНК в процессе инфекции, как это было показано для родственного бактериофага 201ф2-1 [3].

Чтобы определить, происходит ли деградация геномной ДНК бактерии в процессе инфекции бактериофагом фKZ, мы проанализировали тотальную ДНК, выделенную из зараженных клеток лабораторного штамма РАО1 на разных минутах инфекции. Образцы тотальной ДНК были разделены с помощью гель-электрофореза на 0,5 % агарозном геле после предварительной обработки рестриктазой, разрезающей геном бактерии, но не фага, что позволило визуально оценить количество фаговой и бактериальной ДНК. По результатам гель-электрофореза полной деградации бактериальной ДНК к концу инфекции не наблюдалось. Затем массовые отношения геномной ДНК бактериофага к геномной ДНК бактерии в начале и конце инфекции были количественно оценены с помощью ПЦР в реальном времени, полученные данные были сравнены с теоретическими расчетами.

По итогам проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что геномная ДНК *Pseudomonas aeruginosa* не деградирует во время инфекции гигантским бактериофагом фKZ.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-74-10030.

1. Chaikerasitak V. *et al.* The phage nucleus and tubulin spindle are conserved among large *Pseudomonas* phages. – *Cell Reports*. – 2017. – 20. – 1563-71.
2. Chaikerasitak V. *et al.* Assembly of a nucleus-like structure during viral replication in bacteria. – *Science*. – 2017. – No. 355. – P.194-7.
3. Erb M.L. *et al.* A bacteriophage tubulin harnesses dynamic instability to center DNA in infected cells. – *eLife*. – 2014. – No. 3 – P. e03197.

Неканонический механизм действия эмфориноподобных белковых ингибиторов протеаз

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

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Н

У Эмфориноподобные ингибиторы (ЭПИ) представляют собой новое семейство белковых ингибиторов протеаз. Эффективный ингибитор металлопептидаз семейства М4 протеализина и термолизина – эмфорин – был выделен из бактерии *Serratia proteamaculans* и стал прототипом этого семейства. Анализ бактериальных геномов показал, что гены ЭПИ колокализированы с генами, кодирующими протеализиноподобные протеазы (ППП) и во многих случаях организованы в оперон. Многие микроорганизмы, продуцирующие ППП, являются симбионтами или патогенами растений и животных. Хотя биологическая роль ППП изучена мало, имеющиеся данные указывают на вовлеченность этих ферментов во взаимодействия бактерий с высшими организмами. Ассоциация ЭПИ с ППП позволяет предположить, что биологическая роль этих ингибиторов связана с регуляцией активности ППП при взаимодействии бактерий с другими организмами [1].

Для выяснения механизма действия ЭПИ были проанализированы данные пространственной структуры эмфорина и малоуглового рентгеновского рассеяния для комплекса протеализин-эмфорин [2]. Предположительно, ЭПИ работают по неканоническому механизму, а ключевым элементом активного центра является остаток Asp70, который хелатирует каталитический цинк фермента. Для проверки этой гипотезы в клетках *E. coli* были получены интактный эмфорин и его варианты с заменой Asp70 на Ala (D70A) и Asn (D70N). Ингибиторная активность белков по отношению к протеализину была изучена с использованием флуорогенного субстрата с внутренним тушением флуоресценции [3]. Концентрация протеализина и субстрата в реакционной смеси составляла 2,5 нМ и 20 мкМ, соответственно. Было установлено, что при концентрации 54 нМ интактный эмфорин подавляет активность протеализина на $93 \pm 2 \%$, тогда как при действии D70A активность снижается лишь на $4 \pm 1 \%$, а в случае D70N – на $8 \pm 2 \%$.

Таким образом, функциональная значимость остатка аспарагиновой кислоты для ингибирующей активности ЭПИ, свидетельствует в пользу гипотезы о неканоническом механизме их действия.

г

и

"

\

h

–602 (2013).

Демидюк И. В., Чухонцева К. Н., Карасева М. А. и др. Новое семейство белковых ингибиторов протеаз. *Acta Naturae*, спецвыпуск. Т. 2. С. 64 (2019).

**Установление пространственной структуры С-концевого домена
фактора гибернации рибосом из золотистого стафилококка
методом рентгеноструктурного анализа**

Биктимиров А. Д.¹, Фатхуллин Б. Ф.^{1, 2}, Исламов Д. Р.¹, Нуруллина Л. И.¹,
Гараева Н. С.¹, Валидов Ш. З.¹, Юсупов М. М.^{1, 3}, Усачев К. С.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Институт белка РАН, Пущино, Россия

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

biktimirov.artiom@gmail.com

У бактерий синтез белка в стрессовых условиях замедляется во время голодания, поскольку именно синтез белка является наиболее энергоемким клеточным процессом. Все это происходит путем преобразования рибосом в трансляционно неактивные (или гибернационные) 100S димеры или 70S мономеры [1]. Гибернация позволяет бактериям регулировать потребление энергии в клетке, производить защиту рибосом от деградации и переносить воздействие некоторых антибиотиков [2].

Данный процесс происходит в присутствии белков, связывающих рибосомы, таких как фактор модуляции рибосомы (*RMF*), фактор, способствующий гибернации (*HPF*), которые экспрессируются на всем протяжении стационарной фазы [3]. *SaHPF* состоит из N-концевого домена, который останавливает процесс синтеза белка путем связывания с 30S субъединицей в Р- и А-сайтах, и С-концевого домена, который участвует в процессе димеризации рибосомы в 100S единицу.

Объектом наших исследований стал С-концевой домен фактора гибернации рибосом патогенного микроорганизма *S. aureus*. В данной работе нами были найдены и оптимизированы подходящие условия экспрессии на богатой среде, а также оптимальные буферные условия кристаллизации образца С-концевого домена белка *HPF* для исследования методом рентгеноструктурного анализа. В результате были получены кристаллы белка и собраны данные рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,3 Å на монокристалльном дифрактометре Rigaku Synergy-S с микрофокусным источником рентгеновского излучения с медным анодом, оснащенный четырехкружным каппа гониометром и двумерным высокоскоростным детектором на основе гибридных пикселей HyPix-6000HE.

1. Yoshida H., Wada A. (2014) The 100S ribosome: ribosomal hibernation induced by stress. Wiley Interdiscip Rev RNA 5:723–732.
2. Russell J.B., Cook G.M. (1995) Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. Microbiol Rev 59:48–62.
3. Kato T. *et al.* (2010) Structure of the 100S ribosome in the hibernation stage revealed by electron cryomicroscopy. Structure 18:719–724.

Ассоциация rs6812193 и rs8475 гена SCARB2 с риском и возрастом начала болезни Паркинсона

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

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

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

³ *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Механизм патогенеза болезни Паркинсона (БП) остается неизвестным, также остаются неизвестными факторы, влияющие на риск и возраст начала данного заболевания. Последние данные указывают на возможную роль дисфункции лизосом в патогенезе БП [1]. Недавно в двух мульти-этнических полногеномных анализах ассоциаций (GWAS) было выявлено, что однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) rs6812193 гена SCARB2, ассоциирован с риском БП [2, 3]. Исследований по оценке ассоциации ОНП rs8475 гена SCARB2 с БП ранее не проводилось.

Цель данного исследования заключалась в оценке ассоциации ОНП rs6812193 и rs8475 гена SCARB2 с риском и возрастом начала БП среди жителей Северо-Западного региона России.

Материалы и методы. В исследование вошли 518 пациентов с БП (352 женщины, средний возраст: 68 (38–91) лет, средний возраст начала заболевания: 62 (20–87) лет) и 209 неврологически здоровых индивидуумов (контроль) (101 женщина, средний возраст: 73 (55–97) года). Для скрининга ОНП rs6812193 гена SCARB2 был разработан метод ПЦР с последующим рестрикционным анализом, для скрининга ОНП rs8475 в гене SCARB2 был разработан метод аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами TaqMan.

Результаты. Методом логистического регрессионного анализа было выявлено увеличение риска БП в 2 раза среди носителей варианта ТТ rs8475 гена SCARB2 (ТТ vs ТА+АА: OR=2.10, 95 %CI: 1.41-3.02, p<0.001) и в 1.5 раза среди носителей аллеля Т rs6812193 гена SCARB2 (ТТ+ТC vs CC: OR=1.52, 95 %CI: 1.05-2.21, p=0.027). Методом Каплана-Майера и регрессионного анализа Кокса не выявлено ассоциации ОНП rs6812193 и rs8475 гена SCARB2 с возрастом начала БП (p>0.05).

Заключение. Впервые оценена ассоциация ОНП rs6812193 и rs8475 гена SCARB2 с риском и возрастом начала БП в Северо-Западном регионе России. Выявлена ассоциация варианта ТТ rs8475 и аллеля Т rs6812193 гена SCARB2 с

риском БП. Ген *SCARB2* не является геном модификатором возраста начала БП в Северо-Западном регионе России.

Исследование поддержано грантом РФФИ N 19-15-00315.

1. Klein A.D., Mazzulli J.R. Is Parkinson's disease a lysosomal disorder. *Brain*. 2018. 141. P. 2255–2262.
2. Do C.B., Tung J.Y., Dorfman E., Kiefer A.K., Drabant E.M., Francke U., Mountain J.L., Goldman S.M., Tanner C.M., Langston J.W., Wojcicki A., Eriksson N. Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson's disease. *PLoS Genet*. 2011(7):e1002141.
3. Chen X., Wang Y. Tracking of blood pressure from childhood to adulthood: a systematic –3180.

Формирование серебряных наночастиц разной формы

Болонова Е. И., Касьяненко Н. А., Ролич В. И.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Наночастицы благородных металлов в настоящее время вызывают большой интерес, так как они могут выступать в качестве эффективных и избирательных катализаторов, использоваться в электротехнике и медицине [1]. Уникальные оптические свойства металлических наночастиц обусловлены поверхностным плазмонным резонансом, который придает коллоидным растворам различные цвета в зависимости от форм и размеров наночастиц [2].

Одним из наиболее распространенных методов синтеза наночастиц является восстановление ионов металлов в растворе. В данной работе для синтеза наночастиц серебра использовали реакцию восстановления ионов серебра из водного раствора нитрата серебра боргидридом натрия [3]. Применяли также цитрат натрия, который является стабилизатором заряда на поверхности наночастиц. Связываясь с ионами серебра на поверхности растущего зародыша наночастицы и делая его отрицательно заряженным, он не дает частицам агрегировать и образовывать объемный металл или большие агрегаты. Формоопределяющим агентом является перекись водорода, выполняющая функцию травления. Между процессами восстановления боргидридом натрия и окисления перекисью устанавливается равновесие. Для ограничения размера наночастиц в реакцию добавляли бромистый калий. Ионы брома связываются с поверхностью восстановленного серебра, образуя бромид серебра и останавливая рост частицы.

Были изучены спектральные свойства полученных коллоидных растворов. Для изучения распределения частиц по размерам использовали метод динамического рассеяния света (ДРС). С помощью центрифугирования удалось добиться получения растворов, содержащих частицы определенных размеров.

1. Егоров А. М., Гукасов В. М., Иванин А. И., Рубцова М. Ю., Яминский И. В. «Использование золотых наночастиц в биомедицинских приложениях с использованием оптических методов». Инноватика и экспертиза 2 (13), 2014.
2. M. Kerker. "The optics of colloidal silver: something old and something new". Journal of colloid and interface science, vol. 105 (2), 1985.
3. Andrew J. Frank, Nicole Cathcart, Kenneth E. Maly, Vladimir Kitaev. "Synthesis of silver nanoprisms with variable size and investigation of their optical properties". Journal of chemical education, vol. 87 (10), 2010.

Моделирование структуры адаптивных генов у глубоководных и мелководных двустворчатых моллюсков

Бондарева О. В., Генельт-Яновский Е. А., Назарова С. А.

Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

Моллюски – один из наиболее таксономически разнообразных типов животных, их длительная адаптивная эволюция позволила заселить самые разнообразные местообитания от сообществ гидротермальных источников срединно-океанических хребтов до высокогорных районов суши. Двустворчатые моллюски (*Bivalvia*) являются исключительно водными и малоподвижными, однако также населяют широкий диапазон экологических ниш [1]. Целый ряд морских видов *Bivalvia* встречается как в мелководных прибрежных районах, так и в нижней сублиторали до избаты в 100 и более метров.

Целью данной работы является выявление ортологичных генов, мутации в которых способствовали формированию адаптаций в экологически контрастных местообитаниях. Нами были проанализированы транскриптомы типичных для морей Восточной Атлантики литоральных (*Arctica islandica*, *Hiatella arctica*) и сублиторальных (*Limecola balthica*, *Mya arenaria*) видов. Проведенный анализ позволил выявить ортологичные гены, в которых присутствуют параллельные аминокислотные замены, типичные для видов и двух контрастных местообитаний. Параллельные замены могут быть адаптивными и влиять прямым или косвенным образом на функции белка. Трехмерная структура выявленных кандидатных генов была реконструирована с помощью сервера SWISS-MODEL [2] и последующей визуализации инструментом PyMOL [3]. Сравнение трехмерных структур может показать на структурные изменения в белках и, как следствие, показать влияние найденных замен на биохимические процессы у изучаемых видов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_а 18-34-00572.

1. Riginos C., Cunningham C.W. (2005). Invited review: local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* × *Mytilus trossulus*) hybrid zones. *Molecular ecology*, 14(2), 381–400.
2. Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*, 31(13), 3381–3385.
3. DeLano W.L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on protein crystallography*, 40(1), 82–92.

Стабильность 5'-диметокситритильной защитной группы в условиях полимеразной цепной реакции

Буренкова Ю. П., Жолнерович А. И., Щур В. В., Усанов С. А., Янцевич А. В.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Синтетические олигонуклеотиды – один из основных инструментов современной генетической инженерии и молекулярной диагностики. Они используются при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), обратной транскрипции, секвенировании и получении синтетических генов [1, 2].

Олигонуклеотиды получают твердофазным фосфорамидитным методом, в котором особую роль играет кислотолабильная 4,4'-диметокситритильная функциональная группа (ДМТ-г), которая защищает 5'-гидроксил присоединяемого основания. Один из методов очистки олигонуклеотидов ("DMT-ON") после синтеза использует гидрофобность этой группы для взаимодействия с обращенно-фазовыми сорбентами. В ходе очистки защита снимается путем обработки трифторуксусной кислотой (ТФУ) на колонке [2]. Длительный контакт с ТФУ может приводить к депуринизации [3, 4].

В данной работе впервые исследована стабильность ДМТ-г в условиях ПЦР. В качестве модели использовали 15-мерный олигонуклеотид (dT₁₅) полученный на синтезаторе H32 (K&A; "DMT-ON"). Олигонуклеотид очищали на колонке Supelclean ENVI-TM-18 [2, 5], с модификацией [6], за пропуском этапа детритилирования.

Стабильность ДМТ-г проверяли в растворах dT₁₅ с концентрацией 10–100 пмоль/мкл: в деионизованной воде, в буферах для Taq (Taq; pH 8,4, Invitrogen) и Q5 полимераз (Q5; pH 9,3, NEB). Для анализа состава использовали ОФ-ВЭЖХ с диодно-матричной и масс-спектрометрической детекцией (Q-TOF 6550, HPLC 1290, Agilent).

Таким образом, в работе впервые продемонстрировано, что кратковременное (до 5 мин) нагревание олигонуклеотидов в деионизованной воде приводит к полной депротекции олигонуклеотидов. При этом в буферных растворах, предназначенных для проведения ПЦР с использованием широко используемых коммерческих термостабильных ДНК-полимераз, даже длительное (15 мин) нагревание до 98 °С не приводит к значительному (более 20 %) снижению содержания защищенного олигонуклеотида. Полученные данные указывают на сохранение 5'-ДМТ защиты на продуктах ПЦР при использовании 5'-ДМТ олигонуклеотидов.

1. Ляхнович Г. В. Дизайн, синтез и использование синтетических олигонуклеотидов / Г. В. Ляхнович, Е. М. Кабачевская // Известия Национальной академии наук Беларуси. – 2013. – Серия биологических наук, № 2. – С. 109–117.
2. Gilar M. Purification of crude DNA oligonucleotides by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography / M. Gilar, E.S. Bouvier // Journal of Chromatography A. – 2000. – Vol. 890, No. 1. – P. 167–177.
3. The kinetics and mechanism of the acid-catalysed detritylation of nucleotides in non-aqueous solution / M.A. Russell [et al.] // Organic & biomolecular chemistry. – 2009. – Vol. 7, No. 1. – P. 52–57.
4. Efcavitch J.W. Depurination as a yield decreasing mechanism in oligodeoxynucleotide synthesis / J.W. Efcavitch, C. Heiner // Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. – 1985. – Vol. 4, No. 1–2. – P. 267–267.
5. Ellington A. Synthesis and Purification of Oligonucleotides / A. Ellington, J.D. Pollard // Current Protocols in Molecular Biology. – 2001. – Vol. 42, No. 1. – P. 2.11.1–2.11.25.
6. Yantsevich A.V. Oligonucleotide Preparation Approach for Assembly of DNA Synthons / A.V. Yantsevich, V.V. Shchur, S.A. Usanov // SLAS Technology. – 2019. – Vol. 24, No. 6. – P. 556–568.

Исследование эффективности CAR-T-клеток против ряда *in vitro* опухолевых моделей

Валиуллина А. Х.¹, Змиевская Е. А.¹, Рахматуллина А. Р.¹, Журавлева М. Н.¹,
Петухов А. В.^{1, 2}, Мифтахова Р. Р.¹, Ризванов А. А.¹, Булатов Э. Р.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова,
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время терапия онкологических заболеваний с применением Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T) является одной из актуальных технологий [1]. Несмотря на то, что первоначальная концепция предложена еще в конце 1980-х годов, FDA выдало разрешение на применение первого CAR-T-препарата для терапии острого лимфобластного лейкоза лишь в 2017 году. Применение данного вида терапии для солидных опухолей является перспективной задачей, но осложняется множеством факторов [2, 3].

Целью исследования явилось изучение влияния CAR-T-клеток на различные модели опухолевых структур.

На первом этапе нашего исследования путем лентивирусной трансдукции были получены опухолевые линии PC-3M(Kat+) и PC-3M(Kat+CD19+). Эффективность трансдукции подтверждена методом проточной цитофлуориметрии, и составила 83,24 % и 98,81 %, соответственно. Затем путем лентивирусной трансдукции были получены CAR-T-клетки. Эффективность трансдукции Т-лимфоцитов лентивирусным препаратом оценивалась по уровню сигнала репортерного белка GFP методом проточной цитофлуориметрии. Установлено, что эффективность трансдукции составила 86,98 %. На следующем этапе была проведена оценка эффективности CAR-T-клеток против 2D-моделей опухолевых линий PC-3M(Kat+) и PC-3M(Kat+CD19+). Было установлено, что CAR-T приводят к снижению количества опухолевых клеток линии PC-3M(Kat+CD19+) по сравнению с контрольной PC-3M(Kat+). Также проведена оценка действия CAR-T-клеток против 3D моделей опухолевых линий. Было показано, что глубина проникновения CAR-T-клеток в трехмерные опухолеподобные структуры, образованные клетками линии PC-3M(Kat+CD19+), на 5, 12 и 14 сутки культивирования достоверно выше, чем в контрольном образце PC-3M(Kat+). Полученные данные подтверждают перспективность использования CAR-T-клеток для терапии солидных опухолей.

*Проект поддержан стипендией Президента РФ СП-227.2019.4.
Эксперименты выполнены при поддержке гранта РНФ 19-74-20026.*

1. The biological basis and clinical symptoms of CAR-T therapy-associated toxicities / Aleksei Titov, Alexey Petukhov, Alena Staliarova, Dmitriy Motorin, Emil Bulatov, Oleg Shuvalov, Surinder M. Soond, Mauro Piacentini, Gerry Melino, Andrey Zaritskey & Nickolai A. Barlev. *Cell Death & Disease*, 9, Article number: 897. 2018.
2. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. Maria Michela D'Aloia, Ilaria Grazia Zizzari, Benedetto Sacchetti, Luca Pierelli and Maurizio Alimandi. *Cell Death & Disease*. 2018.
3. A long way to the battlefield: CAR T cell therapy against solid cancers. Z. Wang, W. Chen, X. Zhang, Z. Cai, W. Huang. *Journal of Cancer*. 2019.

Конструирование комплексных генетических сетей для регуляции экспрессии генов

Васильев Р. А., Полушкина И. Д.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

Синтетические генные сети состоят из регуляторных, взаимосвязанных частей, действие которых может происходить на транскрипционном, постранскрипционном и посттрансляционном уровнях [1]. Как замкнутые функциональные контуры, так и монослойные простые сети, основанные на булевой логике, были ранее исследованы с целью терапевтического применения на животных моделях. Замкнутые контуры, по сути, представляют собой системы контроля, функционирующие по принципу обратной связи, в которых результат работы системы, действует в то же время как входящий стимул для данной системы [2].

В нашей работе разрабатываются 2 модельных замкнутых контура с количественной регуляцией экспрессии генов на примере ароВ-100. Первый представлен следующей системой обратной связи: уровень синтеза белка ароВ-100 будет регулироваться на посттранскрипционном уровне за счет интерференции с микроРНК. В свою очередь экспрессия гена микроРНК будет контролироваться с помощью StdCas9-VP64. Однако его трансляция будет происходить только в случае дополнительной активации: дестабилизации вторичной структуры 5'-конца мРНК, представляющей собой РНК-переключатель. Активатором трансляции служит мРНК гена ароВ-100, которая, взаимодействуя с переключателем, «разворачивает» его вторичную структуру. Во второй модели вместо РНК-переключателя для регуляции dCas9-VP64 предлагается использовать трансплайсинг интеинов. Для этого ген dCas9-VP64 разделяется на 2 половины, к каждой из которых «пришит» интеин и детерминанта импорта в ядро [3]. Используя CRISPR/Cas планируется через IRES-элемент «пришить» к гену ароВ-100 N-концевую часть dCas9-VP64 с интеином по гомологичному спариванию концов. С-концевой фрагмент dCas9-VP64 будет экспрессироваться конститутивно.

На данном этапе успешно получены и протестированы *in vitro* генетические конструкции с РНК-переключателем, регулирующим трансляцию гена EGFP, а также плазмидные векторы, кодирующие пары интеинов с половинами dCas9-VP64.

1. Auslander S., Fussenegger M. Engineering gene circuits for mammalian cell-based applications. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016. 8.
2. Xie M., Fussenegger M. Mammalian designer cells: engineering principles and biomedical applications. Biotechnol J. 2015. 10:1005–1018.
3. Truong D.J.J. *et al.* Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy // Nucleic acids research. 2015. V. 43. No. 13. P. 6450–6458.

Белок крысы *Rattus norvegicus* STXBP1 демонстрирует амилоидные свойства *in vivo*

Велижанина М. Е.^{1, 4}, Чиринская А. В.¹, Синюкова В. А.³, Белашова Т. А.^{2, 3},
Сопова Ю. В.^{1, 2, 3}, Галкин А. П.^{1, 3}

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

² Санкт-Петербургский государственный университет, научная лаборатория
биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова
РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

velizhanina.me@gmail.com

Амилоиды – это белковые полимеры, которые образуются за счет формирования упорядоченных межмолекулярных β -складчатых листов. Первоначальный интерес к изучению данного феномена был связан с тем, что амилоидные фибриллы ряда белков ассоциированы с рядом неизлечимых нейродегенеративных заболеваний человека. Однако со временем были выявлены амилоиды, выполняющие жизненно важные функции, от образования биопленки бактерий до участия в синтезе меланина у млекопитающих.

В нашей лаборатории был разработан и успешно апробирован универсальный протеомный метод идентификации амилоидов – PSIA-LC-MALDI [1]. Данный метод основан на универсальном свойстве амилоидных фибрилл – их повышенной устойчивости к обработке детергентами (такими, как SDS). С помощью данного метода нами был проведен поиск белков - кандидатов на роль функциональных амилоидов в мозге крысы *Rattus norvegicus*. Одним из белков, выявленных в результате протеомного скрининга, является STXBP1 (Syntaxin-binding protein). STXBP1 – это жизненно важный белок, который входит в комплекс белков, обеспечивающих слияние мембран при экзоцитозе, а также участвует в процессе секреции нейромедиаторов [2].

Используя методы PAGE и SDD-AGE с последующей вестерн-блот гибридизацией, мы показали, что STXBP1 представлен в мозге молодых крыс в виде высокомолекулярных SDS-устойчивых агрегатов.

Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности белка STXBP1 с использованием алгоритма ArchCandy показал наличие трех потенциально амилоидогенных регионов в С-терминальной части белка.

Используя бактериальную систему C-DAG [3], мы показали образование амилоидных фибрилл белком STXBP1, а также его его потенциально-

амилолидогенным С-концевым фрагментом. Колонии бактерий, продуцировавших STXBP1 на среде с конго красным, окрашивались в красный цвет, демонстрировали яблочно-зеленое свечение в при микроскопии в поляризованном свете. Использование электронной микроскопии с негативным контрастированием позволило увидеть внеклеточные фибриллы изучаемых белков.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов мы показали, что белок STXBP1 обладает амилоидными свойствами *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-50-00069 и РФФИ мол_а № 18-34-00419 ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.

1. Antonets K.S. *et al.* Biochem. 81, 1 (2016).
2. Verhage M. *et al.* Science. 287, 5454 (2000).
3. Sivanathan V. *et al.* Nat. Protoc. 8, 7 (2013).

**Исследование роли протеинкиназы GSK3 и ее мишени, белка Тау,
в контроле функций нервной системы
и продолжительности жизни *Drosophila melanogaster***

Веселкина Е. Р., Тростников М. В.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Изучение вклада отдельных генов в контроль продолжительности жизни (ПЖ) позволит влиять на этот признак. Ранее мы показали, что ген *shaggy (sgg)*, кодирующий протеинкиназу GSK3, принимает участие в контроле ПЖ, а изменение его экспрессии в нервной системе (НС) приводит к значительным изменениям в ПЖ [1].

С помощью просвечивающей электронной микроскопии мы выявили ряд дегенеративных изменений в телах нервных клеток и в структуре аксонов у дрозофил со сверхэкспрессией *sgg*, ПЖ которых была значительно снижена. Полученные результаты указывали на то, что снижение ПЖ связано с развитием патологических изменений в НС.

Для выявления молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе изменений, происходящих в НС, и их связи с контролем ПЖ мы сосредоточили внимание на белках-мишенях GSK3. Одной из таких мишеней в НС является ассоциированный с микротрубочками белок Тау. Гиперфосфорилированный Тау образует агрегаты, которые связывают с развитием нейродегенеративных заболеваний [2, 3].

Если негативный эффект на НС и ПЖ связан с гиперфосфорилированием Тау, то снижение количества белка Тау у мух со сверхэкспрессией *sgg* должно снизить негативный эффект сверхэкспрессии на ПЖ. Однако, ПЖ мух со сверхэкспрессией *sgg* и индуцированным РНК-интерференцией нокдауном *tau* не изменилась относительно контрольной, что указывает на то, что не только гиперфосфорелирование *tau* влияет на снижение ПЖ при сверхэкспрессии *sgg*. Возможно, при сильной сверхэкспрессии на ранних этапах GSK3 участвует в регуляции других процессов, что и приводит к снижению ПЖ.

Однако, если негативный эффект на НС и ПЖ связан с гиперфосфорилированием Тау, то увеличение количества нормального белка Тау у мух со сверхэкспрессией *sgg* должно усилить негативный эффект сверхэкспрессии на ПЖ, а увеличение количества мутантного белка Тау, который GSK3 не может фосфорилировать, не должно повлиять на ПЖ. Проверка этого предположения позволит нам окончательно оценить роль гиперфосфорилирования Тау в изменении ПЖ при сверхэкспрессии GSK3.

Работа выполнена при поддержке гранта 18-34-00934 мол_а.

1. Trostnikov M.V., Roshina N.V., Boldyrev S.V., Veselkina E.R., Zhuikov A.A., Krementsova A.V., Pasyukova E.G. Disordered expression of *shaggy*, the *Drosophila* gene encoding a serine-threonine protein kinase GSK3, affects the lifespan in a transcript-, stage-, and tissue-specific manner. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20:2200.
2. Iqbal K., Grundke-Iqbal I. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J. Cell. Mol. Med.*, 2008, 12(1):38–55.
3. Wang J.Z., Xia Y.Y., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. Abnormal Hyperphosphorylation of Tau: Sites, Regulation, and Molecular Mechanism of Neurofibrillary Degeneration. *J. Alzheimers Dis.* 2013, 33 Suppl. 1:S123-39.

(p)ppGpp-опосредованная регуляция начальной стадии белкового синтеза

Виноградова Д. С.^{1, 2}, Victor Zegarra³, Максимова Е. М.¹, Jose Alberto Nakamoto³,
Касацкий П. С.¹, Полесскова Е. В.^{1, 4}, Pohl Milón³, Коневега А. Л.^{1, 4, 5}

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Отделение молекулярной и радиационной
биофизики, Гатчина, Россия

² ООО «Нанотемпер Технолоджис Рус», Санкт-Петербург, Россия

³ School of Medicine, Faculty of Health Sciences, Universidad Peruana de Ciencias
Aplicadas – UPC, Lima, L-33, Peru

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

⁵ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

Vinogradova_ds@pnpi.nrcki.ru

При неблагоприятных условиях, таких как температурные перепады, аминокислотное голодание, недостаток железа, фосфора или жирных кислот, в бактериальной клетке замедляется деление и биосинтез белка [1, 2]. Глобальная регуляция этих метаболических процессов осуществляется посредством алармона (p)ppGpp в ходе «строгого ответа» [3]. На сегодняшний день общепринятым является мнение, что данная регуляция осуществляется исключительно на этапе транскрипции, тогда как наша работа убедительно демонстрирует влияние (p)ppGpp на этапе трансляции.

В данной работе мы изучали (p)ppGpp-опосредованную регуляцию начальной стадии белкового синтеза при помощи современных методик флуориметрии остановленного потока и микротермофореза. Использование набора природных и модельных мРНК позволило установить, что ингибирующее действие (p)ppGpp на инициацию трансляции в значительной степени зависит от мРНК. Так, *mTufA*, кодирующая последовательность элонгационного фактора EF-Tu, обеспечивала наименьшую чувствительность инициации трансляции к высоким концентрациям алармона.

На примере *mTufA* было обнаружено, что принципиально важное значение имеет нетранслируемая область, предшествующая области инициации трансляции. Предсказание вторичной структуры показало, что данная область *mTufA* образует структурированные области, относительная стабильность которых подтвердилась расчетами свободной энергии. Создание усеченных вариантов мРНК позволило идентифицировать область, способствующую повышению толерантности к высоким концентрациям ppGpp и трансляции мРНК. Также было показано, что высокий уровень инициации в

условиях строгого ответа не является прерогативой *mTufA*, а используется некоторыми другими природными мРНК.

Наши исследования предоставляют беспрецедентные сведения о динамической регуляции иницирующей рибосомы и описывают новые механизмы, которые могут использовать бактерии для осуществления трансляции мРНК во время строгого ответа.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 17-00-00368 и РНФ 17-14-01416.

1. Dalebroux Z.D., Swanson M.S. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. Nat Rev Microbiol. 2012; 10:203–212.
2. Harms A., Maisonneuve E., Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. Science. 2016; 354: aaf4268–11.
3. Hauryliuk V., Atkinson G.C., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. Nat Rev Microbiol. 2015; 13: 298–309.

Получение термостабильной формы глюкоамилазы с измененным pH-оптимумом методами направленной эволюции

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

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

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

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

Vinogradova_ds@pnpi.nrcki.ru

Глюкоамилаза (ГА, КФ3.2.1.3, α -1,4-глюкан-глюкогидролаза) - гликозид-гидролаза семейства GH15, катализирующая реакцию гидролиза α -1,4- и α -1,6-гликозидных связей в полимерах и олигомерах глюкозы.

Глюкоамилаза в смеси с термостабильными α -амилазой и глюкоизомеразой используется в ферментативном гидролизе крахмала при производстве этанола и фруктозосодержащих сиропов [1, 2]. Несмотря на высокую термостабильность, глюкоамилазы из гипертермофильных археобактерий не применяются в промышленном производстве из-за их сравнительно низкой активности. Вместо этого используется ГА гриба *A. awamori*, которая имеет высокую активность при 37-60°C, но необратимо инактивируется при более высоких температурах. При этом pH-оптимум данной ГА более кислый (pH 4.5), чем у α -амилазы (pH 5.5-6.5) и глюкоизомеразы (pH 7-8). Это вынуждает производителей вести ферментативные реакции по отдельности, с промежуточными стадиями охлаждения и изменения значений pH «среды» биореактора, что приводит к увеличению себестоимости продукта [3]. Получение термостабильной глюкоамилазы с pH-оптимумом в области нейтральных значений позволит осуществлять одностадийный комбинированный гидролиз полисахаридов, что приведет к уменьшению себестоимости конечных продуктов.

Для получения мутантных форм ГА с увеличенной термостабильностью или pH-оптимумом в нейтральных значениях нами использовались методы направленной эволюции. ДНК библиотеки получали с помощью случайного мутагенеза части гена, кодирующего каталитический домен ГА, или сайт-насыщающего мутагенеза.

В результате отбора нами были получены несколько мутантных форм ГА с повышенной термостабильностью, а также две мутантные формы с измененным pH-оптимумом. Аминокислотные замены этих мутантных форм

использовались при создании химерного белка с увеличенной термостабильностью и сдвинутым рН-оптимумом в область нейтральных значений с помощью *in vitro* рекомбинации. Нами были определены кинетические и термодинамические характеристики полученной химерной мутантной формы.

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

1. Coutinho P.M. *et al.* Proteins, 1997. V. 29: P. 334–347.
2. Linares-Pasten J. *et al.* Current Biotechnology, 2014. V. 3(1): P. 26–44.
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. 589 с.

Разработка комплексного прецизионного лечения злокачественных глиом на основе сочетания протонной и адресной терапии

Волницкий А. В.^{1, 2}, Гараева Л. А.^{1, 2, 3}, Бурдаков В. С.^{1, 2}, Разгильдина Н. Д.¹,
Лебедев Д. В.^{1, 2}, Американов Д. А.^{1, 2}, Пак Ф. А.^{1, 2}, Верлов Н. А.¹,
Коневега А. Л.^{1, 2, 3}, Штам Т. А.^{1, 2}

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

² *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия*

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

Volnitskiy_AV@pnpi.nrcki.ru

Протонная терапия все больше входит в практику лечения онкологических заболеваний. Глубина проникновения протона в ткань зависит от его энергии, основная часть которой теряется, повреждая ткань, лишь в самом конце его пробега (пик Брэгга). Меняя скорость и направление протонов, можно производить точное локальное облучение новообразований с минимальным воздействием на окружающие нормальные ткани.

Злокачественные глиомы являются наиболее опасными, высоко инвазивными опухолями головного мозга, которые не поддаются стандартному клиническому лечению и приводят к быстрой гибели пациентов. Облучение протонами может устранить уже сформировавшиеся очаги глиомы [1], однако распространившиеся в окружающие ткани «спящие» раковые клетки сохранятся и дадут новые очаги [2]. Кроме того, слабо облученные опухолевые клетки, не попавшие в пик Брэгга, могут стать еще агрессивнее. Мы предположили, что такие клетки можно устранить с помощью специально подобранных таргетных препаратов уже после облучения.

Клетки мультиформной глиобластомы облучали дозами 0.5 Гр, 1 Гр и 2 Гр на протонном синхроциклотроне СЦ-1000 (НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ) и рассеивали на 96-луночный планшет. В качестве контроля использовали необлученные клетки. Через сутки к клеткам были добавлены разные концентрации бутирата натрия, ингибирующего гистоновые деацетилазы, и GANT61 – специфического ингибитора транскрипционных факторов gli, участвующих в развитии злокачественных глиом [3]. На 5-е и 7-е сутки после облучения выживаемость клеток оценивали с помощью MTS-теста. Оказалось, что облучение малыми дозами радиации значительно усилило действие этих ингибиторов даже в выбранных нами наиболее низких концентрациях, недостаточных для массовой гибели опухолевых клеток при их использовании в монорежиме. Таким образом, сочетание протонной и адресной

терапии может стать основой для эффективного лечения злокачественных глиом.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ № 1363).

1. Mizumoto M., Yamamoto T., Takano S., Ishikawa E., Matsumura A., Ishikawa H., Okumura T., Sakurai H., Miyatake S., Tsuboi K. Long-term survival after treatment of glioblastoma multiform with hyperfractionated concomitant boost proton beam therapy. Pract Radiat Oncol. 2015 Jan–Feb; 5(1):e9-16.
2. Gulaia V., Kumeiko V., Shved N., Cicinskas E., Rybtsov S., Ruzov A., Kagansky A. Molecular mechanisms governing the stem cell's fate in brain cancer: factors of stemness and quiescence. Front cell neurosci. 2018 Nov 19; 12:388.
3. Volnitskiy A., Shtam T., Burdakov V., Kovalev R., Konev A., Filatov M. Abnormal activity of transcription factors gli in high-grade gliomas. PLoS One. 2019 Feb 7; 14(2):e0211980.

Молекулярные аспекты прямого и опосредованного влияния регуляторных пептидов на рецепторные системы клеток мозга

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

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Эндогенные нейропептиды являются естественными регуляторами метаболизма и широкого множества различных физиологических процессов в организме, способствуют адаптации к факторам стресса, участвуют в механизмах нейропротекции и пролиферации [1]. Регуляторные пептиды являются частью этой сложной системы, а основная их функция заключается в интеграции нервной, эндокринной и иммунной систем в единый функциональный континуум [2]. Предположительно, молекулярный механизм биологического действия регуляторных пептидов обусловлен их специфическими лиганд – рецепторными взаимодействиями на поверхности клеток-мишеней. Нами показано, что один и тот же регуляторный пептид может иметь собственные высокоспецифичные места связывания на поверхности клетки, а также способен влиять на работу сразу нескольких типов рецепторных групп (относящихся к различным системам клеточной сигнализации) посредством аллостерического модулирования их функциональной активности [3]. Кроме того, регуляторное действие пептидов может быть также обусловлено эффектами отставленных во времени биохимических изменений в клетке, приводящих к реорганизации количественного и/или качественного состава поверхностных рецепторов клеток-мишеней. В представленной работе (методом радиолиганд-рецепторного анализа) показаны аллостерические, а также опосредованные эффекты различных пептидов (на примере кортикотропинов и глипролинов) на функциональную активность ГАМК и ряда других «ключевых» нейрорецепторных систем клеток головного мозга крысы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 17-00-00104 РФФИ КОМФИ, а также при финансовой поддержке фундаментальных исследований по приоритетным направлениям, определяемым президиумом РАН по проекту, реализуемому в рамках крупного проекта № 9 «Постгеномные технологии и перспективные решения в биомедицине» № АААА-А19-119112090095-6.

1. Burbach J.P. What are neuropeptides? *Methods Mol Biol.*, 2011, 789, 1–36.
2. Ашмарин И. П., Королёва С. В. Закономерности взаимодействия и функциональный континуум нейропептидов (на пути к единой концепции). *Вест. РАМН*, 2002, 4, 40–47.
3. Bezuglov V.V., Akimov M.G., Gretskeya N.M., Surin A.M., Pinelis V.G., Shram S.I., Vyunova T.V., Shevchenko K.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. The Study of the neurotropic peptides role in cell responses regulation. *Horizons in Neuroscience Research*, 2015; 21(10):151–170.

Интерполиэлектродитные комплексы молекулы ДНК с синтетическими полимерами в растворе

Габрусёнок П. В., Бакулев В. М., Касьяненко Н. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

За последние 10 лет появились новые технологии, направленные на редактирование генома. Это немного снизило активность исследований, связанных с поиском новых подходов к формированию генных векторов, содержащих рекомбинантную ДНК с внедряемым в клетку-мишень геном. Тем не менее, и в настоящее время изучение свойств интерполиэлектродитных комплексов, сформированных противоположно заряженными полиионами, являются весьма востребованной областью молекулярной биофизики. Такие системы могут служить объектами биотехнологических разработок для нужд медицины и нанотехнологий разного назначения. Основной задачей при формировании таких структур является компактизация жесткой и сильно заряженной ДНК в растворе. При формировании компактных частиц, способных проходить через клеточные мембраны, необходимо подобрать компактизирующий агент, защищающий ДНК от агрессивных факторов среды при транспортировке в кровотоке к клеткам-мишеням. Кроме того, такой агент не должен проявлять высокой токсичности, а также не должен вызывать других нежелательных побочных эффектов при введении *in vivo*. Среди невирусных генных векторов бесспорное преимущество имеют векторы, формируемые на основе ДНК-полимерных комплексов [1, 2]. При этом использование биоразлагаемых полимеров позволит решить достаточно остро стоящий в настоящее время вопрос об утилизации используемых при создании генных векторов компонентов в клетке после проведения успешной трансфекции.

В работе исследуется способность ряда катионных блок-сополимеров конденсировать высокомолекулярную ДНК в растворе для создания генных векторов для генной терапии. Молекулярную массу используемого образца ДНК определяли по значению характеристической вязкости в 0.15 М NaCl. Было рассмотрено поведение нескольких систем, содержащих ДНК и полимеры различного строения и состава в растворах с разной концентрацией поддерживающего электролита NaCl (0.005 М и 0.15 М). Часть использованных в работе полимеров имеет антраценовую метку для контроля поведения систем с помощью измерения их люминесценции. В исследовании использованы методы ультрафиолетовой спектрофотометрии и низкоградиентной вискозиметрии. Концентрацию и коэффициент молярной экстинкции высокомолекулярной тимусной ДНК определяли по методу Спирина [3].

В ряде ДНК-полимерных систем удалось добиться конденсации ДНК, индуцированной присутствием полимера в растворе.

1. Benjamin D. Hornstein, Cinnamon L. Hardee, Lirio Milenka Arevalo-Soliz, and Lynn Zechiedrich. Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy. *Genes*, page 3, February 2017.
2. Corey J. Bishop, Joel C. Sunshine, and Jordan J. Green. Advances in polymeric and inorganic vectors for nonviral nucleic acid delivery. *PubMed Central*, pages 1–49, April 2014.
3. Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. *Биохимия*, 1958, № 5, с. 656–662.

Подходы к конструированию рибопереклюкателей типа toehold

Галченкова М. А.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

galchenkova.mari@gmail.com

Рибопереклюкатели [3] выступают в роли генетических устройств синтетической биологии, контролирующих экспрессию генов-мишеней индуцируемым триггерным доза-зависимым образом, что может быть использовано для высокоточного и надежного программирования клеточного поведения. Благодаря современным биоинформатическим подходам обнаружения и классификации регуляторных элементов, на сегодняшний день выделяют около 41 класса естественных рибопереклюкателей [1], отвечающих за распознавание своего целевого лиганда. Рибопереклюкатель может модулировать экспрессию гена как на транскрипционном, так и на пост-транскрипционном уровнях за счет конформационного изменения в его экспрессионной платформе, вызванного высоко-аффинным связыванием лиганда с аптамерной областью риборегулятора.

Были проанализированы последние достижения экспериментальных и численных подходов, направленных на изучение рибопереклюкателей. Был сделан обзор литературы по теме применения данного типа цис-регуляторного элемента в различных областях – от биомедицины до биоремедиации. Также предложен собственный алгоритм по конструированию искусственных рибопереклюкателей типа toehold [2] и продемонстрированы первые численные результаты. На текущий момент ожидается экспериментальная валидация алгоритма. В дальнейшем будут предприниматься попытки по расширению функционала до связывания переключателя с любым типом лиганда и для любого типа клеток.

1. Kalvari Ioanna *et al.* Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families. *Nucleic acids research* 46.D1 (2017): D335–D342.
2. A.A. Green *et al.* Toehold switches: De-novo-designed regulators of gene expression, *Cell*, vol. 159, no. 4, pp. 925–939 (2014).
3. Breaker R.R. Riboswitches and the RNA World. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a003566–a003566 (2012).

Проводящие материалы с различной морфологией для биотопливных элементов

Глушкова Н. А.^{1, 2}, Столярова Д. Ю.², Луканина К. И.²

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

² *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия*

Загрязнение окружающей среды и истощение природных ресурсов – актуальные причины поиска новых, экологически безопасных и возобновляемых источников энергии. В современной биоэнергетике один из способов получения электричества реализуется путем разработки биологических топливных элементов (БТЭ). Их принцип действия основан на превращении химической энергии в электрическую за счет метаболической активности ферментов или бактериальных клеток [1]. Важной задачей является выбор материала электродов. Материал должен быть проводящий, обладать высокой удельной поверхностью, а также быть не токсичным и адгезивным для бактерий и ферментов [2]. В настоящее время в качестве токопроводящих наполнителей в полимерных материалах используют углеродные нанотрубки, графен, графит и др. [3].

В работе получены композиционные материалы (пленки и высокопористые материалы) с добавлением восстановленного оксида графена (ВОГ) и технического углерода (ТУ), а также исследованы их диэлектрические параметры с помощью импеданс-анализатора Novocontrol Alpha-A (Германия). В качестве полимерной матрицы выбран биосовместимый полимер - хитозан с молекулярной массой 600 кДа (Primex ChitoClear 43040). Проводимость хитозановых пленок составила $4,30 \cdot 10^{-12}$ См/см. Проводимость композиционных пленок с ВОГ с концентрациями 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2 мас.% находилась в диапазоне $10^{-11} - 10^{-8}$ См/см. Для пленок наполненных ТУ с концентрациями 1; 2,5; 5; 10 мас.% выявленный диапазон проводимостей составил $10^{-10} - 10^{-5}$ См/см. В дальнейшей работе планируется исследовать проводящие свойства высокопористых композиционных материалов на основе хитозана.

1. О. В. Букач, Л. Л. Мякинкова. Микробные топливные элементы: состояние исследований и практическое применение // Инноватика и экспертиза. 2014. Вып. 2 (13). С 51–59.
2. Тарасов С. Е. Свойства биосенсоров и микробных топливных элементов при исследовании методом импедансной спектроскопии. 2018. 150 с.
3. Алферов В. А. и др. Биотопливные элементы на основе нанокремниевых материалов // Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии. 2014. Т. 6. № 2. С. 187–208.

Эволюция микробного кристаллообразования карбоната кальция

Головкина Д. А., Гармай Ю., Журишкина Е. В., Соколов А. Е.,
Копица Г. П., Кульминская А. А.

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

golovkina_da@pnpi.nrcki.ru

Существует несколько способов минералообразования карбоната кальция. Так, кристаллы CaCO_3 обнаруживают в осадочных породах или в раковинах морских организмов. Минерал карбоната кальция также можно получить химическим способом: путем пропускания углекислого газа через известковую воду. Биогенный карбонат кальция образуется при участии микроорганизмов. В природе существует несколько различающихся между собой изоформ негидратированного кристалла CaCO_3 : кальцит, фатерит и арагонит. Помимо полиморфизма кристаллитов, недавно был описан такой феномен, как полиморфизм минералов карбоната кальция, демонстрирующий наличие нескольких изоморф аморфной фазы [1]. В работе [2] было показано, что разные бактерии способны образовывать каждую из этих форм, причем морфология кристаллов, их количество, а также свойства сильно различаются в зависимости от вида бактерий, условий их роста и физико-химических факторов [3].

Целью данной работы было изучение процесса кристаллообразования на примере бактерии *Bacillus licheniformis* DSMZ 8782. Образцы биогенных осадков были отобраны через фиксированные промежутки времени при росте культуры клеток бактерий в течение первых 48 часов. В процессе роста были измерены значения кислотности среды, секретируемая уреазная активность и изменения в увеличении биомассы. Полученные осадки были проанализированы методами РФА, малоуглового рассеяния нейтронов, растровой электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии. Основываясь на полученных данных, можно заключить, что кристаллы CaCO_3 начинают образовываться уже через 24 часа, последовательно проходя стадии: отвердевание поверхности бактериальных клеток, образование аморфной фазы и кристаллизация в виде фатерита и/или кальцита.

Работа частично выполнена в рамках Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий № 075-15-2019-1663.

1. J.H.E. Cartwright, A.G. Checa, J.D. Gale, D. Gebauer, and C.I. Sainz-Diaz. Calcium Carbonate Polyamorphism and Its Role in Biomineralization: How Many Amorphous Calcium Carbonates Are There? – *Angew. Chem. Int.*, 2012. – 51:11960–11970.

2. A. Meier, A. Kastner, D. Harries, M. Wierzbicka-Wieczorek. Calcium carbonates: induced biomineralization with controlled macromorphology. – *Biogeosciences*, 2017. – 14:4867–4878.
3. G.T. Zhou, Q.Z. Yao, S.Q. Fu, Y.B. Guan. Controlled crystallization of unstable vaterite with distinct morphologies and their polymorphic transition to stable calcite. – *Eur. J. Mineral.*, 2010. – 22:259–269.

Выявление роли участков прионного домена дрожжевого белка Sup35 в образовании биомолекулярных конденсатов

*Горшенева Н. А.¹, Гризель А. В.¹, Куличихин К. Ю.¹,
Рубель А. А.^{1, 3}, Чернов Ю. О.^{1, 2, 3}*

*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
Технологический институт Джорджии, Атланта, Джорджия, США
Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия*

Биомолекулярные конденсаты – немембранные органеллы клетки, содержащие белки и часто нуклеиновые кислоты. В образовании биомолекулярных конденсатов ведущая роль принадлежит белкам с модульными доменами и белкам с неструктурированными участками [1], известными своей способностью формировать необратимые амилоидные или прионные агрегаты. Удобной моделью для изучения агрегации белков с неструктурированными доменами является дрожжевой белок Sup35 – фактор терминации трансляции, состоящий из 3 доменов: (1) прионного N домена, (2) M домена и (3) функционального C домена [2].

Прионный N домен белка Sup35 вызывает образование биомолекулярных конденсатов при снижении цитоплазматического pH. Предполагается, что M домен является сенсором стресса [3]. Однако, не ясно, какой участок N домена отвечает за образование биомолекулярных конденсатов.

Целью данной работы является выявление участков в прионном домене дрожжевого белка Sup35, ответственных за формирование биомолекулярных конденсатов.

В ходе работы было показано, что Sup35 формируют биомолекулярные конденсаты под действием осмотического шока; данная способность эволюционно закреплена для Sup35NM из различных видов дрожжей.

С помощью флуоресцентной микроскопии было изучена возможность образования биомолекулярных конденсатов вариантами белка Sup35 с различными делециями в N домене, слитыми с YFP. При делециях 1-39 а.к. (Q/N богатый участок) и 75-123 а.к. (конец октапептидных повторов) в прионном домене Sup35, белок теряет способность формировать биомолекулярные конденсаты, в то время как для амилоидной агрегации белка Sup35 в клетках дрожжей участок 75-123 а.к. не является обязательным. При делеции 98-123 а.к в прионном домене Sup35, способность белков Sup35N-YFP и Sup35NM-YFP образовывать биомолекулярные конденсаты сохраняется.

Данная работа частично поддержана грантом РФФИ № 19-34-51054. А. В. Гризель поддержана грантом РНФ 18-74-00041. Работа выполнена при помощи ресурсных центров «Биобанк», «Хромас» и «РМиКТ» СПбГУ.

1. Banani S.F. *et al.* Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry // Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2017, V. 18, p. 285–298.
2. Liebman S.W., Chernoff Y.O. Prions in yeast // Genetics, 2012, V. 191, No. 4, p. 1041–1072.
3. Franzmann T.M. *et al.* Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness // Science, 2018, V. 359, No. 6371, p. eaao5654.

**Вклад рецептора 5-HT_{2A} лимфоцитов периферической крови
в патогенез коморбидного течения шизофрении
с синдромом алкогольной зависимости**

Грунина М. Н.¹, Заботина А. М.^{1, 2}, Насырова Р. Ф.³,
Крупницкий Е. М.³, 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 *Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии
им. В. М. Бехтерева, Санкт-Петербург, Россия*

Шизофрения – превалирующее психическое расстройство, зачастую осложняющееся коморбидным течением с синдромом алкогольной зависимости (САЗ) [1]. Определенно известно, что дисбаланс серотонина, определяет развитие негативных симптомов заболевания. Рецептор 2A (5-HT_{2A}) – ключевой рецептор серотонинергической нейротрансмиссии, обладающий высокой аффинностью к атипичным антипсихотикам [2]. В связи с доказанностью единой нейро-иммунно-гуморальной регуляции организма и системным течением психозов лимфоциты периферической крови (ЛПК) рассматривают как адекватный инструмент изучения патогенеза психических патологий [3].

Цель исследования – оценка вклада молекулярно-генетических характеристик рецептора 5-HT_{2A} (количество белка, уровень мРНК гена и изоформ транскриптов II экзона) в ЛПК в развитие коморбидного течения психических расстройств с САЗ.

В исследование было включено 48 пациентов с коморбидным течением шизофрении и САЗ и 40 лиц контрольной группы. Материалом служили ЛПК. Определение количества 5-HT_{2A} проводили с использованием набора ELISA (Cloud-Clone Corp, USA), с нормировкой на общий белок клеточного лизата. Количественный анализ транскриптов II экзона *HTR2A* – методом ПЦР-РВ в присутствии EVA GREEN. Общий уровень экспрессии *HTR2A* оценивали по конститутивно транскрибируемому экзону IV с использованием зонда TaqMan. Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета программы SPSS версия 21.0 (IBM, USA).

Результаты. У пациентов с психическими расстройствами отмечалось достоверное уменьшение количества рецептора 5-HT_{2A} на ЛПК ($p < 0,0001$): 4,72 нг/мг клеточного лизата ($3,41 \pm 6,53$) vs 7,87 ($5,52 \pm 11,42$); и снижение уровня экспрессии *HTR2A* ($p = 0,001$): 0,30 ($0,04 \pm 0,79$) vs 0,75 ($0,37 \pm 1,53$), а также нарушение паттерна изоформ транскриптов II экзона *HTR2A* за счет преобладания альтернативной изоформы E2- ($p < 0,0001$).

Выводы. Коморбидное течение шизофрении с САЗ ассоциируется с уменьшением количества рецептора 5-HT_{2A} на ЛПК и нарушением его транскрипционного профиля.

1. Lewis S.W., Buchanan R.W. Fast Facts – Schizophrenia. Third Edition, Oxford, England: Health Press Limited, 2007.
2. McCorvy J.D., Roth B.L. Structure and function of serotonin G protein coupled receptors. Pharmacol Ther. 2015. 150: 129–142.
3. Lai C.-Y., Scarr E., Udawela M., Everall I., Chen W.J., Dean B. Biomarkers in schizophrenia: A focus on blood based diagnostics and theranostics // Word. J. Psychiatr. 2014. V. 6. No. 1. P. 102–117.

Разработка методики пробоподготовки для исследования ядер клеток имагинальных дисков дрозофилы методом проточной цитометрии

Груничева А. А., Конев А. Ю.

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

corneliya@mail.ru

В клетках эукариот ДНК упакована в хроматин при помощи гистоновых белков. Гистоны также выполняют одну из важнейших функций – регуляцию экспрессии генов.

Ранее в нашей лаборатории был разработан метод генетического анализа влияния встраивания гистонов на экспрессию на плодовых мушках *Drosophila melanogaster*. Этот метод показал связь между изменением фенотипа по форме крыла и встраиванием укороченного гистона с GFP [1]. Однако, данный результат нуждается в подтверждении методами прямого анализа.

Для этого мы выбрали метод проточной цитометрии, как один из самых эффективных и точных на сегодняшний день. Метод проточной цитометрии достаточно требователен к исследуемым образцам [2, 3]. На дрозофиле он применяется достаточно редко из-за трудоемкости получения необходимых тканей и их обработки. Существующие на сегодняшний день протоколы пробоподготовки не подходили для наших целей по тем или иным причинам. Таким образом, перед нами была поставлена цель: разработать универсальную методику выделения ядер из клеток имагинальных дисков дрозофилы для анализа методом проточной цитометрии.

Комбинируя известные методики и приемы, используемые не только на дрозофиле, но также и на млекопитающих, нам удалось разработать простую в воспроизведении, не дорогостоящую и быструю методику, которая может быть применима к исследованию самых разнообразных белков. Это достигается тем, что при подготовке образцов не применяются реагенты, взаимодействующие с белками или флуорофорами. Необходимо отметить, что разработанная методика позволяет максимально сохранить жизнеспособность клеток и ядер к моменту цитометрического анализа. Несомненным ее преимуществом можно также считать четкое разделение этапов получения клеток и ядер. Это дает возможность анализировать не только ядра, но и целые клетки, взяв для анализа образец на соответствующей стадии обработки.

В методике применяется минимально возможное количество реактивов и растворов, что удешевляет и упрощает процесс пробоподготовки.

1. Конев А. Ю., Макасе А. А., Покровский Д. К., Игнатъева М. А., Ильина Ю. А., Котлованова Л. В. Изучение АТФ-зависимых факторов сборки и ремоделирования хроматина дрозофилы. Цитология. 2013, 55 (3): 194–197.
2. Полетаев А. И. Проточная цитометрия и сортировка в цитологии, молекулярной биологии, биотехнологии и медицине / А. И. Полетаев. М.: ВИНТИ, 1989. Т. 12. 88 с.
3. Liang Liang. Functional Genomic Analysis of the Periodic Transcriptome in the Developing Drosophila Wing / Liang Liang, Jeffrey S. Haug, Chris W. Seidel, Matthew C. Gibson // Developmental Cell. 2014. No. 29. P. 112–127.

Изучение влияния мутации *sup35-M0* на структуру прионных агрегатов [*PSI⁺*] при взаимодействии с шапероном Sis1

Данилов Л. Г.¹, Матвеев А. Г.¹, Барбитов Ю. А.¹, Белоусов М. В.^{1, 3},
Полещук О. И.¹, Бондарев С. А.^{1, 2}, Журавлева Г. А.^{1, 2}

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики
и биотехнологий, Санкт-Петербург, Россия

Санкт-Петербургский государственный университет,
лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии, лаборатория протеомики надорганизменных систем, Пушкин,
Санкт-Петербург, Россия

Некоторые растворимые белки могут менять свою конформацию, образуя нерастворимые амилоидные агрегаты. Такое изменение конформации может приводить к различным неизлечимым нейродегенеративным заболеваниям человека, таким как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и др. Получившиеся агрегаты часто обладают инфекционными свойствами, так как они индуцируют агрегацию мономерного белка в клетке. Такая инфекционность характерна для прионных белков, обнаруженных как у человека, так и дрожжей. Одним из прионов, открытых у дрожжей *S. cerevisiae*, является [*PSI⁺*] – это прионная форма белка Sup35, одного из факторов терминации трансляции [1]. Возникновение этого приона связано с агрегацией Sup35^p, которая приводит к снижению точности терминации трансляции и прочтению преждевременно возникших стоп-кодонов как значащих.

Ранее в нашей лаборатории были охарактеризована мутация *sup35-M0*, которая с высокой эффективностью изгоняет прион [*PSI⁺*] [2]. В ходе данной работы нами было показано, что белок Sup35NM-M0 (Q33K, A34K) включается в состав амилоидных агрегатов Sup35 *in vitro* при использовании в качестве затравки предсуществующих фибрилл Sup35NM. Способность белка Sup35NM-M0 включаться в состав агрегатов Sup35 была также подтверждена при помощи экспериментов в системе *in vivo* с помощью флуоресцентной микроскопии.

Мы предположили, что наблюдаемый эффект потери приона [*PSI⁺*] может быть связан с изменениями кинетики взаимодействий фибрилл с системой молекулярных шаперонов [3]. В ходе проведенных экспериментов мы не обнаружили различий в количестве агрегатов, приходящихся в среднем на одну клетку, при кратковременной сверхпродукции белка Sup35NM-M0. То есть включение белка с заменой не влияет на фрагментацию агрегатов Sup35 *in vivo*. Также мы не наблюдали разницы в эффективности связывания фибрилл Sup35NM и Sup35NM-M0 с шапероном семейства Hsp40 (белком Sis1) в

системе *in vitro*. Это позволяет нам сделать вывод о том, что элиминация приона не связана с изменением взаимодействия фибрилл с белками шаперонами.

Работа поддержана грантами РФФИ 18-34-00537 и 19-04-00173.

1. Liebman S.W., Chernoff Y.O. Prions in yeast // Genetics. 2012. V. 191. No. 4. P. 1041–1072.
2. Danilov L.G., Matveenko A.G., Ryzhkova V.E., Belousov M.V., Poleshuk O.I., Likholetova D.V., Sokolov P.A, Kasyanenko N.A., Kajava A.V, Zhouravleva G.A. Design of a New [PSI⁺]-No-More Mutation in SUP35 with Strong Inhibitory Effect on the [PSI⁺] Prion Propagation // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2019. No. 12. P. 1–14.
3. Matveenko A.G., Barbitoff Y.A., Jay-Garcia L.M., Chernoff Y.O., Zhouravleva G.A. 317–325.

Влияние гипоксии на ранозаживляющий потенциал дермальных фибробластов и возможное использование этого феномена при лечении хронических язв кожи

Соловьева Е. В., Дариенко К. А., Пантелеев А. А.

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

Darienko_KA@nrcki.ru

Разработка новых подходов к лечению хронических ран кожи не утратила своей актуальности. При незаживающих диабетических язвах (диабетическая стопа) аутотрансплантация не эффективна, причиной чего, в большой степени, является дисфункция фибробластов [1], которая приводит к нарушению синтеза белков внеклеточного матрикса (ECM), таких как COL1, COL3, Fn, а также необходимых для заживления факторов роста [2]. Было показано, что HIF-1 (фактор, индуцируемый гипоксией) является ключевым регулятором ремоделирования ECM фибробластами, активируя экспрессию пролилгидроксилаз (P4HA1, P4HA2) и лизилгидроксилазы (PLOD2), осуществляющих посттрансляционные модификации коллагена [3]. Поэтому использование стимулированных гипоксией фибробластов (sFbs) представляет собой разумную альтернативу лечения диабетических ран.

В нашей работе мы оценили уровень экспрессии генов и белков, связанных с заживлением ран, в sFbs после 24-, 48- и 72-часового воздействия 1 % O₂ (гипоксии). После 24 и 48 ч воздействия гипоксии в sFbs наблюдалось заметное увеличение экспрессии ряда генов по сравнению с контролем (21 % O₂): Hif1a – в 7,4 и 16,9 раза, соответственно; Vegf1a - 21/60; Eglн1 - 9/9; Eglн2 - 6,5 / 5; Eglн3 - 53/110; COL1 - 2,4 / 3; Fn - 3,3 / 1,7; P4HAa1 - 5,8 / 7,8; P4ha2 - 6,6 / 8,5; и Plod2 - 9/25 раз. При более длительном воздействии гипоксии (72 ч) активация была значительно ниже (Hif1a - в 2 раза; Vegf1a - 6; Eglн3 - 2,4) или полностью отсутствовала. Важно отметить, что на уровне белка под воздействием гипоксии мы наблюдали увеличение сигнала только от COL1 (в 2 раза). Выраженное увеличение синтеза COL3 и Fn было выявлено нами только после 6-18 часов повторной реоксигенации sFbs.

На основании полученных результатов, можно предположить, что непродолжительное стимулирование гипоксией дермальных фибробластов (с их дальнейшей иммобилизацией, например, на биополимерном материале) может быть использовано в качестве нового подхода для лечения хронической диабетической раны.

1. Mendez M.V., Stanley A., Phillips T., Murphy M., Menzoian J.O., & Park H.-Y. Fibroblasts cultured from distal lower extremities in patients with venous reflux display cellular characteristics of senescence. *Journal of Vascular Surgery*. 1998. 28(6), 1040–1050.
2. Chen W.Y.J. & Rogers A.A. Recent insights into the causes of chronic leg ulceration in venous diseases and implications on other types of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*. 2007. 15(4), 434–449.
3. Gilkes D.M., Bajpai S., Chaturvedi P., Wirtz D., & Semenza G.L. Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) Promotes Extracellular Matrix Remodeling under Hypoxic Conditions by Inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 Expression in Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. 288(15), 10819–10829.

Содержание сигнальных белков в спинномозговых ганглиях крысы после аксотомии седалищного нерва

Дзряян В. А., Гузенко В. В., Родькин С. В., Пителина М. А., Никул В. В.

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

dzreyan2016@mail.ru

Нейротравмы приводят к инвалидности и смерти людей, особенно мужчин молодого и среднего возраста [1]. Но нейропротекторы, способные защищать нейроны, пока не найдены. Для исследования молекулярных механизмов нейродегенерации, инициируемых аксотомией, мы изучили изменения экспрессии ряда белков, принадлежащих к разным биохимическим подсистемам, в ганглиях дорсальных корешков (DRG) крыс после перерезки седалищного нерва.

Апоптоз отдельных нейронов DRG наблюдался только через 7 дней после аксотомии. Глиальные клетки были более уязвимы. Через 24 ч после перерезки седалищного нерва уровень апоптоза глиальных клеток был втрое выше, чем в контралатеральных ганглиях, а через 7 дней – в 6 раз.

Для иммуноблоттинга объединяли DGR 4-го и 5-го поясничных нервов от 3 крыс для каждого момента времени (1, 4 и 24 часа после аксотомии) [2]. Иммуноблоттинг показал повышенную экспрессию в DRG убиквитин-гидролазы UCH-L1, каспазы 3 через 24 ч после аксотомии по сравнению с уровнями через 1-4 часа после перерезки седалищного нерва. Но их уровни не отличались от таковых в контрольных контралатеральных ганглиях. Эти неспецифические изменения, возможно, были связаны с системным ответом нервной системы крысы на локальное повреждение нерва. Изменения уровней факторов транскрипции p53 и E2F1 и гистондеацетилазы HDAC1 были более специфичными. Уровень p53 в аксотомированных ганглиях по сравнению с контрольными был выше через 24 часа после аксотомии. Экспрессия E2F1 значительно увеличилась по сравнению с контролем через 4 ч после перерезки седалищного нерва [3]. Уровень HDAC1 изменялся более выражено: на 200 % через 1 час после аксотомии и на 40 % через 4 часа.

Такие ранние изменения указывали на пусковую и регулирующую роль E2F1 и HDAC1 в реакциях DRG на перерезку седалищного нерва. Эти белки могут служить потенциальными маркерами нейротравмы и/или мишенями для терапевтического вмешательства.

Работа поддержана грантами Минобрнауки РФ, № 6.6324.2017/8.9 и 6.4951.2017/6.7.

1. Richardson P.M., Miao T., Wu D., Zhang Y., Yeh J., Bo X. (2009) Responses of the nerve cell body to axotomy. *J. Neurosurgery*, 65, suppl. 4, 74–79.
2. Savastano (2014). Sciatic nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. *J. Neurosci. Meth.* 227, 166–180.
3. Meng P., Ghosh R. (2014). Transcription addiction: can we garner the Yin and Yang functions of E2F1 for cancer therapy? *Cell death & disease*, 5, e1360. doi:10.1038/cddis.2014.326

Разработка биосенсоров для внутриклеточного мониторинга продукции промышленно важных аминокислот

Евтеева М. А., Васильев Р. А., Полушкина И. Д.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

evteevamarta@gmail.com

Для производства промышленно важных аминокислот таких как валин, треонин, триптофан и лизин используется бактериальный синтез. В то же время количественное определение эффективности производства прокариотами аминокислот для создания штаммов-продуцентов этих аминокислот является трудоемкой и затратной процедурой. Возможность прямого мониторинга образования продукта в отдельных клетках *in vivo* будет способствовать ускорению и снижению стоимости оптимизации работы штаммов-продуцентов.

Конструируемые в работе сенсоры основаны на Т-боксах – рибопереключателе, которые были обнаружены в 5'-нетранслируемых областях генов, участвующих в биосинтезе, транспорте, трансаминировании аминокислот [1–3]. Т-боксы являются естественными внутриклеточными сенсорами статуса аминоацилирования тРНК: они способны формировать шпильки, терминирующие транскрипцию, либо блокирующие инициацию трансляции нижележащего гена при связывании с аминоацилированными тРНК [3]. Это свойство Т-боксов позволило создать молекулярные сенсоры уровня аминокислот в клетках. Планируется точный подбор компонентов системы, а также введение дополнительных элементов для трансформации любых бактериальных штаммов-кандидатов в продуценты.

1. Kreuzer K.D., Henkin T.M. The T-Box Riboswitch: tRNA as an Effector to Modulate Gene Regulation. *Microbiology Spectrum*. 2018. V. 6. No. 4.
2. Vitreschak A.G. *et al.* Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria. *RNA*. 2008. V. 14. No. 4. P. 717–735.
3. Grigg J.C., Ke A. Sequence, structure, and stacking: Specifics of tRNA anchoring to the T box riboswitch. *RNA Biology*. 2013. V. 10. No. 12. P. 1761–1764.

Функциональные особенности супрамолекулярных пептидных комплексов

Забродская Я. А.¹⁻⁴, Швецов А. В.¹⁻³, Егоров В. В.^{1, 2, 4, 5}

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

² *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия*

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

⁴ *Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

⁵ *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

Разработка новых терапевтических пептидов, воздействующих на целевые клеточные белки и белки патогенных микроорганизмов, хотя и является перспективным направлением создания лекарственных препаратов (в силу высокой специфичности и низкой токсичности соединений данного класса), сопряжена с рядом сложностей, связанных со стоимостью синтеза, особенностями транспорта пептидов через клеточную мембрану и низкой устойчивостью пептидов к протеолитическим системам организма [1]. Все это не позволяет получить терапевтическим пептидам широкое распространение в современной медицине. Некоторые из описанных проблем могут быть решены за счет применения пептидов в виде супрамолекулярных комплексов (СК). Так, пептидные СК более устойчивы к действию клеточных протеолитических систем, могут обладать большей аффинностью к рецепторным молекулам за счет кооперативного эффекта и мультицентрового связывания [2], [3]. Кроме того, некоторые пептиды способны к формированию СК уже после проникновения внутрь клетки, что частично решает проблему транспорта.

В лаборатории биофизики макромолекул НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ был исследован ряд пептидов, способных к формированию СК. Показано, что формирование СК существенным образом влияет на аффинность взаимодействия пептидов с рецепторными белковыми молекулами, нуклеиновыми кислотами и нуклеопротеиновыми комплексами. Также изучается возможность использования СК, сформированных пептидами, в развитии иммунного ответа организма и воспаления, в том числе, за счет осуществления эпигенетической регуляции экспрессии генов.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ №1363 от 25.06.2019 г.) и частично в рамках Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий № 075-15-2019-1663.

1. P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, and M. Khrestchatisky, "Synthetic therapeutic peptides: science and market", *Drug Discovery Today*, vol. 15, no. 1–2, pp. 40–56, Jan 2010.
2. В. В. Кадочников, В. В. Егоров, А. В. Швецов, А. И. Ку克林, В. В. Исаев-Иванов и Д. В. Лебедев, "Моделирование особенностей конформационных переходов фибриллогенного пептида, гомологичного бета-домену альфа-лактальбумина", *Кристаллография*, т. 61, № 1, с. 107–114, 2016.
3. Y.A. Zabrodskaya, A.V. Shvetsov, V.B. Tsvetkov, and V.V. Egorov, "A double-edged sword: supramolecular complexes of triazavirine display multicenter binding effects which influence aggregate formation", *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 37, no. 12, pp. 3041–3047, Aug 2019.

***In vivo*-анализ аксонного транспорта моторных нейронов
Drosophila melanogaster с подавленной экспрессией гена *swiss cheese*
и гиперэкспрессией *NTE***

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

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

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

Нарушения развития аксонов и их дегенерация лежат в основе многих нейродегенеративных заболеваний, включая наследственную спастическую параплегию (НСП). Данное заболевание характеризуется спастичностью мышц и прогрессирующей слабостью верхних или нижних конечностей [1]. Существует более 70 видов НСП с различными патофизиологическими процессами, среди которых могут быть нарушения трансмиссии, липидного обмена, аксонного транспорта (АТ), а также митохондриальная дисфункция, обусловленная окислительным стрессом [2]. НСП типа SPG39 возникает в результате мутации в гене нейротоксичной эстеразы (*NTE*), который, в свою очередь, вовлечен в развитие синдрома отложенной нейропатии, вызванной отравлениями фосфорорганическими соединениями (*organophosphorus compound-induced delayed neuropathy, OPIDN*) [3]. Ортологом *NTE* у *Drosophila* является ген *swiss cheese* (*sws*), мутации в котором приводят к образованию многослойных глиальных структур вокруг тел нейронов и аксонов. Также происходит гибель нервных клеток путем апоптоза и, как следствие, снижается продолжительность жизни насекомого [3].

На сегодняшний день роль динамики митохондрий в аксональных дефектах при НСП остается в значительной степени неизученной. В ранее опубликованной работе [4] мы показали изменение целостности цитоскелета и уменьшение числа митохондриальных кластеров в моторных нейронах личинки *Drosophila*, что могло быть связано с нарушениями АТ. Поэтому для более полного понимания роли *NTE* в развитии нейродегенерации при НСП был проведен *in vivo* анализ АТ в мотонейронах крыла имаго *Drosophila* путем сравнения средних скоростей перемещения митохондрий. В работе были использованы трансгенные линии с гиперэкспрессией *NTE* человека и с подавлением экспрессии *sws* в нейронах.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00982.

1. Yongchao Mou, Xue-Jun Li. Rescue axonal defects by targeting mitochondrial dynamics in hereditary spastic paraplegias / Yongchao Mou // Neural Regeneration Research. – 2018. V. 14. – P. 574–577.
2. Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: Opportunities for translational research? / Kurt J. De Vos; Majid Hafezparast // Neurobiology of Disease. – 2017. –V. 105. – P. 283–399.
3. Sunderhaus E.R., Law A.D., Kretzschmar D. Disease-Associated PNPLA6 Mutations Maintain Partial Functions When Analyzed in *Drosophila* / Sunderhaus E.R. // Frontiers in Neuroscience. – 2019. V. 13. P.1–9.
4. Ryabova E. *et al.* Swiss Cheese, Drosophila Ortholog of Hereditary Spastic Paraplegia Gene NTE, Maintains Neuromuscular Junction Development and Microtubule Network // *Drosophila melanogaster – Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*. – InTech, 2018.

Сравнение способности к агрегации в клетках дрожжей транскрипционного фактора Sfp1 и его гомолога JAZF1

Зайцева Н. А., Матвеев А. Г., Журавлева Г. А.

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

neptunium@gmail.com

JAZF1 – транскрипционный фактор у человека, который является гомологом дрожжевого глобального транскрипционного регулятора Sfp1. Ранее нами было показано, что при сверхпродукции в клетках *Saccharomyces cerevisiae* Sfp1 формирует детергент-устойчивые агрегаты [1], которые частично колокализуются с агрегатами прионных белков Sup35 и Rnq1, с шапероном Sis1, и ассоциированными с ним факторами Btn2 и Cur1. Sis1 является шапероном Hsp40, необходимым для поддержания прионов дрожжей, в том числе $[PSI^+]$ [2]. Кроме того, мы наблюдали частичную колокализацию с цитоплазматическим вариантом Sis1 (NES-Sis1), но не с ядерным (NLS-Sis1), что говорит о том, что агрегаты Sfp1 в основном расположены в цитоплазме.

Известно, что JAZF1 похож на Sfp1 по количеству и расположению мотивов “цинковые пальцы”. Мы проверили JAZF1 на способность формировать агрегаты при сверхпродукции в клетках дрожжей. В большинстве клеток мы наблюдали диффузное свечение белка EYFP-JAZF1, однако в редких случаях можно было увидеть скопления неизвестной природы. Мы посмотрели, колокализуются ли данные скопления с разными вариантами Sis1. Мы не наблюдали колокализации JAZF1 с Sis1 и NES-Sis1, однако иногда наблюдалась колокализация с NLS-Sis1, что, возможно, говорит о том, что у дрожжей JAZF1 может находиться в ядре, так же как в клетках человека [3]. Кроме того, JAZF1 часто обнаруживался в дрожжевых вакуолях. При этом нами не было обнаружено колокализации JAZF1 с агрегатами $[PSI^+]$, визуализированными с помощью временной экспрессии SUP35NM-yTagRFP-T.

Стоит также отметить, что рост клеток при сверхэкспрессии SFP1 и JAZF1 различался: в первом случае мы могли наблюдать токсичный эффект сверхэкспрессии SFP1, во втором случае влияния на жизнеспособность не было обнаружено.

Таким образом, в отличие от Sfp1, JAZF1 скорее всего не формирует агрегаты в клетках дрожжей, однако необходимо проверить данное предположение с помощью биохимических методов.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00536 и РЦ «РМукТ» НП СПбГУ.

1. Matveenکو A.G., Drozdova P.B., Belousov M.V., Moskalenko S.E., Bondarev S.A., Barbitoff Y.A., ... & Zhouravleva G.A. (2016). SFP1-mediated prion-dependent lethality is caused by increased Sup35 aggregation and alleviated by Sis1. *Genes to Cells*, 21(12), 1290–1308.
2. Higurashi T. *et al.* (2008). “Specificity of the J-protein Sis1 in the propagation of 3 yeast prions”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(43): 16596–16601.
3. Nakajima T. *et al.* (2004). “TIP27: a novel repressor of the nuclear orphan receptor TAK1/TR4”. *Nucleic Acids Res* 32(14): 4194–4204.

Комплексообразование двухзарядных катионов меди, цинка и свинца с бензоазакраун-эфирами

Замуруева Л. С.¹, Алёшин Г. Ю.¹, Егорова Б. В.¹,
Зубенко А. Д.², Пашанова А. В.²

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

² Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН,
Москва, Россия

lyubovzam@mail.ru

Радионуклиды различных металлов представляют большой интерес для применения в ядерной медицине. Например, изотопы меди и цинка могут применяться для диагностики (^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{62}Cu , ^{61}Cu , ^{60}Cu , ^{63}Zn) и терапии раковых заболеваний (^{67}Cu , ^{64}Cu) [1, 2]. Изотоп ^{62}Zn является материнским радионуклидом для ^{62}Cu , а ^{212}Pb – для ^{212}Bi , перспективного альфа-излучателя для терапии. Эти два радионуклида могут применяться для создания *in vivo* генераторов [3].

Главными задачами исследований являются не только получение и выделение этих изотопов, но и их дальнейшая адресная доставка непосредственно к опухолевым тканям в организме, для чего необходимо связать радионуклид с биологической молекулой, которая осуществляет доставку к раковым клеткам за счет сродства к ним. Радионуклид связывается с такими биологическими молекулами в составе комплекса с органическим лигандом. Азакраун-эфиры образуют устойчивые комплексы со многими металлами, поэтому в данной работе для исследования были выбраны бензотриаза-15-краун-5 и его производное.

Константы протонирования лигандов и константы устойчивости комплексов определялись методом потенциометрического титрования. Наиболее устойчивыми оказались комплексы меди с лигандом 1 ($\log K(\text{CuL})=15,6$) и лигандом 2 ($\log K(\text{CuL})=16,8$), а также комплекс цинка с лигандом 2 ($\log K(\text{ZnL})=14,9$). Для них были подобраны условия получения комплексов с соответствующими радионуклидами: концентрации лигандов 10^{-4} М (для комплексов с $^{61,64}\text{Cu}$) и 10^{-3} М (для комплекса с ^{65}Zn), $T=25^\circ\text{C}$ и $\text{pH}=4-7$. В условиях *in vitro* (в сыворотке крови) комплексы с медью оказались нестабильны, а комплекс с цинком устойчивым в течение рассматриваемого времени (3 дня), а также в условиях *in vivo* (в организме мышей), что делает его перспективным компонентом радиофармпрепарата для ПЭТ.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 18-73-10035.

1. Boschi A., Martini P., Janevik-Ivanovska E., Duatti A. The emerging role of copper-64 radiopharmaceuticals as cancer theranostics // Drug Discov. Today. Elsevier Ltd. 2018. V. 23. No. 8. P. 1489–1501.
2. Boros E., Packard A.B. Radioactive Transition Metals for Imaging and Therapy: review-article // Chem. Rev. American Chemical Society, 2019. V. 119. No. 2. P. 870–901.
3. Milenic D.E., Garmestani K., Brady E.D., Albert P.S., Ma D., Abdulla A., Brechbiel M.W. α -Particle Radioimmunotherapy of Disseminated Peritoneal Disease Using a ^{212}Pb -Labeled Radioimmunoconjugate Targeting HER2 // Cancer Biother. Radiopharm. 2005. V. 20. No. 5. P. 557–568.

Исследование влияния макрофагов на секрецию цитокинов при кокультивации с CAR-T-клетками

Змиевская Е. А.¹, Валиуллина А. Х.¹, Журавлева М. Н.¹, Петухов А. В.^{1, 2},
Мифтахова Р. Р.¹, Ризванов А. А.¹, Булатов Э. Р.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

Иммунотерапия опухолевых заболеваний с применением Т-лимфоцитов с химерным антигенным рецептором (CAR-T) является перспективным направлением онкоиммунологии. Показав свою эффективность и получив регистрацию FDA (Food and Drug Administration) для лечения В-клеточных (CD19+) гемобластозов, CAR-T терапия в применении к солидным опухолям встретила ряд трудностей [1]. Одна из главных проблем CAR-T терапии – это возможность развития серьезного осложнения – синдрома цитокинового шторма (СЦШ), что в крайних проявлениях становится жизнеугрожающим состоянием [2]. Причиной развития СЦШ является непосредственный контакт Т-лимфоцита с опухолевой клеткой и последующая его активация, однако есть данные и о значительном участии в этом процессе макрофагов [3].

Целью работы являлось установление влияния макрофагов разных фенотипов на секрецию цитокинов при кокультивации с CAR-T клетками. На первом этапе, методом иммуномагнитной сепарации из общей популяции мононуклеарных клеток периферической крови выделены моноциты, с последующей дифференцировкой в макрофаги M1 и M2 фенотипа. Затем клетки M1, M2 и CAR-T кокультивировались с опухолевой линией PC-3M(Kat+CD19+) в течение 5 суток, после чего проводились конфокальная микроскопия и мультиплексный анализ супернатантов.

Конфокальной микроскопией показано, что кокультивирование опухолевой линии PC-3M(Kat+CD19+) с CAR-T клетками приводит к снижению количества опухолевых клеток, что свидетельствует о противоопухолевом действии CAR-T клеток. Мультиплексным анализом было выявлено, что макрофаги обеих популяций не влияют на уровень секреции IFN γ и TNF α . Однако, популяция M1 способствует высвобождению IL-1b, а добавление M2 приводит к снижению уровня Ил-6 и Ил-17F. Также выявлено увеличение секреции sCD40L при добавлении макрофагов обеих популяций.

*Проект поддержан стипендией Президента РФ СП-227.2019.4.
Эксперименты выполнены при поддержке гранта РНФ 19-74-20026.*

1. Wang Z. A long way to the battlefield: CAR T cell therapy against solid cancers / Z. Wang, W. Chen, X. Zhang, Z. Cai, W. Huang // Journal of Cancer. – 2019. – V. 10. – P.3112–3123.
2. Metzinger M.N. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: Reach to Solid Tumor Experience / M.N. Metzinger, C. Verghese, D.M. Hamouda, A. Lenhard, K. Choucair, N. Senzer, F.C. Brunicardi, L. Dworkin, J. Nemunaitis // Oncology. – 2019. – V. 97. – P. 59–74.
3. Sachdeva M. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inactivation in CAR T-cells prevents monocyte-dependent release of key cytokine release syndrome mediators / M. Sachdeva, P. Duchateau, S. Depil, L. Poirot, J. Valton // J. Biol. Chem. – 2019. – V. 14. – P. 5430–5437.

Создание панели псевдовирусов Эбола

Зыбкина А. В., Кононова Ю. В., Щербаков Д. Н.

Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская обл., Россия

zybkina_av@vector.nsc.ru

Вирус Эбола вызывает геморрагическую лихорадку с высоким уровнем летальности. Крупные вспышки в Западной Африке в 2014–2015 годах и Демократической Республике Конго в 2018–2019 годах заставляют обратить повышенное внимание на эту группу вирусов. В настоящее время отсутствуют лицензированные препараты против вируса Эбола. Разработку препаратов задерживают, в том числе строгие правила и опасность работы с натуральным вирусом. В последнее время разработан ряд подходов, позволяющих изучать особенности гуморального иммунного ответа с использованием псевдотипированных вирусоподобных частиц одного цикла [1]. Данная технология безопасна и высокоэффективна. С использованием этого подхода получают вирусоподобные частицы, псевдотипированные поверхностным гликопротеином исследуемого вируса при этом подобные частицы не способны к репликации, что обеспечивает высокую степень безопасности работы [1–3].

Работа направлена на получение рабдовирусных частиц, псевдотипированных поверхностным гликопротеином (GP) вируса Эбола. Для этого проведен анализ доступных геномов вируса, представленных на сайте GenBank, и выбраны последовательности, кодирующие GP штаммов: *Zaire ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Reston ebolavirus*, *Tai Forest ebolavirus*, *Bombali ebolavirus*. Синтез нуклеотидных последовательностей осуществлен коммерческой фирмой (ДНК-синтез, Москва). Соответствие нуклеотидной последовательности подтверждено секвенированием. Данные последовательности были клонированы в составе коммерчески доступного вектора pHMGFP. Полученными плазмидами, содержащими последовательности GP *Zaire ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Reston ebolavirus*, *Tai Forest ebolavirus* и *Bombali ebolavirus* трансфецировали клетки HEK293FT. Функциональная активность полученных частиц проверена при помощи панели культур клеток эукариот.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-34-90076 «Аспиранты».

1. Whitt M.A. Generation of VSV pseudotypes using recombinant Δ G-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines // Journal of virological methods. – 2010. – V. 169. – No. 2. – P. 365–374.
2. Wool-Lewis R.J., Bates P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines // Journal of virology. – 1998. – V. 72. – No. 4. – P. 3155–3160.
3. Quinn K. *et al.* Rho GTPases modulate entry of Ebola virus and vesicular stomatitis virus pseudotyped vectors // Journal of virology. – 2009. – V. 83. – No. 19. – P. 10176–10186.

**Подавление экспрессии гена *swiss cheese*
в разных типах клеток нервной системы *Drosophila melanogaster*
влияет на общий уровень нейродегенерации в мозге**

Иванова Е. А., Мелентьев П. А., Тимошенко С. И., Саранцева С. В.

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

katya-i.ivanova@yandex.ru

Drosophila melanogaster является одним из наиболее популярных модельных объектов для изучения нейродегенеративных заболеваний, характерная особенность которых – прогрессирующая с возрастом гибель нервных клеток. Наиболее известные из них – болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др. Несмотря на многочисленные исследования, на данный момент механизмы нейродегенерации остаются недостаточно изученными, из-за чего возникают трудности в поиске эффективных методов лечения и профилактики данных заболеваний.

Одним из генов дрозофилы, мутации в котором приводят к нейродегенерации, является ген *sws* (*swiss cheese*), ортологи которого найдены у большого числа организмов, в том числе и у человека [1]. У дрозофилы ген *sws* экспрессируется в нервных и глиальных клетках, он важен для поддержания их жизнедеятельности и функционирования. Белок локализуется на мембранах клетки и эндоплазматического ретикулума в нервной системе, выполняет функцию сериновой эстеразы [2].

У линий мух с мутациями в данном гене глиальные клетки излишне оборачиваются вокруг нейронов, в мозге особей появляются пустоты. Ранее с помощью метода конфокальной микроскопии нами было показано нарушение структуры мозга дрозофилы при нокадауне *sws* в разных типах глиальных клеток. Были обнаружены прогрессирующие с возрастом изменения структуры субпериневральной, кортексной и оборачивающей (*ensheathing*) глии [3]. Однако до настоящего времени неизвестно как влияет подавление экспрессии гена *sws* в разных типах клеток нервной системы на общее состояние мозга дрозофилы.

Нами были проанализированы срезы мозга особей с подавлением экспрессии гена *sws* в периневральной, субпериневральной, кортексной глии, во всех типах глии, во всех нейронах. Мы установили, что подавление экспрессии данного гена приводит к зависящему от возраста повышению доли полостей в мозге, наибольшему у особей с подавлением экспрессии гена *sws* во всех нейронах.

1. Kretschmar D. *et al.* Journal of Neuroscience. 17 (19) (1997).
2. Kretschmar D. J Neurogenet, 23 (1-2) (2009).
3. Рябова Е. В. Изучение глиальных клеток у мутантов по гену *swiss cheese Drosophila melanogaster* / Е. В. Рябова; СПбПУ Петра Великого. – СПб., 2017. – 52 с.

**Эволюция надмолекулярной и кристаллической структуры
бактериальной целлюлозы, гидролизованной целлобиогидролазой
для разработки биodeградируемого материала**

Иванова Л. А.^{1, 2*}, Верлов Н. А.^{1, 2}, Бурдаков В. С.^{1, 2},
Копица Г. П.¹, Кульминская А. А.^{1, 2}

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

² Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий
НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

* Ivanova_la@pnpi.nrcki.ru

Бактериальная целлюлоза (БЦ), синтезируемая некоторыми грамотрицательными бактериями на поверхности раздела воздух-вода, активно используется в тканевой инженерии благодаря ряду своих уникальных свойств: гигроскопичность, паро- и водопроницаемость и безупречная биосовместимость [1–3]. Одним из существенных ограничений для широкого использования этого материала в инженерии кожной ткани и заживлении ран является его низкая биodeградируемость из-за отсутствия в организме человека ферментов с целлюлитической активностью [4].

Бактериальную целлюлозу, синтезированную штаммом *Gluconoacetobacter hansenii* ATCC 10821, впервые обрабатывали целлобиогидролазой из дрожжевого гриба *Scytalidium candidum* ЗС (CBHSc). Структура БЦ на разных стадиях ферментативного гидролиза изучалась методами рентгеновской дифракции, малоуглового и ультрамалоуглового рассеяния нейтронов, атомно-силовой (АСМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), а также низкотемпературной адсорбции азота. Нами показано что ферментативный гидролиз оказывает существенное влияние на как кристаллическую, так и надмолекулярную структуру нативной нано-гель пленки БЦ, представляющей собой 3D полимерную сеть, состоящую из нанолент толщиной около 8 и шириной 50 нм с развитой удельной поверхностью $S_{БЭТ} \sim 260 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$. Обнаружено, что биodeградация приводит к уменьшению (~10 %) среднего размера кристаллов, значительному увеличению размеров нанолент и существенному уменьшению удельной поверхности до $S_{БЭТ} \sim 100 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$. Микрофотографии АСМ и СЭМ показывают «разрыхление» микроструктуры БЦ, а также образование и накопление субмикронных частиц в узлах трехмерной полимерной сети, которые, по-видимому, являются продуктами ферментативного гидролиза. Установлено, что добавление фермента в образцы БЦ не приводило к токсическим эффектам в первичной клеточной линии глиобластомы *in vitro*.

*Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт»
(приказ от 25.06.2019 г. № 1363).*

1. Picheth G.F., Pirich C.L., Sierakowski M.R., Woehl M.A., Sakakibara C.N., de Souza C.F., Mar-tin A.A., da Silva R., de Freitas R.A. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *Int J Biol Macromol.* 2017, 104, 97–106. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171
2. Xue Y., Mou Z., Xiao H. Nanocellulose as Sustainable Biomass Material: Structure, properties, present status and future prospects in biomedical applications. *Nanoscale*, 2017, 9(39), 14758–14781. doi: 10.1039/c7nr04994c
3. Bacakova L., Pajorova J., Bacakova M., Skogberg A., Kallio P., Kolarova K., Svorcik V. Versatile application of nanocellulose: from industry to skin tissue engineering and wound healing. *Nano-mat.* 2019, 9, 164; doi: 10.3390/nano9020164
4. de Oliveira Barud H.G., da Silva R.R., da Silva Barud H., Tercjak A., Gutierrez J., Lustri W.R., de Oliveira O.B., Ribeiro S.L. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applica-tions: Bacterial cellulose. *Carbohydr. Polym.* 2016, 153, 406–420. doi: 10.1016/j.car-bpol.2016.07.059

Изучение механизмов связывания HP1a с эухроматином плечей хромосом в соматических клетках яичников *Drosophila*

Ильин А. А., Столяренко А. Д., Шевелев Ю. Я.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

ilyin@img.ras.ru

Хроматин подразделяется на два основных типа: более конденсированный гетерохроматин и менее плотно упакованный эухроматин. Перицетромерные и теломерные участки составляют конститутивный гетерохроматин, тогда как факультативный гетерохроматин распределен по хромосомным плечам [1]. Белок гетерохроматина 1a (heterochromatin protein 1a, HP1a) является известным компонентом конститутивного гетерохроматина дрозофилы [2]. При этом некоторые исследования указывают на ассоциацию HP1a с эухроматиновыми генами и его положительное влияние на их транскрипцию и стабильность транскриптов [3]. Однако, механизмы связывания HP1a с плечами хромосом до сих пор не ясны.

Мы определили домены связывания HP1a с ДНК в соматических клетках яичников дрозофилы при помощи метода DamID-seq и сравнили их с местами встройки мобильных элементов (МЭ), определенных с помощью геномного секвенирования. Несмотря на то, что домены HP1a покрывают только 13 % эухроматина плечей хромосом, они не случайно перекрываются с 42 % вставок МЭ. Более того, происходит распространение HP1a от мест встроек на расстояние до 10 т.п.н. При этом лишь 18 % доменов HP1a располагаются вблизи от вставок МЭ, что предполагает наличие других механизмов возникновения доменов HP1a. Например, много независимых от МЭ доменов пересекаются с участками генома, связанными с ядерными порами, или содержат промоторы активно транскрибирующихся генов. Интересно, что нахождение промоторов этих генов в доменах HP1a не приводит к их репрессии. Более того, уровень транскрипции многих генов, находящихся вне доменов связывания с HP1a, изменился при нокадауне HP1a в соматических клетках яичников, что обусловлено непрямым эффектом от этой деплеции. В целом, наши данные указывают на наличие как минимум трех механизмов возникновения доменов HP1a в эухроматиновых плечах хромосом: распространение от мест инсерций МЭ, взаимодействие с хроматином, расположенным около комплексов ядерных пор и привлечение к промоторам генов со сравнительно высоким уровнем экспрессии.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-34-00140.

1. S.I. Grewal, S. Jia, *Nature Reviews Genetics*. 8, 35 (2007).
2. J.C. Eissenberg, S.C. Elgin, *Trends in Genetics*. 30, 103 (2014).
3. S.H. Kwon, J.L. Workman, *Bioessays*. 33, 280 (2011).

Влияние антисмысловых LNA-олигонуклеотидов на сплайсинг гена *SMN2* в культуре фибробластов пациентов со спинальной мышечной атрофией

Ильина А. В.¹, Маретина М. А.², Крылова Н. В.¹, Егорова А. А.², Киселев А. В.²

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

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

Спинальная мышечная атрофия (СМА) – тяжелое аутосомно-рецессивное нейродегенеративное заболевание. Причина – делеция гена *SMN1*, приводящая к дефициту полноразмерного белка SMN и фенотипически проявляются в прогрессирующей мышечной слабости вследствие деградации альфа-мотонейронов спинного мозга [1]. Частота заболевания 1 на 7000 новорожденных [2]. У гена *SMN1* есть высокогомологичный паралог – ген *SMN2*. Одна из замен приводит к изменению сродства факторов сплайсинга к премРНК данного гена, следствием этого является пропуск 7 экзона в 90 % транскриптов (*del7-SMN*). Только 10 % транскриптов являются полноразмерными (*FL-SMN*). Воздействуя на сайленсеры сплайсинга гена *SMN2* антисмысловыми олигонуклеотидами (АСО), можно добиться увеличения уровня полноразмерных транскриптов, что находит применение при разработке лекарственных препаратов для терапии заболевания [3].

Целью работы является оценка эффективности действия антисмысловых LNA-олигонуклеотидов (АСО - LNA) на сайленсеры сплайсинга гена *SMN2*.

В работе были использованы разработанные нами олигонуклеотиды с модификацией LNA. Их эффективность сравнивалась с разработанными ранее АСО, содержащими метильную группу. Доставка терапевтических АСО осуществлялась с использованием коммерческого носителя X-tremeGENE. Трансфекция была проведена на культуре фибробластов, полученных от пациентов со СМА.

Анализ транскриптов был проведен с помощью метода ПЦР с обратной транскрипцией с последующей визуализацией на электрофореze в полиакриламидном геле. Анализ электрофореграмм производился в программе ImageJ. Токсическое действие АСО оценивали при помощи красителя Alamar Blue.

В результате было установлено, что АСО-LNA способны повышать уровень полноразмерных транскриптов *SMN*. Таким образом, АСО-LNA могут в перспективе стать эффективным средством для терапии СМА.

1. Lefebvre A., Mauffret O., Hartmann B., Lescot E. & Femandjian S. // Biochem. 1995. V. 34. P.12019–12028.
2. Селиверстов Ю. А., Ключников С. А., Иллариошкин С. Н. Спинальные мышечные атрофии: понятие, дифференциальная диагностика, перспективы лечения // Неврологический алгоритм. 2015. Т. 3. С. 9–17.
3. Sivanesan S. *et al.* Antisense oligonucleotide mediated therapy of spinal muscular atrophy // Translational neuroscience. – 2013. – V. 4. – No. 1. – P. 1–7.

**Создание трансгенной линии мышей 5xFAD-M
для анализа патоморфологических изменений нейронов гиппокампа
при болезни Альцгеймера**

Ильина А. Р.^{1, 2}, Красковская Н. А.², Линькова Н. С.^{1, 3}

¹ Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», отдел биogerонтологии, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербург, Россия

³ Кафедра терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Академии постдипломного образования Федерального научно-клинического центра специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, Москва, Россия

juin96@mail.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) – нейродегенеративное заболевание, являющееся основной причиной деменции у пожилых людей. Характерным гистопатологическим признаком БА является накопление β -амилоида в тканях головного мозга [4], однако ранним проявлением БА, коррелирующим с ухудшением когнитивных способностей, является снижение количества синаптических контактов в нейронах гиппокампа [7]. Функциональные изменения в синапсе при развитии БА находят отражение в изменении морфологии постсинаптических структур – дендритных шипиков [1]. В настоящее время визуализация нейронов для морфологических исследований осложнена необходимостью окрашивания предварительно фиксированных препаратов мозга [2] или инжектирования дорогостоящих аденоассоциированных вирусов *in vivo* [8].

Для визуализации нейронов гиппокампа при БА был проведен кросс-бридинг мышей линии 5xFAD [5] и линии М [3]. Линия мышей 5xFAD была использована для моделирования БА, так как содержит 5 наследственных мутаций в белках, играющих ключевую роль в формировании нейропатологии при развитии БА [5]. У мышей линии М в отдельных нейронах головного мозга, в том числе в пирамидных нейронах CA1 области гиппокампа, экспрессируется зеленый флуоресцентный белок (GFP), не изменяющий синаптические структуры [3].

Полученная линия 5xFAD-M позволяет различать морфологию отдельных нейронов мозга без применения указанных выше методик [2, 8]. Линия мышей 5xFAD-M может быть использована при анализе патоморфологических изменений нейронов гиппокампа при БА, для оценки влияния потенциальных терапевтических препаратов на плотность

синаптических контактов, а также динамические изменения в структуре дендритного дерева *in vivo* при проведении поведенческих тестов.

1. Bourne J.N., Harris K.M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* 2008. Vol. 31. P. 47–67. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646
2. Du F. Golgi-Cox Staining of Neuronal Dendrites and Dendritic Spines With FD Rapid GolgiStain™ Kit. *Curr Protoc Neurosci.* 2019. 88(1). e69. doi: 10.1002/cpns.69
3. Feng G., Mellor R.H., Bernstein M., Keller-Peck C., Nguyen Q.T., Wallace M., Sanes J.R. Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. 2000. *Neuron.* 28(1). P. 41–51. doi: 10.1016/s0896-6273(00)00084-2. Stock No:007788
4. Long J.M. and Holtzman D.M. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell.* 2019. 179(2). P. 312–339. doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001
5. Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., Van Eldik L., Berry R., Vassar R. Intraneuronal β -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci.* 2006. 26(40). P. 10129-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006. Stock No:34840-JAX
6. Popugaeva E., Bezprozvanny I. STIM proteins as regulators of neuronal store-operated calcium influx. *Neurodegener Dis Manag.* 2018. 8(1). P. 5–7. doi: 10.2217/nmt-2017-0053
7. Pchitskaya E., Kraskovskaya N., Chernyuk D., Popugaeva E., Zhang H., Vlasova O., Bezprozvanny I. Stim2-Eb3 Association and Morphology of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons. *Sci Rep.* 2017. 7(1). 17625. doi: 10.1038/s41598-017-17762-8
8. Smith C.A., Chauhan B.C. *In vivo* imaging of adeno-associated viral vector labelled retinal ganglion cells. *Sci Rep.* 2018. 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-19969-9

Исследование полиспецифичности модифицированного ионами железа препарата сывороточного иммуноглобулина А человека

Илюкина Н. А., Старкина О. В., Горшкова Е. Н., Василев Ч. Л.

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

letjagaletjaga@yandex.ru

Полиспецифичность рассматривается как возможность антитела образовывать комплекс с разными структурно неродственными ауто- или чужеродными антигенами. В случаях патологических состояний происходит выделение большого количества проокислительных веществ, таких как, например, ионы железа (II). Под действием физических и химических агентов можно изменить спектр антигенов, связанных одним антителом [1, 2].

Ранее было показано, что антитела с индуцированной полиспецифичностью могут проявлять способность нейтрализовать патогены и демонстрируют иммунорегуляторный потенциал при воспалительных состояниях, что позволяет предположить, что они могут послужить основой для разработки новых терапевтических препаратов [3].

Целью настоящей работы является изучение влияния ионов железа Fe (II) на индукцию полиспецифичности сывороточного иммуноглобулинового препарата класса А человека.

Задачи исследования:

- модифицировать сывороточный препарат иммуноглобулина А человека ионами двухвалентного железа в различных концентрациях;
- провести сравнительный анализ полиспецифичности нативного и модифицированного сывороточных иммуноглобулиновых препаратов с помощью методов иммуноферментного анализа и вестерн-блота.

В качестве антигенов были взяты лизаты клеток *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, клетки опухоли кишечника человека Colo 205 и вирусные антигены HCV, HDV, HIV1 и HIV1. Исследование показало, что обработка сывороточного иммуноглобулина класса А человека ионами железа Fe (II) увеличивает полиспецифичность препарата *in vitro*. В дальнейшем планируется изучение терапевтического эффекта препарата модифицированного сывороточного иммуноглобулина А человека на животных с индуцированным септическим воспалением.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-54-18018.

1. Dimitrov J.D., Pashov A.D., Vassilev T.L. Antibody polyspecificity: what does it matter? // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. V. 750. P. 213–226.
2. Седых С. Е., Бунева В. Н., Невинский Г. А. Полиреактивность природных антител; обмен HL-фрагментами // Биохимия. 2013. Т. 78. С. 1651–1669.
3. Lecerf M., Jarossay A., Kaveri S.V. *et al.* Methods for Posttranslational Induction of Polyreactivity of Antibodies // Natural Antibodies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. 2017. V. 1643. P. 135–146.

Гаптоглобин как онкомаркер глиобластомы

Кабаченко Ф. Ю.¹, Белякова Н. В.², Ронжина Н. Л.²,
Легина О. К.², Нарыжный С. Н.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

fkabachenko@gmail.com

Гаптоглобин (Hr) является белком острой фазы плазмы крови. Основная функция Hr заключается в связывании высвобождающегося гемоглобина из поврежденных эритроцитов и ингибировании его окислительной активности. В организме человека Hr представлен тремя основными фенотипами: Hr1-1, Hr2-1, Hr2-2. Фенотип Hr1-1 экспрессирует α 1-цепь (8,9 кДа), фенотип Hr2-2 - α 2-цепь (16 кДа), а фенотипу Hr2-1 свойственно иметь как α 1-, так и α 2- цепи, β -цепь является общей [1]. Интересно то, что была найдена связь между фенотипами Hr и патологиями человека. Так, люди с фенотипом Hr2-2 больше подвержены сердечно-сосудистым заболеваниям, резистентной гипертензии, раку мочевого пузыря. Наличие же фенотипа Hr2-1 повышает риск первичного рака яичников [2]. Также было показано, что повышение уровня α 2-цепи может быть связано и с глиобластомой [3]. Кроме того, имеются также данные и о связи посттрансляционных модификаций цепей Hr, в частности гликозилирования, с онкологией [4, 5].

Этим аспектам функционирования гаптоглобина, которые затрагивают его связь с процессами, происходящими при злокачественными заболеваниями, в частности глиобластомой, и посвящено наше исследование. В наших экспериментах мы применили двумерный гель-электрофорез (2DE) для анализа протеоформ белков плазмы, в том числе и гаптоглобина. При этом уровень различных протеоформ цепей гаптоглобина можно оценить на основании интенсивности соответствующих им пятен. В частности, нами были получены достоверные ($p < 0.05$) данные о существенном (двукратном) увеличении концентрации двух протеоформ α 2-цепи гаптоглобина в крови пациентов с глиобластомой по сравнению со здоровыми донорами. Данные результаты в совокупности с литературными данными указывают на то, что гаптоглобин, а именно его альфа2-цепь может быть потенциальным онкомаркером глиобластомы. Соответственно, мы планируем направить наши дальнейшие исследования на детальный анализ протеоформ этой цепи.

1. M.R. Langlois, J.R. Delanghe. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans.
2. Vânia Peretti de Albuquerque Wobeto, Tânia Regina Zaccariotto, Maria de Fátima Sonati. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance.
3. D.M. Kumar, B. Thota, S.V. Shinde et al. Proteomic Identification of Haptoglobin r2 as a Glioblastoma Serum Biomarker: Implications in Cancer Cell Migration and Tumor Growth.
4. Petr Pompach, Zuzana Brnakova, Miloslav Sanda, Jing Wu, Nathan Edwards, Radoslav Goldman. Site-specific Glycoforms of Haptoglobin in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma.
5. Haou-Tzong Ma, Supawadee Sriyam, Supachok Sinchaikul, Hsien-Yu Tsai, Suree Phutrakul, Shui-Tein Chen. Proteomics Characterization of Haptoglobin Alpha-2 Subunit in Non-Small Cell Lung Cancer Serum and Various Human Materials.

Исследования процессов формирования биокристаллов Dps-ДНК

Камышинский Р. А.^{1, 2}, Чесноков Ю. М.^{1, 2}, Дадинова Л. А.², Можеев А. А.²,
Петухов М. В.², Орехов А. С.^{1, 2}, Штыкова Э. В.², Васильев А. Л.^{1, 2}

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

² Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография
и фотоника» РАН, Москва, Россия

kamyshinsky.roman@gmail.com

В качестве защитной реакции на воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды в бактериальных клетках *Escherichia coli* происходит образование нанокристаллов комплекса Dps-ДНК [1, 2]. Такой защитный механизм способен обеспечить длительную сохранность генома при экстремальных температурах, голодании, воздействии радиации и антибиотиков. Помимо фундаментального научного интереса актуальность изучения комплекса Dps-ДНК определяется широким потенциалом в разработке новых принципов борьбы с бактериальной резистентностью к лекарственным препаратам.

Несмотря на известность феномена внутриклеточной кристаллизации, механизм образования биокристаллов Dps-ДНК остается слабоизученным, а большинство предложенных на сегодняшний день моделей комплекса носят умозрительный характер. Однако, недавние результаты исследований биокристаллов Dps-ДНК *in vitro* [3], в частности полиморфизм структур в зависимости от параметров буфера и локальной концентрации ионов [4], указывают на потенциальную возможность формирования наноразмерных ко-кристаллов с различным типом упаковки на разных стадиях биокристаллизации в зависимости от внешних условий.

В данной работе методами криоэлектронной микроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния изучено *in cellulo* формирование биокристаллов Dps-ДНК в различных штаммах *E. coli* в зависимости от типа и продолжительности стрессового воздействия.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-10071).

1. S.G. Wolf, D. Frenkiel, T. Arad, S.E. Finkel, R. Kolter, A. Minsky. DNA protection by biocrystallization // *Nature*. 1999. V. 400. P. 83–85.
2. D. Frenkiel-Krispin, I. Ben-Avraham, J. Englander, E. Shimoni, S. G. Wolf, A. Minsky. Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 51. No. 2. P. 395–405.
3. L.A. Dadinova, Y.M. Chesnokov, R.A. Kamyshinsky, I.A. Orlov, M.V. Petoukhov, A.A. Mozhaev, E.Yu. Soshinskaya, V.N. Lazarev, V.A. Manuvera, A.S. Orekhov, A.L. Vasiliev, E.V. Shtykova. Protective Dps–DNA co-crystallization in stressed cells: an *in vitro* structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography // *FEBS Lett.* 2019. V. 593. No. 12. P. 1360–1371.
4. Kamyshinsky R., Chesnokov Y., Dadinova L., Mozhaev A., Orlov I., Petoukhov M., Orekhov A., Shtykova E., Vasiliev A. Polymorphic Protective Dps-DNA Co-Crystals by Cryo Electron Tomography and Small Angle X-Ray Scattering // *Biomolecules*. 2020. 10(1), 39.

Динамика возбужденных состояний металлокомплексов серебра с цитозиновыми компонентами ДНК

Капитонова М. А., Ревезук З. В., Кононов А. И.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

octopus7868@gmail.com

Хорошо известно, что солнечный свет является мутагенным агентом, вызывающим различные повреждения ДНК, которые могут вызывать рак кожи [1]. Реакция образования фотопродуктов ДНК протекает очень быстро – в течение ~ 1 пс, за такое время основания не успевают перегруппироваться [2]. Выяснение, вследствие каких возбужденных состояний начинаются фотохимические реакции, и какова их природа, имеет жизненно важное значение для понимания фундаментальных принципов фотохимии ДНК. Эти первичные фотопроцессы происходят в фемтосекундном масштабе времени и сильно влияют на последующую фотохимию. Они были и остаются предметом большого количества исследований [3]. ДНК также активно рассматривается как элемент различных наноконструкций, в том числе, в комплексах с металлами [4].

Ранее нами была изучена динамика эмиссии флуоресценции на фемтосекундной временной шкале для нейтральных одноцепочечных и полупротонированных форм (*i*-мотив) цитозиновых цепочек (dC)₁₀. Для *i*-мотива на ап-конверсионных кривых затухания флуоресценции, полученных до 6 пс, видны две компоненты. Быстрая компонента может быть отнесена к излучению dCp из локально возбужденного состояния. Медленная компонента относится к делокализованному (экситонному) возбужденному состоянию. Делокализованное эмиссионное состояние, вероятно, является предшественником дальнейшего формирования долгоживущих эксимерных состояний с переносом заряда, наблюдаемых в структурах с *i*-мотивом [5].

В представленной работе изучалась динамика возбужденных состояний металлокомплексов серебра с цитозиновыми компонентами ДНК. Проводился подбор условий для формирования определенных структур на их основе. Методами кругового дихроизма и масс-спектрометрии показано образование димеров из двух (dC)₁₀ вследствие формирования связи C-Ag⁺-C, не похожих по вторичной структуре на *i*-мотив. Описана картина возбужденных состояний систем, выяснено, что структура, образуемая основаниями ДНК, сказывается на ней, чем координационная связь цитозина с ионом серебра.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект No. 18-33-01233.

1. Brash D. E. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 10124–10128 (1991).
2. Schreier W. J. *et al.* J. Am. Chem. Soc. 131, 5038–5039 (2009).
3. Pollum M. *et al.* Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids I, 355, 245–327 (2014).
4. Fujii T. *et al.* J. Phys. Chem. B, 121, 34, 8058–8068 (2017).
5. Reveguk Z. *et al.* Scientific Reports 9(1) (2019).

Метод функциональной диффузионной магнитно-резонансной томографии в когнитивных исследованиях

Карташов С. И., Орлов В. А.

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

Авторами данной работы предложен метод исследования активации белого вещества головного мозга при решении простейших когнитивных задач, таких как моторная активация и зрительное восприятие [1]. Метод основан на динамическом измерении локального изменения коэффициента диффузии ликвора головного мозга в момент перебора пальцев правой руки и при наблюдении мигающей шахматной доски. Согласно существующей гипотезе, при передаче сигнала вдоль активного тракта, в связи с увеличением концентрации ионов калия в межклеточном пространстве, глиальные клетки увеличиваются в объеме, затрудняя таким образом локальную проходимость для ликвора [2]. Это означает, что меняется и коэффициент диффузии вдоль всего тракта. Таким образом, фактически может быть оценен процесс передачи сигнала от одной области головного мозга к другой по волокнам белого вещества. Это дает ряд преимуществ в понимании сетевого взаимодействия отделов головного мозга человека между собой как у здоровых людей, так и у пациентов со специфичными патологиями.

В рамках работы были реализованы следующие задачи:

1) Адаптирована «быстрая» МРТ-последовательность под многократное непрерывное измерение коэффициента диффузии ликвора в веществе головного мозга.

2) Оценена динамика поведения коэффициента диффузии в целевых и нецелевых вокселях при продолжительной одиночной зрительной и моторной стимуляции [3].

3) Исключены возможные паразитные эффекты BOLD и других гемодинамических изменений, путем проведения фМРТ и бесконтрастного перфузионного исследования. Дополнительно проведено ангиографическое исследование для исключения влияния крупных сосудов.

По результатам работы сделан вывод о перспективности использования функциональной трактографии в когнитивных исследованиях с учётом ограничений, связанных с временным разрешением данного метода.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 18-315-00304 мол_а.

1. Sergey Kartashov, Nikolay Ponomarenko and Vadim Ushakov. The Concept of Functional Tractography Method for Cognitive Brain Studies // BICA 2018, AISC 848, pp. 162–164, 2019.
2. Nitzan Tirosh and Uri Nevo. Neuronal activity significantly reduces water displacement: DWI of a vital rat spinal cord with no hemodynamic effect // Neuroimage 2013 Aug 16; 76:98-107. Epub 2013 Mar 16.
3. Sergey Kartashov, Vadim Ushakov, Vyacheslav Orlov. Dynamic Parameters of the Diffusion in Human Brain White Matter During Cognitive Tasks // BICA 2019, AISC 948, pp. 173–178, 2019.

Роль гидрофобных ворот в активации гидролиза ГТФ консервативным гистидином в факторе элонгации EF-G

Каюмов М. Ю., Кириллов С. В., Полесскова Е. В., Коневега А. Л.

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

kaiumov_my@pnpi.nrcki.ru

Синтез белка на рибосоме включает в себя инициацию трансляции, элонгацию, терминацию и рециркуляцию рибосомы. Данные циклические процессы регулируются с использованием энергии гидролиза ГТФ вспомогательными белковыми факторами, трансляционными ГТФазами. Было выявлено, что инвариантный гистидин трансляционных ГТФаз необходим для активации ГТФазной активности [1]. Данная работа касается вопроса о влиянии остатков, окружающих данный гистидин, на ГТФазную активность фактора EF-G.

Согласно литературе [2, 3] в структурах рибосомальных комплексов с элонгационными факторами EF-G и EF-Tu консервативный гистидин направлен на γ -фосфат ГТФ через так называемые гидрофобные ворота. В EF-Tu это остатки Val20 и Ile60, в EF-G это Ile18 и Ile60 (номенклатура *Escherichia coli*). Функция данных остатков в случае свободного фактора в растворе - препятствие позиционированию молекулы воды между консервативным гистидином и ГТФ, а в случае фактора в комплексе с рибосомой – приближение избыточных молекул растворителя к реакционному центру. Активационная перестройка, конформационное изменение ГТФазного домена I EF-Tu при связывании с рибосомой приводит к открытию гидрофобных ворот.

Структурные данные для фактора EF-G с ГТФ в свободном состоянии показали, что гидрофобные остатки Ile располагаются довольно далеко от гистидина. Поэтому возникает вопрос – как именно они препятствуют активации гидролиза ГТФ на факторе вне рибосомы? Возможным решением данного вопроса является то, что одного гистидина для активации гидролиза ГТФ недостаточно, так как связывание с рибосомой запускает процесс полной конформационной перестройки элонгационного фактора G, и без данных перестроек даже при достаточно близком расположении с ГТФ гистидин не способен правильно координировать молекулу воды для атаки на ГТФ.

1. Daviter T., Wieden H.-J., Rodnina M.V. (2003) Essential Role of Histidine 84 in Elongation Factor Tu for the Chemical Step of GTP Hydrolysis on the Ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 332(3), 689–699.
2. Koripella R.K., Holm M., Dourado D., Mandava C.S., Flores S., Sanyal S. (2015) A conserved histidine in switch-II of EF-G moderates release of inorganic phosphate. *Scientific Reports*, 5: 12970.
3. Voorhees R.M., Schmeing T.M., Kelley A.C., Ramakrishnan V. (2010) The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome. *Science* 330, 835–838.

**Изучение циклоспоринов С и D и их комплексов с мицеллами
методом ЯМР высокого разрешения:
получение данных о пространственной структуре**

Кобчикова П. П., Згадзай Ю. О., Ефимов С. В., Клочков В. В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

pollymoon@ya.ru

Целевой синтез биологически активных веществ, действующих селективно, уже давно интересует ученых. Многие лаборатории стремятся установить связь между структурой веществ и их биологическими свойствами. Если раньше обращали внимание только на химический состав вещества, то сейчас стало понятно, что молекулярная конфигурация вещества также важна. Впервые обосновал роль молекулярной конформации в химии и биологии Бартон [1], с тех пор не раз предпринимались попытки изучить связь между конформацией и биологической активностью [2].

Существует несколько вариантов циклоспоринов. Циклоспориновая цепь состоит из 11 аминокислотных остатков и замкнута в кольцо. Остаток Bmt (4-methyl-4-[(E)-2-butenyl]-4,N-methyl threonine) или его производные является уникальным признаком циклоспоринов, его обычно считают первым в цепи; D-Ala находится в позиции 8; остаток 2 является наиболее вариабельным среди всего семейства этих пептидов. Так, отличие CsD от CsA заключается в замене второго аминокислотного остатка на Val. В данной работе сравниваются циклоспорин D (CsD) и циклоспорин C (CsC) в растворе мицелл (ДФХ). Исследования проводились с помощью метода спектроскопии ядерного магнитного резонанса, в том числе методами, основанными на эффекте Оверхаузера. Этот эффект, известный как ЯЭО (ядерный эффект Оверхаузера), позволяет определять межпротонные расстояния между магнитными ядрами в диапазоне до 5 Å между ними [3].

Для каждого циклоспорина выполнено приписание сигналов по спектрам ЯМР высокого разрешения (COSY, TOCSY, HSQC). Для молекулы CsD получены некоторые расстояния между атомами. Дальнейший анализ спектров NOESY даст конкретные геометрические параметры для обоих циклоспоринов и позволит построить для них модельные структуры. Такой анализ позволит выявить изменения структуры, сопровождающие переход пептида в фосфолипидное окружение, а также позволит понять роль этих изменений с точки зрения биологической активности вещества.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-73-10088).

1. Barton D.H.R. The Principles of Conformational Analysis (Nobel lecture) / Chemistry. – Amsterdam: Elsevier. – 1972. – P. 298–311.
2. König H. Pharmaceutical Chemistry Today — Changes, Problems, and Opportunities / H. König // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 1980. – V. 19. – P. 749–761.
3. Blokhin D.S. NOE Effect of Sodium Dodecyl Sulfate in Monomeric and Micellar Systems by NMR Spectroscopy / D. Blokhin, E.A. Filippova, V.V. Klochkov // Applied Magnetic Resonance. – 2014. – V. 15. – P. 715–721.

Исследование ДНК-полимерных комплексов

Ковалева Т. В., Касьяненко Н. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

nictanya.kov@gmail.com

Интерполиэлектrolитные комплексы (комплексы полианионов с поликатионами или полиамфолитов с полиионами) занимают важное место среди полимерных систем, изучение физико-химических свойств которых привлекает внимание на протяжении многих лет. Это связано с многочисленными приложениями таких структур в различных технологиях. Сопряжение синтетических полимеров с биологическими макромолекулами представляет особый интерес. Такие структуры используются в молекулярной медицине, биотехнологических разработках, фармацевтике [1, 2].

Важное место занимают комплексы ДНК с поликатионами. Во-первых, такие структуры активно используются при создании невирусных генных векторов. Во-вторых, интерполиэлектrolитные комплексы этого класса могут быть использованы при создании многокомпонентных систем в тераностике (сочетание диагностики и терапии), а также в наноэлектронике и нанооптике [3].

Изучалось взаимодействие высокомолекулярной тимусной ДНК с синтетическим катионным полимером в растворе. Была отработана методика приготовления ДНК-полимерных комплексов с оптимальными размерами и минимальной полидисперсностью. Было проведено изучение спектральных свойств растворов, содержащих ДНК-полимерные комплексы. Показано, что формирование таких комплексов сопровождается увеличением рассеяния в системе. Также было показано, что увеличением концентрации полимера в растворе ДНК происходит значительное уменьшение приведенной вязкости, свидетельствующее о компактизации молекулы ДНК, а оценка оптической анизотропии формируемых частиц показала, что связывание полимера с ДНК не приводит к изменению оптической анизотропии макромолекулы. Также изучение температуры плавления ДНК показало, что присутствие полимера не оказывает существенного влияния на стабильность вторичной структуры ДНК. Проведена оценка распределения частиц по размерам с помощью метода динамического светорассеяния. Показано, что при $N/P > 0,4$ формируются дискретные частицы с гидродинамическим радиусом порядка 60–70 нм (узкое унимодальное распределение).

1. Cinnamon L. Hardee, Lirio Milenka Ar evalo-Soliz, Benjamin D. Hornstein and Lynn Zechiedrich, Advances in Nin-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. *Genes*. 2017, 8, 65.
2. Murali Ramamoorth, Aparna Narvekar, Non Viral Vectors in Gene Therapy – An Overview. *Clinical and Diagnostic Reserch*. 2015 Jan. Vol. 9(1): GE01-GE06.
3. Jordy Luten, Biodegradable cationic polymers as gene delivery carriers: from synthesis to *in vivo* application. Chapter 1: Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery (2007).

Разработка нового подхода конструирования лигандов белков с помощью модифицированного метода молекулярных фрагментов

Колчина Н. В.^{1, 2}, Якимов А. С.^{1, 2}, Петухов М. Г.^{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*

Разработка лекарств с помощью метода фрагментов (FBDD) является эффективной альтернативой использованию методов высокопроизводительного массового скрининга. Метод FBDD в отличие от традиционного скрининга покрывает большее химическое разнообразие лиганда, повышая селективность связывания лиганда и обеспечивая лучшую энергию его взаимодействия с рецептором [1–3]. Главной сложностью данного подхода является соединение фрагментов в кармане рецептора. Для достижения оптимального связывания фрагментов с помощью имеющихся неполных баз линкеров часто необходимо изменить их первоначальное положение, что отрицательно отражается на эффективности их связывания с рецептором [4]. Было показано, что на данный момент не удалось достичь сверхаддитивного связывания. Таким образом, представляет особую важность разработка алгоритма, который бы не изменял исходного положения каждого фрагмента при соединении их линкером [5].

В этой работе был разработан новый метод, соответствующее программное обеспечение в среде пакета программ ICM-Pro (Molsoft LLC, США) и база данных всех возможных линкеров, имеющих не более 10 атомов С, О и N для дизайна лигандов методом FBDD с выбором оптимальных входных и выходных атомов фрагментов в автоматическом режиме. Данный подход основан на анализе всех возможных конформаций растущей цепи линкера, состоящего из линейных насыщенных углеводородов, рассчитанных с помощью метода Эйринга.

Результаты теста показали, что из 10 пар фрагментов известных лигандов белков из банка данных PDBbind были верно установлены точки входа/выхода для 9 пар с помощью простейших линкеров. Точность построения линкера во всех случаях менее 1 Å, что на практике означает незначительные необходимые изменения оптимальных положений фрагментов лиганда в комплексе с белком - рецептором. Все это говорит о высоком потенциале практического использования разрабатываемого нами подхода для метода FBDD.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-015-00142.

1. K. Kawai, N. Nagata, Y.J. Takahashi, Chem. Inf. Model., Vol. 54, No. 1, 49–56 (2014).
2. A. Kumar, A. Voet, K.Y. Zhang, Curr. Med. Chem., Vol. 19, No. 30, 5128–5147 (2012).
3. M.J. Harner, A.O. Frank, S.W. Fesik, J. Biomol. NMR., Vol. 56, No. 2, 65–75 (2013).
4. A.W. Hung, H.L. Silvestre *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Vol. 48, No. 45, 8452–8456 (2009).
5. O. Ichihara, J. Barker *et al.*, Mol. Inform., Vol. 30, No. 4, 298–306 (2011).

C2C12 как модель скелетной мускулатуры при метаболическом синдроме

Комарова М. Ю.^{1, 2}, Игнатьева Е. В.¹, Хромова Н. В.¹, Дмитриева Р. И.¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

komarovamy96@yandex.ru

Введение. Многие кардиоваскулярные заболевания сопровождаются метаболическим синдромом, который характеризуется сменой основного источника энергии с жирных кислот на глюкозу в скелетной мускулатуре [1]. В мышечной ткани cAMP участвует в регуляции транспорта глюкозы, метаболизма углеводов и сокращения мышечных волокон [2]. Известно, что 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX) является активатором cAMP-зависимого пути [3]. Целью нашей работы является исследование влияния cAMP-зависимого сигнального пути на состав и энергетику мышечных волокон, полученных в ходе дифференцировки мышечных миобластов C2C12.

Материалы и методы. Миогенная дифференцировка культуры C2C12 проводилась двумя способами: по стандартному протоколу (DMEM/2% Horse Serum) и в присутствии IBMX (DMEM/10% FBS/0.5 mM IBMX). Для контроля динамики дифференцировки, морфологических и метаболических изменений в культуре были использованы такие методы, как Q-PCR, Western Blotting, иммуноцитохимия и Agilent Seahorse анализ. В качестве контрольных точек использовали нулевой, второй и четвертый дни после индукции миогенной дифференцировки.

Результаты и заключение. Оба способа дифференцировки клеток C2C12 приводили к формированию разных по фенотипу мышечных трубок. HorseSerum-индуцированные мышечные трубки были длинными и тонкими и преимущественно экспрессировали медленные изоформы миозинов (Myh7), в то время как под воздействием IBMX формировались короткие и толстые трубки, которые экспрессировали быстрые миозины (Myh1). Уровень экспрессии мРНК интегрин 7, отвечающего за миграцию миобластов и формирование миотрубок был снижен в IBMX-индуцированной культуре.

Сниженный уровень мРНК митохондриальных генов (Mfn1/2, Opa1, Fis1) коррелировал с энергетическим профилем, полученным с помощью Seahorse Mito Stress Test.

Таким образом, воздействие IBMX на клеточную линию C2C12 в ходе дифференцировки позволяет моделировать некоторые аспекты метаболических нарушений в скелетной мускулатуре пациентов с метаболическим синдромом.

1. Grundy S.M. Obesity, Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Volume 89, Issue 6, 1 June 2004.
2. Berdeaux R., Stewart R. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism. 2012 Jul 1; 303(1): E1–E17.
3. David M. Essayan. Journal of Allergy and Clinical Immunology. Volume 108, Issue 5, November 2001, P. 671–680.

Взаимосвязь продолжительности жизни и окислительного стресса при нейродегенерации в мозге особей *Drosophila melanogaster*

Комиссаров А. Е., Мелентьев П. А., Рябова Е. В., Саранцева С. В.

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

komissarov_ae@npi.nrcki.ru

Ген *swiss cheese* (*sws*) у *Drosophila melanogaster* является эволюционно-консервативным, его ортологи есть у разных организмов: от бактерий до млекопитающих [1]. У эукариот белок содержит домен сериновой эстеразы и участок, выполняющий функции неканонической регуляторной субъединицы протеинкиназы А. Дисфункция белка у разных организмов ведет к развитию нейродегенерации [2]. Также нами было показано, что при подавлении экспрессии *sws* у дрозофилы происходит уменьшение количества митохондрий в нейромышечных соединениях и аксонах, а также увеличивается уровень активных форм кислорода. АФК образуются при нарушении функций дыхательных цепей митохондрий, вследствие чего происходит утечка электронов и их перенос на атомы кислорода. Такие молекулы легко взаимодействуют с компонентами клетками, провоцируя каскад патологических реакций, приводящие к апоптозу клетки, что в свою очередь влияет на продолжительность жизни организма [3]. Это ведет к реакции, называемой окислительным стрессом.

Целью данной работы было показать взаимосвязь продолжительности жизни и уровня АФК при подавлении и гиперэкспрессии *sws* в нейронах и глиальных клетках мозга особей *Drosophila melanogaster*.

Для определения уровня активных форм кислорода был выбран распространенный зонд H2DCF-DA, флуоресцирующий при окислении. У линий с подавлением экспрессии в нейронах, в глии кортекса, в субпериневральной и периневральной глии, а также одновременно во всех типах глиальных клеток уровень АФК в мозге повышается с возрастом особей. Кроме того, подавление экспрессии гена *sws* в разных типах клеток нервной системы приводит к уменьшению продолжительности жизни.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00982.

1. Kremer M.C., Jung C., Batelli S., Rubin G.M., Gaul U. The glia of the adult *Drosophila* nervous system // *Glia*. – 2017 – V. 65 – P. 606–638.
2. Kretzschmar D. *Swiss cheese* et alii, some of the first neurodegenerative mutants isolated in *Drosophila* // *J. Neurogenet.* – 2009 – V. 23 – P. 34–41.
3. Болдырев А. А. Окислительный стресс и мозг // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – № 4. – С. 21–28.

Гендерзависимые возрастобусловленные изменения метилирования некоторых генов

*Кондакова Е. В., Лопатенко М. В., Вершинина О. С.,
Иванченко М. В., Ведунова М. В.*

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

Elen_kondakova@list.ru

На протяжении многих десятилетий остается актуальным вопрос о причинах различий в продолжительности жизни у мужчин и женщин [1, 2]. Кроме того, были охарактеризованы особенности манифестации и протекания целого ряда патологий, имеющих не гендерную специфику, но в то же время не являющихся гормонозависимыми [3]. В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение эпигенетической регуляции экспрессии различных генов в возрастном аспекте у обоих полов.

Анализ проводился в базах данных KEGG. Все возрастзависимые гендер-специфичные гены были разделены на три группы: гены, в которых показано изменение уровня метилирования с возрастом у обоих полов (322 гена), гены, с изменением уровня метилирования с возрастом только у мужчин (143 гена) и гены с изменением уровня метилирования только у женщин (401 ген).

Анализ первой группы генов по KEGG показал изменения в шести наиболее значимых ($p < 0,05$) метаболических каскадах, включающих гены, ответственные за морфогенез, возрастзависимые патологические процессы и гены, ассоциированные с работой нервной системы. Анализ биологических функций второй группы генов показал достоверные изменения только для генов, участвующих в кальциевом сигналинге. Анализ третьей группы генов выявил шесть важных метаболических каскадов, затрагивающих нейромедиаторы, кальциевый сигналинг, механизмы адгезии и синтез меланина.

Таким образом, было выявлено, что большая часть гендерзависимых возрастобусловленных изменений метилирования относится к генам, ответственным за развитие и функционирование нервной системы, как периферической, так и центральной. Кроме того, изменения, затрагивающие данные процессы идут за счет различных механизмов, что обеспечивает развитие гендерспецифичных реакций организма.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 074-02-2018-330 «Цифровая персонализированная медицина здорового старения (ЦПМ-старения): сетевой анализ больших мультиомных

данных для поиска новых диагностических, предсказательных и терапевтических целей».

1. Bacalini M.G. *et al.* A meta-analysis on age-associated changes in blood DNA methylation: results from an original analysis pipeline for Infinium 450k data. *Aging* 7, 97–109 (2015).
2. Davegardh C. *et al.* Sex influences DNA methylation and gene expression in human skeletal muscle myoblasts and myotubes. *Stem Cell Res Ther* 10, 26 (2019).
3. Hannum G. *et al.* Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol. Cell*, 49 (2), 359–367 (2013).

Реанализ публично доступных данных высокопроизводительного секвенирования для улучшения качества геномных сборок

Корженков А. А.

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

Korzhenkov_AA@nrcki.ru

Постоянно растущий объем данных высокопроизводительного секвенирования приводит к ситуации, когда их доскональная обработка занимает больше времени, чем получение новых данных, из-за чего возникает ситуация, когда в архивах содержатся прочтения, которые могут служить источником новых знаний о геномах организмов без проведения новых дорогостоящих исследований.

В ходе работы была проведена обработка 74 наборов данных секвенирования бактериальных культур, полученных из образцов морской воды с глубины 95 м и 250 м у побережья Гавайских островов. [1] Была проведена обрезка и фильтрация прочтений, удаление адаптерных последовательностей, слияние перекрывающихся парных прочтений и сборка генома аналогично ранее описанному протоколу [2]. Была проведена оценка количественных характеристик сборок, их полноты и контаминации (<https://github.com/Ecogenomics/CheckM/>). Большая часть новых сборок имела лучшие характеристики относительно исходных. Дополнительно, в ходе работы, были получены сборки геномов для образцов, изначально представленных исключительно прочтениями. Пересобранные геномы были кластеризованы при помощи полногеномного выравнивания [3] и прочтения, соответствующие наиболее близким геномам, были совместно использованы для сборки репрезентативных геномов, соответствующим данным кластерам.

Филогенетический анализ, основанный на конкатенированном выравнивании консервативных однокопийных генов (<https://github.com/laxeye/EPhlMM>), и оценка идентичности генов 16S рПНК позволили уточнить таксономическую принадлежность и предположить наличие бактериальных линий, соответствующих новым родам и видам.

Работа выполнена в рамках Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий № 075-15-2019-1659.

1. Sosa O.A. *et al.* (2017). Isolation and characterization of bacteria that degrade phosphonates in marine dissolved organic matter. *Frontiers in microbiology*, 8, 1786.
2. Zinina V.V. *et al.* (2019). Draft genome sequence data of *Bifidobacterium longum* strain VKPM Ac-1636, a prospective probiotic isolated from human gut. *Data in Brief*, 103847.
3. Korzhenkov A.A. *et al.* (2019). Aerobic Hydrocarbon-Degrading Gammaproteobacteria: Oleiphilaceae and Relatives. *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*, 153–166.

Облучение толстой мишени из оксида бария альфа-частицами с энергией до 63 МэВ

Кормазева Е. С., Алиев Р. А., Хоменко И. А.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

ekaterinakormazeva@gmail.com

Одной из тенденций современной ядерной медицины является поиск новых путей производства уже использующихся изотопов, а также способов наработки имеющих терапевтический и/или диагностический потенциал радионуклидов.

Так, одним из малоизученных путей получения различных изотопов лантана и церия является облучение изотопов бария альфа-частицами. Работы в этом направлении имеют фрагментарный характер: охвачен не весь диапазон энергий налетающих частиц, указаны не все возможные продукты ядерных реакций [1–4].

Было проведено облучение толстой мишени из оксида бария альфа-частицами с максимальной энергией 63 МэВ на циклотроне У-150. Облучение производилось при токе 1-1,2 мкА/ч в течение часа. Гамма-спектрометрические измерения продемонстрировали присутствие радиоактивных изотопов $^{133\text{m}}, ^{135\text{m}}\text{Ba}$, $^{132}, ^{133\text{m}}, ^{135}, ^{137\text{m}}, ^{139}\text{Ce}$, $^{132}, ^{135}, ^{140}\text{La}$ в облученном материале. Для каждого из радионуклидов были рассчитаны интегральные выходы. Из найденных изотопов ^{139}Ce может быть использован для радиотерапии, $^{137\text{m}}\text{Ce}$ – в диагностических целях [5], ^{135}La и ^{132}La – в качестве тераностической пары: для терапии и диагностики соответственно [6].

Возможно также присутствие изотопов ^{134}Ce и ^{134}La , которые уже зарекомендовали себя в качестве генераторной пары для ПЭТ и Оже-терапии соответственно [5].

Далее было опробовано радиохимическое разделение облученного материала с использованием смолы TRU. Удалось успешно отделить изотопы бария от смеси лантана и церия.

1. Swanson D.G., Porile N.T. Average Ranges, Cross Sections and Isomer Ratios for the $^{134}\text{Ba}(\alpha, n)^{137\text{m}, g}\text{Ce}$ Reaction. Lafayette, Indiana, 1969. 28 p.
2. Matsuo T. *et al.* Cross-section ratios of isomeric nuclides produced in medium-energy (α, xn) reactions // Phys. Rev. 1965. V. 139. No. 4B. P. 886–895.
3. Caretto A.A., Friedlander G. (p, pn) and (p, 2p) Reactions of Ce-142 at Proton Energies from 0.4 to 3.0 Bev // Phys. Rev. 1958. V. 110. No. 5. P. 1169–1173.

4. Halász Z. *et al.* Investigation of α -induced reactions on ^{130}Ba and ^{132}Ba and their importance for the synthesis of heavy p nuclei // *Phys. Rev. C – Nucl. Phys.* 2012. V. 85. No. 025804. P. 10.
5. Tárkányi F. *et al.* Activation cross-section data for alpha-particle induced nuclear reactions on natural ytterbium for some longer lived radioisotopes // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2017. V. 311. P. 1825–1829.
6. Abel E.P. *et al.* Half-lives of ^{132}La and ^{135}La // *Phys. Rev. C.* 2018. V. 97. P. 1–5.

**Оценка терапевтического эффекта
антисмысловых олигонуклеотидов, доставленных
пептидным носителем в культуру фибробластов пациента со СМА**

Крылова Н. В.¹, Маретина М. А.², Ильина А. В.¹, Егорова А. А.², Киселев А. В.²

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

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

Спинальная мышечная атрофия (СМА) – аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся дегенерацией мотонейронов передних рогов спинного мозга. Причиной развития СМА являются гомозиготные мутации гена *SMN1* в локусе 5q13 [1]. Данный ген имеет высоко гомологичную копию – ген *SMN2*, который является функционально неполноценным из-за нарушения сплайсинга пре-мРНК, вызванного точковой мутацией С→Т в энхансере сплайсинга. Это снижает вероятность включения 7 экзона в состав транскрипта гена *SMN2* [2]. Оба гена кодируют белок SMN, причем с транскрипта гена *SMN1* синтезируется полноразмерный белок, тогда как только 10 % танскриптов гена *SMN2* способны производить активный функциональный белок [3].

Белок SMN присутствует в цитоплазме и в ядре, где он локализован в структурах, известных под названием “gems” [4]. Было показано, что количество gems коррелирует со степенью тяжести заболевания.

На настоящий момент большой интерес вызывает поиск терапевтических агентов, способных увеличить количество функционального белка SMN путем коррекции сплайсинга гена *SMN2* на фоне мутаций гена *SMN1*.

Целью работы является оценка эффективности коррекции сплайсинга пре-мРНК гена *SMN2* с помощью антисмысловых олигонуклеотидов, доставленных пептидным носителем RGD1-R6.

В качестве **материала** для исследования использовались культуры фибробластов, полученные от здорового индивида и пациента со СМА; антисмысловые олигонуклеотиды, дополнительно модифицированные метильной и фосфотиоатной группами; аргинин-богатый носитель RGD1-R6, ранее разработанный в лаборатории.

Использовалась **методика** полуколичественной ПЦР с обратной транскрипцией. Количество белка оценивали на флуоресцентном микроскопе после мечения белка SMN с помощью антител.

В результате было выявлено, что количество полноразмерной мРНК гена *SMN2* и телец “gems” значительно увеличилось при доставке антисмысловых РНК-олигонуклеотидов пептидным носителем RGD1-R6 в культуру фибробластов СМА.

1. Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Benichou B., Cruaud C., Millasseau P., Zeviani M. *et al.* Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene // *Cell*. 1995. Vol. 80. P. 155–165.
2. Monani U.R., Lorson C.L., Parsons D.W., Prior T.W., Androphy E.J., Burghes A.H.M., & McPherson J.D. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2 // *Human Molecular Genetics*. 1999. Vol. 8. No. 7. P. 1177–1183.
3. Markowitz J.A., Singh P., Darras B.T. Spinal muscular atrophy: a clinical and research update.
4. Liu Q., Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein.

Синтез люминесцирующих серебряных кластеров методом травления наночастиц серебра с помощью цитозинсодержащих олигонуклеотидов

Кубенко В. Г., Ревезук З. В., Капитонова М. А., Кононов А. И.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

st063382@student.spbu.ru

Нуклеиновые кислоты являются удобной платформой для разработки широкого спектра сенсоров. Кластеры серебра (3 и более атомов) представляют собой молекулы с дискретными электронными состояниями. Их оптические свойства зависят от числа атомов серебра, степени их окисления и геометрической формы кластера [1]. Нуклеиновые основания координируют атомы серебра и сдерживают рост кластеров, а первичная и вторичная структура ДНК определяют конкретные места расположения кластеров. Нити ДНК выполняют одновременно несколько ролей – фиксируют кластеры серебра и связывают целевые аналиты: ионы металлов, пептиды и последовательности нуклеиновых кислот [2].

На текущий момент не сложилось единого мнения о механизме формирования люминесцирующих кластеров серебра на нуклеиновых кислотах. Типичный синтез заключается в восстановлении ионов серебра, предварительно связавшихся с матрицей, борогидридом натрия. Нами был опробован другой подход – этчинг наночастиц серебра [3].

Синтез сферических НЧ серебра проводили на ледяной бане путем восстановления ионов серебра борогидридом натрия [4]. Далее растворы наночастиц и олигонуклеотидов перемешивались в равных объемах и хранились при 37 °С. Измерения спектров поглощения и люминесценции проводились в течение месяца. Изменения в спектре поглощения наночастиц были зафиксированы уже на следующие сутки и наблюдались в течение всего времени эксперимента.

Для всех выбранных последовательностей ДНК наблюдались изменения в спектрах поглощения наночастиц: уменьшение и сдвиг плазмонного максимума поглощения в районе 400 нм. Таким образом, мы показали, что богатые цитозином олигонуклеотиды обладают способностью к травлению серебряных наночастиц. Определенные последовательности ДНК показали наличие люминесцирующей фракции кластеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 16-13-10090.

1. Volkov I. *et al.*, Nucleic Acids Research, Vol. 46, No. 7, 3543–3551 (2018).
2. Obliosca J.M., Biosensors, 3, 185–200 (2013).
3. Shengqiang Hu, Jianxiu Wang and Juewen Liu, JPC C, 123, 12015–12022 (2019).
4. Larmour I.A. *et al.*, J. of Raman Spectroscopy, 43(2):202–206 (2012).

Генетический анализ клинического случая шизофрении

Кувырченкова А. П.

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

Kuvyrchenkova_AP@rrcki.ru

Шизофрения – полиморфное психическое расстройство, с характерными расстройствами мышления и восприятия и нарушением когнитивных функций. Инвалидизация больных достигает 60 %, а неустойчивая трудовая адаптация отмечается у 90 % пациентов. Социально-экономическое бремя шизофрении в РФ составляет порядка 196,7 млрд. руб. в год, 90 % затрат приходится на лечение больных в стационарах [1].

На сегодняшний день отсутствует полное понимание этиологии и патогенеза шизофрении, однако общепринято мнение о ее мультифакториальной природе с вкладом, как генетических факторов, так и факторов внешней среды. Метаанализ двенадцати близнецовых исследований показал высокую наследуемость шизофрении [2]. На современном этапе этиотропная терапия расстройств шизофренического спектра не разработана, нет методов терапии, позволяющих излечить эти заболевания [3].

В ходе работы было проведено полногеномное секвенирование пациента с диагнозом параноидная шизофрения. Помимо этого он прошел фМРТ и иммунологические исследования. Наследственность пациента психопатологически отягощена по обеим линиям.

По результатам секвенирования были найдены новые мутации в генах метаболизма дофамина, которые могут являться причиной усиления негативной симптоматики при лечении пациента нейролептиками, так как механизм их действия основан на снижении передачи нервных импульсов в тех системах мозга, где передатчиком нервных импульсов является дофамин. Помимо этого был найден ряд мутаций в генах, регулирующих иммунный ответ, а так же в прочих генах, полиморфизмы которых могут быть связаны с риском шизофрении по данным метаанализов.

Отличительной особенностью этой работы является широкий спектр проведенных исследований пациента и большой объем информации о протекании его заболевания, наследственности и пр. Использование такого метода в будущем может привести к более индивидуальному подходу к лечению расстройств шизофренического спектра.

1. Gurovich I., Lyubov E. The economic burden of schizophrenia in Russia // *European Psychiatry*. – 2002. – V. 17. – P. 149.
2. Sullivan P.F., Kendler K.S., Neale M.C. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies // *Archives of general psychiatry*. – 2003. – V. 60. – No. 12. – P. 1187–1192.
3. McEvoy J.P. *et al.* Effectiveness of clozapine versus olanzapine, quetiapine, and risperidone in patients with chronic schizophrenia who did not respond to prior atypical antipsychotic treatment // *American Journal of Psychiatry*. – 2006. – V. 163. – No. 4. – P. 600–610.

**Исследование биосовместимости скаффолдов
на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты
и нейротрофических факторов BDNF, GDNF с клетками нервной системы**

Кузнецова А. И., Мищенко Т. А., Ведунова М. В.

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

Kuznetsova.A.I.15@yandex.ru

Проблема структурной и функциональной реконструкции ткани головного мозга после перенесенной черепно-мозговой травмы представляет актуальную задачу для современной биологии и медицины. Перспективным подходом считается разработка трехмерных конструкторов (скаффолдов), направленных на поддержание необходимой анатомической структуры в зоне поражения для обеспечения свободного транспорта биологических жидкостей и постепенного его замещения естественной нервной тканью [1–3].

Цель исследования – оценить биосовместимость и биоактивные свойства скаффолдов на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты с включением биологически активных молекул (нейротрофических факторов BDNF, GDNF) на клеточной модели головного мозга *in vitro*.

Скаффолды были изготовлены методом экструзионной 3D печати. Показано, что полученные образцы не токсичны для клеток нервной системы. На 14 день культивирования первичных нейрональных культур со скаффолдами количество жизнеспособных клеток не отличалось от значений интактной группы (интактные: 91.81 ± 0.97 %, скаффолд+BDNF: 91.67 ± 1.08 %; скаффолд+GDNF: 88.69 ± 1.2 %). С помощью методики кальциевого имиджинга установлены выраженные изменения длительности и частоты кальциевых осцилляций в группе «скаффолд+GDNF» (длительность: интактные: 8.33 ± 0.51 с, «скаффолд+GDNF»: 6.34 ± 0.14 с, частота: интактные: 0.90 ± 0.05 осц./мин, «скаффолд+GDNF»: 3.06 ± 0.3 осц./мин). В группе «скаффолд+BDNF» зафиксировано снижение длительности кальциевых осцилляций (6.98 ± 0.05 с) при сохранении частоты кальциевых событий (1.03 ± 0.05 осц./мин). С помощью программы ImageJ установлены изменения длины отростков нервных клеток в экспериментальных группах относительно интактных показателей в первые 7 суток культивирования.

Таким образом, скаффолды на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты обладают высокой биосовместимостью с клетками нервной системы. Присутствие нейротрофических факторов модулировало спонтанную кальциевую активность первичных нейрональных культур. Продемонстрирована возможность создания градиента концентрации

нейротрофических факторов для обеспечения направленного роста отростков нейронов в условиях *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект № 18-315-20003), а также гранта Президента РФ (МК-1485.2019.4).

1. Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Kuznetsova A.I. et al. Features of Primary Hippocampal Cultures Formation on Scaffolds Based on Hyaluronic Acid Glycidyl Methacrylate // CTM. 2018. V. 10. No. 1. P. 103–110.
2. Dalmedico M.M., Meier M.J. et al. Hyaluronic acid covers in burn treatment: a systematic review. Revista da Escola de Enfermagem da USP. 2016. V. 50. No. 3. P. 519–524.
3. Perez-Garnes M., Barcia J.A., Gomez-Pinedo U. et al. Materials for Central Nervous System Tissue Engineering // Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine. 2014. Chapter 7.

Уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови при синуклеинопатиях

Кулабухова Д. Г.^{1, 2}, Николаев М. А.^{1, 2}, Сенкевич К. А.^{1, 2}, Безрукова А. И.¹,
Верлов Н. А.¹, Варфоломеева Е. Ю.¹, Штам Т. А.¹, Усенко Т. С.^{1, 2},
Емельянов А. К.^{1, 2}, Шварцман А. Л.¹, 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

Введение. Синуклеинопатии (болезнь Паркинсона (БП), мультисистемная атрофия (МСА), деменция с тельцами Леви (ДТЛ)) представляют собой группу заболеваний, патогенез которых связан с накоплением и агрегацией белка альфа-синуклеина в клетках головного мозга. Обсуждаются прионные свойства альфа-синуклеина [1]. Предполагается, что экзосомы (микровезикулы размером 40–100 нм) могут играть ключевую роль в транспорте патогенных форм данного белка [2, 3].

Целью настоящего исследования являлась оценка уровня альфа-синуклеина экзосом плазмы крови пациентов с БП (спорадическая форма (сБП), болезнь Паркинсона, ассоциированная с мутациями в генах GBA и LRRK2 (GBA-БП и LRRK2-БП), и болезнь Паркинсона с деменцией (БПД)), МСА, ДТЛ и в контрольной группе.

Материалы и методы. В исследование включили 46 пациентов с установленным диагнозом БП, включая 15 пациентов с БПД, 8 пациентов с GBA-БП, 5 пациентов с LRRK2-БП и 18 пациентов с сБП; 14 пациентов с ДТЛ и 11 пациентов с МСА. Экстраклеточные микровезикулы выделены из 200 мкл плазмы периферической крови с использованием набора ExoPrep (HansaBioMed, Эстония). Экзосомы охарактеризованы с использованием метода анализа траекторий наночастиц (NTA анализ), цитометрически с использованием поверхностного маркера экзосом CD81. Уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови оценен методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Результаты. В группе пациентов с МСА выявлена повышенная концентрация альфа-синуклеина в лизатах экзосом плазмы крови по сравнению с группой пациентов с сБП, а также с полной группой БП (включая сБП, GBA-БП, LRRK2-БП и БПД) (783,96 (230,46-852,68) пг/мл; 445,34 (92,96-826,03) пг/мл; 313,01 (170,86-671,44); 568,38 (412,39-657,07); 339,13 (138,26-833,04); $p=0,014$ и $p=0,004$ соответственно). Не выявлено различий в концентрации альфа-синуклеина экзосом плазмы крови среди исследуемых групп в сравнении с группой пациентов с ДТЛ ($p>0,05$).

Выводы. Полученные нами данные позволяют предполагать, что альфа-синуклеин экзосом плазмы крови может быть дифференциальным маркером МСА от других синуклеинопатий.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-315-90059 Аспиранты.

1. Шварцман А. Л., Сенкевич К. А., Емельянов А. К., Пчелина С. Н. Прионные свойства альфа-синуклеина. Молекулярная Биология, 2019; 53(3):380–387;
2. Danzer K.M., Krebs S.K., Wolff M., Birk G., Hengerer B. Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. J. Neurochem, 2009; 111(1):192–203;
3. Stuenkel A., Kunadt M., Kruse N. et al. Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Brain, 2016; 139:481–494.

Влияние двухвалентных ионов металлов на структурную организацию модельных биологических мембран

Куракин С. А.^{1, 2}, Ермакова Е. В.², Душанов Э. Б.³, Холмуродов Х. Т.^{2, 4},
Угрикова Д.⁵, Кучерка Н.^{2, 5}

¹ *Институт физики Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, Россия*

² *Лаборатория нейтронной физики им. И. М. Франка, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия*

³ *Лаборатория радиационной биологии, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия*

⁴ *Государственный университет «Дубна», Дубна, Россия*

⁵ *Университет им. Я. А. Коменского в Братиславе, фармацевтический факультет, Братислава, Словакия*

К настоящему времени известно, что ионы, находящиеся в цитозоле и межклеточном пространстве, способны связываться с липидами в мембране и изменять толщину бислоя, затрагивая при этом и другие его параметры, такие как текучесть, электростатические взаимодействия молекул в мембране, а также влиять на конформацию, а следовательно, на функции интегральных белков [1, 2]. При этом механизмы влияния двухвалентных ионов металлов на структурные параметры липидных бислоев на атомном уровне до конца не выяснены даже для простых модельных систем [3].

В данной работе были проведены исследования модельных биологических мембран методом малоуглового рассеяния нейтронов. В качестве липидов были выбраны цвиттер-ионные фосфолипиды 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) как пример насыщенного липида, и 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ) в качестве ненасыщенного липида, обогащенные в отдельности ионами кальция и магния. Экспериментальные результаты выявили различные структурные изменения в бислое, вызванные как влиянием самих ионов, так и насыщенностью липида. Было установлено, что с увеличением концентрации ионов кальция толщина бислоя везикул ДОФХ уменьшается, в то время как для ДПФХ зависимости демонстрируют как монотонное набухание в случае связывания липидов с ионами магния, так и выраженный максимум для кальция, обнаруженный в работе [3]. Такое поведение тесно связано с разными ионными радиусами, гидратной оболочкой ионов и наличием двойной связи в гидрофобных хвостах липидов [4].

Проведенные исследования компьютерного моделирования методом молекулярной динамики дополняют результаты экспериментов. Рассчитанные радиальные функции распределения пар ион-липид и ион-Н₂О выявляют локализацию ионов кальция и магния в бислое, преимущественные места и

силу их связывания с головной группой липида, а также объясняют специфику гидратации этих ионов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-72-20186 и в рамках тематического плана ОИЯИ 04-4-1121-2015/2020.

1. Kučerka N., Uhríková D. Biophysical perspectives of lipid membranes through the optics of neutron and X-ray scattering. In M.-P. Nieh, F.A. Heberle, J. Katsaras (Eds.), Characterization of Biological Membranes: Structure and Dynamics, Berlin, Boston: De Gruyter, 2019, 1–42.
2. Uhríková D., Kučerka N., Lengyel A., Pullmannová P., Teixeira J., Murugova T., Funari S. S., Balgavý P. Lipid bilayer – DNA interaction mediated by divalent metal cations: SANS and SAXD study. Journal of Physics: Conference Series, 2012, 351, 1–9.
3. Uhríková D., Kučerka N., Teixeira J., Gordeliy V., Balgavý P. Structural changes in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer promoted by Ca^{2+} ions: a small-angle neutron scattering study. Chemistry and Physics of Lipids, 2008, 155, 80–89.
4. Kučerka N., Dushanov E., Kholmurodov K.T., Katsaras J., Uhríková D. Calcium and zinc differentially affect the structure of lipid membranes. Langmuir, 2017, 33, 3134–3141.

Взаимодействие поли(ADP-рибоза)полимераза1 и поли(ADP-рибоза)полимераза2 с нуклеосомой в ходе эксцизионной репарации оснований

Кутузов М. М.^{1, 2}, Белоусова Е. А.¹, Лаврик О. И.^{1, 2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Геном живых организмов находится под постоянным воздействием генотоксических агентов эндогенного и экзогенного происхождения. За исправление, образующихся в результате такого воздействия повреждений ответственны системы репарации ДНК [1].

Наиболее распространенная категория повреждений, не вызывающих значительных искажений структуры двойной спирали ДНК, исправляется в результате работы системы эксцизионной репарации оснований (BER) [1, 2]. К настоящему времени основные стадии этой системы хорошо охарактеризованы, однако детали регуляции остаются предметом пристального внимания исследователей [2, 3].

Компактизация ДНК дополнительно осложняет функционирование систем репарации [4]. Для успешного исправления повреждений ДНК в ходе BER требуется регуляция не только стадий самой системы репарации, но также регуляция степени компактизации ДНК [5].

Поли(ADP-рибоза)полимераза1 (PARP1) и поли(ADP-рибоза)полимераза2 (PARP2) – одни из ключевых регуляторов системы BER, которые также принимают участие в регуляции ремоделлинга хроматина [2, 5, 6].

В нашей работе мы изучили влияние белков PARP на активность основных ферментов системы BER, таких как APE1 и ДНК полимераза β с использованием как свободных ДНК, так и реконструированных модельных нуклеосом. Мы обнаружили ингибиторный эффект PARP1 и PARP2 на активность как APE1, так и активность ДНК полимеразы β . Наблюдаемый эффект ослабляется в условиях (ADP-рибозил)ирования.

Полученные результаты находятся в соответствии с актуальной моделью регуляции взаимодействия PARP1 и PARP2 с ДНК. В частности, в условиях (ADP-рибозил)ирования происходит автополи(ADP-рибозил)ирование белков PARP. Такая ковалентная модификация приводит к диссоциации комплекса PARP-ДНК или PARP-нуклеосома в силу электростатического отталкивания полимера ADP-рибозы и ДНК.

Работа выполнена при поддержке ПФНИ ГАН на 2017–2020 гг. (VI.57.1.2, 0309-2016-0001) и РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-70028.

1. Chatterjee N., Walker G.C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 58:235–263.
2. Wallace S.S. (2014) Base excision repair: A critical player in many games.
3. Kim Y.-J., M. Wilson III D (2011) Overview of Base Excision Repair Biochemistry. *Curr Mol Pharmacol* 5:3–13.
4. Balliano A.J., Hayes J.J. (2015) Base excision repair in chromatin: Insights from reconstituted systems. *DNA Repair* 36:77–85.
5. Hauer M.H., Gasser S.M. (2017) Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair. *Genes Dev* 31:2204–2221.
6. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Schreiber V. *et al.* [The role of PARP2 in DNA repair]. *Mol Biol (Mosk)* 48:561–572.

Изучение роли факторов сборки и ремоделирования хроматина в регуляции дозовой компенсации у дрозофилы

Кучинская Я. А., Боровых Е. С., Некрасова М. А., Конев А. Ю.

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

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, CHD1, дозовая компенсация, X-хромосома, политенные хромосомы, хроматин

Для изучения процессов регуляции генов на уровне отдельных хромосом нами используется модель дозовой компенсации *Drosophila melanogaster*, включающая в себя генетические и эпигенетические механизмы регуляции. Данный процесс уже интересен из-за присущих фундаментальных черт и благодаря происходящему при этом специфическому нацеливанию белковых комплексов на определенные сайты. У дрозофилы основную роль играет комплекс дозовой компенсации (MSL: male-specific lethal), включающий в себя структурные белки (MSL1-MSL3), цепи некодирующей РНК (roX1 и roX2), ацетилтрансферазу MOF и PHCK геликазу MLE [1].

Для нас интересен, прежде всего, консервативный хроматин-ремоделирующий фактор CHD1, чьи функции связаны с активной транскрипцией. Мутации гена *Chd1* ведут к деформации и деконденсации X-хромосомы самцов [2]. Нами показано, что в норме данный фактор активно привлекается к сайтам связывания комплекса MSL на X-хромосоме, необходимым условием чего является функционирующий комплекс MSL. У самцов нуль-мутантов *Chd1* весь соответствующий белок материнского происхождения связывается с X-хромосомой [3].

На данный момент изучается ряд факторов ремоделирования: представитель того же семейства факторов, что и CHD1 – kismet, и близкий по функциям к CHD1 белок ISWI, а также представители двух других семейств – Ipo80 и brahma. Известно, что картина изменений X-хромосомы самцов у мутантов по гену *Iswi* схожа с таковой *Chd1*, но полученные результаты иммуноокрашивания политенных хромосом антителами к ISWI показали отсутствие специфического привлечения у самцов дикого типа к X-хромосоме, нет и дополнительных сайтов связывания. У нуль-мутантных по гену *Chd1* самцов этот фактор также не показал какого-либо специфического привлечения к половой хромосоме. Такой же эксперимент проведен для brahma, kismet и Ipo80. Все они не привлекались специфически к X-хромосоме самцов дикого типа или *Chd1* мутантов, что свидетельствуют о специфической роли фактора CHD1 в подвергающейся ДК X-хромосоме самцов дрозофилы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ гранта 20-04-00864 А).

1. Conrad T. and Akhtar A. Dosage compensation in *Drosophila melanogaster*: epigenetic fine-tuning of chromosome-wide transcription // *Nat Rev Genet.* – 2012. – V. 13. – No. 2. – P. 123–134.
2. Конев А. Ю., Тютюнник А. А., Барановская И. Л. Влияние мутации гена Chd1, кодирующего фактор сборки и ремоделирования хроматина, на организацию поличенных хромосом дрозофилы // *Цитология.* – 2016. – Т. 58. – № 4. – С. 281-4.
3. Tiutiunnik A., Baranovskaya I., Kuchinskaya Y., Gnennaya Y., Shalaev A., Konev A. The role of the chromatin remodeling factor CHD1 in the global organization of *Drosophila* chromosomes // *Biopolymers & Cell.* – 2019 – V. 35 – No. 3. – P. 174–175.

Уровень ДНК-метилтрансферазы 1 (DNMT1) и степень метилирования интрона 1 гена SNCA при болезни Паркинсона

Лавринова А. О.¹, Милюхина И. В.^{1,2,4}, Тимофеева А. А.², Литусова Е. М.¹,
Гагарина П. А.¹, Беркович О. А.², Пчелина С. Н.¹⁻⁴, Емельянов А. К.¹⁻³

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 Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический
университет РАН, Санкт-Петербург, Россия

lavrinova_ao@pnpi.nrcki.ru

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга, обусловленной агрегацией в них белка альфа-синуклеина. Показано, что степень метилирования интрона 1 гена SNCA может влиять на его экспрессию [1, 2]. ДНК-метилтрансфераза 1-го типа (DNMT1) поддерживает паттерн метилирования в клетке. Показано снижение уровня DNMT1 в клетках мозга пациентов с БП по сравнению с контролем [3]. В связи с этим, целью исследования являлась оценка степени метилирования интрона 1 гена SNCA и уровня белка DNMT1 в CD45+ клетках при БП.

Для оценки степени метилирования интрона 1 гена SNCA в исследование было включено 50 пациентов с БП и 65 лиц контрольной группы. CD45+ клетки были выделены из периферической крови в градиенте плотности раствора фиколла (Биолот, Россия) и дальнейшей магнитной сепарации (MACS (Miltenyi Biotec, США)). Геномная ДНК была подвержена бисульфитной конверсии с применением набора EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research, США). Секвенирование осуществлено с использованием набора MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500-cycles) (Illumina, США) на приборе MiSeq (Illumina, США).

Для оценки уровня белка DNMT1 в исследование было включено 43 пациента с БП и 47 индивидуумов контрольной группы. Измерение уровня DNMT1 в лизатах CD45+ клеток указанных групп проводилось методом ИФА (DNMT1 Assay Kit (Epigentek, США)). Статистические расчеты были проведены в программе SPSS 21.0.

Не выявлено статистически значимых различий при сравнении степени метилирования интрона 1 гена SNCA в CD45+ клетках пациентов с БП и контроля ($p = 0,217$). Впервые было обнаружено снижение уровня белка DNMT1 в CD45+ клетках пациентов с БП при сравнении ее с контролем ($p < 0,001$).

Полученные данные позволяют предположить, что потенциальным маркером развития БП может являться уровень DNMT1 в CD45+ клетках периферической крови. В то же время, отсутствует ассоциация БП с изменением степени метилирования интрона 1 гена *SNCA*.

1. Jowaed A., Schmitt I., Kaut O., Wullner U. Methylation regulates alpha synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains // *The Journal of Neuroscience*. – 2010. – 30 (18). – P. 6355–6359.
2. Tan Y., Wu L., Zhao Z. *et al.* Methylation of α -synuclein and leucine-rich repeat kinase 2 in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients // *Parkinsonism and Related Disorders*. – 2014. – 20. – P. 308–313.
3. Desplats P., Spencer B., Coffee E. *et al.* Alpha-synuclein sequesters Dnmt1 from the nucleus: a novel mechanism for epigenetic alterations in Lewy body diseases // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – 286 (11). – P. 9031–9037.

Комплексы противоопухолевых олигонуклеотидов с терапевтическими интеркаляторами

Легатова В. А.¹, Самойленкова Н. С.^{2, 6}, Новосельцева А. А.^{1, 6},
Завьялова Е. Г.^{1, 6}, Рябова А. В.³, Копылов А. М.^{1, 6}, Павлова Г. В.^{2, 5, 6}

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

² Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

³ Институт общей физики РАН, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

⁵ Первый Московский государственный медицинский университет
им. И. М. Сеченова Минздрава РФ, Москва, Россия

⁶ ООО «АПТО-ФАРМ», Москва, Россия

В последние годы широко исследуются олигонуклеотиды как терапевтические агенты. Некоторые из них потенциально интересны для лечения мультиформной глиобластомы [1]. В работе исследованы антипролиферативные G-квадруплексы и аптамеры к рецептору эпидермального фактора роста глиобластом, EGFR. Были синтезированы конъюгаты с пиреном, способным увеличивать сродство аптамеров к EGFR [2, 3], и доксорубицином, традиционным химиотерапевтическим препаратом [4]. Были собраны нековалентные комплексы олигонуклеотидов с доксорубицином и фотосенсибилизаторами на основе порфирина, способными повреждать клетки при облучении [5].

Для изучения интеркаляции ароматических полициклических соединений в олигонуклеотиды исследовали изменение флуоресценции и оптической плотности. Нековалентные комплексы охарактеризованы пределами насыщаемости $0,5 < r < 10$ (где $r = n(\text{олигонуклеотида})/n(\text{интеркалятора})$) и кажущимися константами диссоциации уровня 0,1–2 мкМ титрованием интеркаляторов. Для конъюгатов отмечена зависимость эффективности интеркаляции от сайта модификации олигонуклеотида. Охарактеризована стабильность всех комплексов температурной зависимостью спектров кругового дихроизма.

Для модифицированных аптамеров к EGFR были определены наномолярные константы диссоциации с помощью интерферометрии биоконплексов. С помощью конфокальной микроскопии показано селективное узнавание EGFR⁺-клеток (первичная культура глиобластомы) и локализация олигонуклеотидов. Аналогичные эксперименты с G-квадруплексами продемонстрировали иную локализацию в клетках, при этом результаты для EGFR⁺- и EGFR⁻-клеток одинаковы. В МТТ-тестах уровень пролиферации клеток глиобластомы снижался на 15–30 % в случае G-квадруплексов и 50–

100 % в случае их комплексов с доксорубицином. Наблюдалось значительное снижение миграционной активности клеток глиобластомы.

Проведенные эксперименты позволяют оценить терапевтический потенциал таких комплексов как высокий.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 18-29-01047мк.

1. Hays E.M., Duan W., Shigdar S. Aptamers and glioblastoma: their potential use for imaging and therapeutic applications // International Journal of Molecular Sciences. 2017. V. 18. Iss. 12. P. E2576. Doi:10.3390/ijms18122576
2. Qing Z., He X., Huang J., Wang K., Zou Z., Qing T., Mao Z., Shi H. and He D. Target-catalyzed dynamic assembly-based pyrene excimer switching for enzyme-free nucleic acid amplified detection // Analytical Chemistry. 2014. V. 86. P. 4934–4939.
3. Zavyalova E., Turashev A., Novoseltseva A., Legatova V., Antipova O., Savchenko E., Balk S., Golovin A., Pavlova G., Kopylov A. Pyrene modified DNA aptamers with high affinity to wild type EGFR and EGFRvIII // Nucleic Acid Therapeutics. 2019. [In Press]
4. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy // Journal of Cancer Research and Therapeutics. 2014. V. 10. P. 853–858.
5. Malina L., Tomankova K.B., Malohlava J., Jiravova J., Manisova B., Zapletalova J. and Kolarova H. The *in vitro* cytotoxicity of metal-complexes of porphyrin sensitizer intended for photodynamic therapy // Toxicology in Vitro. 2016. V. 34. P. 246–256.

Оценка влияния предполагаемого Zeta-токсина стрептококков группы В на рост *Escherichia coli*

Линник Д. С.^{1, 2}, Кулешевич Е. В.¹, Суворов А. Н.^{1, 3}

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

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

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

Введение. Системы токсин-антитоксин (ТА) впервые были обнаружены на F плазмиде *E. coli*, и вероятной функцией этих систем была стабилизация мобильных генетических элементов [1]. Дальнейшие исследования показали, что ТА системы также могут быть локализованы в хромосомной ДНК бактерий. ТА системы рассматриваются как перспективные мишени для создания антибактериальных препаратов [2]. В состав ТА системы Epsilon-Zeta, гены которой локализованы на острове патогенности PAI-A стрептококков группы В (СГВ), входит Zeta токсин, который временно ингибирует рост *E. coli* [3]. В полногеномной последовательности штамма NEM316 СГВ был обнаружен гомологичный ген gbs1932, кодирующий предполагаемый Zeta токсин, обозначенный далее Zeta_{New}. Целью данной работы является проверка токсичности белка Zeta_{New} на модели *E. coli*.

Материалы и методы. Клонирование гена gbs1932 в экспрессионный вектор pQE-32 было осуществлено методом кальциевой трансформации. Построение кривых роста проводилось как описано ранее [3]. В качестве контроля использовался штамм *E. coli* M15 содержащий вектор pQE-32 (M15_pqe32). Очистка белка осуществлялась методом металл-аффинной хроматографии на Ni-сефарозе.

Результаты и заключение. Был получен штамм *E. coli* M15, содержащий вектор pQE-32 со вставкой гена gbs1932, обозначенный M15_zetanew. Правильность рамки считывания исследуемого гена была подтверждена секвенированием. Кривые роста для штамма M15_zetanew в присутствии и отсутствии ИПТГ статистически неотличимы от кривых роста для контрольного штамма M15_pqe32. Присутствие Zeta_{New} в клетках *E. coli* не приводило к эффектам, которые наблюдаются при индукции экспрессии гена Zeta токсина ТА системы Epsilon-Zeta СГВ [3].

Наличие белка Zeta_{New} в клетках подтвердили его очисткой и визуализацией с помощью SDS-PAAG. Масса очищенного белка совпала с теоретически рассчитанной. Таким образом, белок, кодируемый геном gbs1932 СГВ, не проявляет токсические свойства по отношению к гетерологичной грамотрицательной бактериальной системе.

1. Ki-Young Lee and Bong-Jin Lee. Structure, Biology, and Therapeutic Application of Toxin–Antitoxin Systems in Pathogenic Bacteria // *Toxins*. – 2016. – V. 3. – No. 305.
2. А. А. Прозоров, В. Н. Даниленко. Системы «токсин – антитоксин» у бактерий: инструмент апоптоза или модуляторы метаболизма? (обзор) // *Микробиология*. – 2010. – Т. 79. № 2. – С. 147–159.
3. Е. В. Кулешевич, Д. С. Линник, В. А. Шевченко, А. Н. Суворов. Zeta токсин системы токсин-антитоксин, гены которой локализованы на острове патогенности PAI-A СГВ // *Проблемы медицинской микологии*. – 2018. – Т. 20. № 2. – С. 85.

**Расшифровка механизма действия нового потенциального ингибитора
бактериальной трансляции, выделенного из штамма
*Actinoplanes sp.49252***

Лисевич И. М.¹, Лукьянов Д. А.¹, Остерман И. А.^{1, 2},
Сергеев П. В.^{1, 2}, Донцова О. А.^{1, 2}

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Ira.Lisevich@skoltech.ru

Бактериальные инфекции – одна из наиболее трудно решаемых проблем для медицины из-за стремительно развивающейся устойчивости патогенов к ранее используемым антибиотикам [1]. В эру постоянно возникающих супербагов ускорение поиска новых антибиотиков имеет особую практическую значимость. Методом высокопроизводительного скрининга нам удалось обнаружить антибактериальную активность культуральной жидкости *Actinoplanes sp.49252* и ее способность вызывать застревание рибосомы. Этот эффект детектировали при помощи штамма-репортера, сконструированного в нашей лаборатории [2]. Такая система позволяет разделять образцы на три группы: индукторы застревания рибосомы, индукторы SOS-ответа и не индуцирующие репортер, что сообщает о возможных мишенях тестируемых веществ. После выделения и очистки активного компонента из *Actinoplanes sp.49252*, названного для краткости 49252, мы подтвердили его способность ингибировать трансляцию в *in vitro* и *in vivo* системах с выраженным концентрационно-зависимым эффектом. Проведя тоу-принтинг на разных мРНК матрицах с целью определить блокируемую стадию трансляции, мы обнаружили лишь незначительное усиление некоторых естественных рибосомных стопов в присутствии 49252. Полногеномный анализ независимо отобранных устойчивых мутантов в штаммах *E. coli* SQ110, *BWΔtolC* позволил выявить две группы мутаций: 1) в 566 петле 16S рРНК 2) в рибосомальном белке S4. Несмотря на то, что мутации первой группы не описаны в литературе, этот консервативный регион находится в тесном контакте с нуклеотидом G299 16S рРНК [3], замена которого (G299A) приводит к так называемому *ribosomal ambiguity* (*ram*) фенотипу [4], проявляющемуся в снижении точности декодирования. Мутации из второй группы обнаружены исторически первыми в ревертантах устойчивых к стрептомицину мутантов, также обладающих *ram* фенотипом [4, 5]. Таким образом, мутации устойчивости к 49252 вероятно превращают рибосомы в менее точные, тогда как сам антибиотик может

вызывать гиперточность при декодировании, что, однако, лишь гипотеза, которую надлежит экспериментально подтвердить или опровергнуть.

Работа поддержана грантом РФФ 18-44-04005 (Остерман И. А.).

1. Ventola, C. Lee. "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats" *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* vol. 40,4 (2015): 277-83.
2. Osterman, Ilya A. *et al.* "Sorting Out Antibiotics' Mechanisms of Action: a Double Fluorescent Protein Reporter for High-Throughput Screening of Ribosome and DNA Biosynthesis Inhibitors" *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 60,12 7481–7489. 21 Nov. 2016, doi:10.1128/AAC.02117-16
3. Fagan C.E., Dunkle J.A., Maehigashi T. *et al.* Reorganization of an intersubunit bridge induced by disparate 16S ribosomal ambiguity mutations mimics an EF-Tu-bound state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(24):9716–9721. doi:10.1073/pnas.1301585110
4. Gorini L. (1974) Streptomycin and misreading of the genetic code. *Ribosomes*, eds. Nomura M., Tissieres A., Lengyel P. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), pp. 791–803.
5. Agarwal D., Kamath D., Gregory S.T., O'Connor M. 2015. Modulation of decoding fidelity by ribosomal proteins S4 and S5. *J Bacteriol* 197:1017–1025. doi:10.1128/JB.02485-14

**Маркеры нейровоспаления и апоптоза
в эпилептических очагах височной доли головного мозга
у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией**

Литовченко А. В.^{1, 2}, Забродская Ю. М.³, Бажанова Е. Д.^{1, 2}

¹ *Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия*

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

³ *Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А. Л. Поленова, Санкт-Петербург, Россия*

anastasiya_litovchenkos@list.ru

Введение. Среди множества теорий эпилептогенеза на данный момент наибольший интерес вызывает воспалительная теория. Доказано наличие нейровоспаления при многих нейродегенеративных состояниях. Нейровоспаление может быть одной из причин развития резистентности к противоэпилептическим препаратам (ПЭП) у пациентов с височной формой эпилепсии [1]. Причиной этому может быть нейротоксический эффект цитокинов, продуцируемых иммунокомпетентными клетками ЦНС [2], на AMPA- и NMDA-рецепторы глутамата, в то время как действие современных противоэпилептических препаратов основано на усилении ГАМК-ергической нейротрансмиссии и уменьшение действия возбуждающих аминокислот.

Цель данной работы - выявление маркеров нейровоспаления и апоптоза в коре и белом веществе височной доли головного мозга у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией.

Методы. Для проведения исследования были взяты образцы височной коры и белого вещества, прилежащего к эпилептическому очагу, из биоптатов височной доли, полученные от 7 пациентов с фармакорезистентной эпилепсией. В качестве группы сравнения использовались образцы тканей коры и белого вещества височной доли 6 пациентов без эпилепсии. Проводилась оценка содержания в образцах проапоптотического белка p53, транскрипционного фактора STAT1 и провоспалительных медиаторов NF-κB и FAS [3]. Исследование проводилось методом Western blotting с последующим анализом изображений с помощью денситометрии (ImageJ).

Результаты. В исследуемом материале был выявлен значительный рост уровня проапоптотического белка p53 и транскрипционного фактора STAT1 на фоне группы сравнения, что свидетельствует об экспрессии генов, участвующих в иммунном ответе и апоптозе. Высокий уровень содержания белка FAS, активирующего внешний путь апоптоза, и NF-κB, опосредующего провоспалительный сигнальный каскад, в коре и белом веществе височной

доли пациентов с фармакорезистентной эпилепсией свидетельствует о наличии воспалительного процесса в нервной ткани.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ гранта 20-015-00127 А).

1. An inflammation-centric view of neurological disease: beyond the neuron / Skaper S.D., Facci L., Zusso M. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2018. – No. 12. – P. 72.
2. Биомаркеры нейровоспаления / А. К. Пискунов // *Нейрохимия*. – 2010. – Т. 27. – № 1. – С. 63–73.
3. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs / Olson J.K., Miller S.D. // *The Journal of Immunology*. – 2004. – No. 173. – P. 3916–3924.

Интеграция ДНК с золотыми и палладиевыми наночастицами

Лиходеева М. Н., Касьяненко Н. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

maria.likhodeeva@gmail.com

Наночастицы благородных металлов, в частности золота и серебра, активно используются в биомедицинских целях [1] благодаря уникальным физико-химическим свойствам, которые обусловлены высоким отношением площади поверхности частиц к их объему. Кроме того, у металлических наночастиц наблюдается локализованный поверхностный плазмонный резонанс, что позволяет использовать их в качестве своего рода «наноантенн» для усиления комбинационного рассеяния. Работ, посвященных исследованию свойств и анализу применения золотых и серебряных наночастиц множество, при этом наночастицы палладия не настолько популярны, хотя представляют не меньший интерес. Их комплексы с ДНК могут использоваться в иммуноферментном анализе и в качестве сенсоров для детекции водорода [2, 3].

В зависимости от способа синтеза наночастицы могут обладать различными свойствами, поэтому подбор восстановителей, стабилизирующих веществ и условий для получения биосовместимых наночастиц является актуальной задачей. Один из популярных способов синтеза — использование молекулы ДНК как шаблона. Получаемые таким образом наноматериалы привлекают внимание широким спектром применения, однако механизм металлизации ДНК до сих пор неясен [4].

В данной работе предложен способ восстановления наночастиц золота и палладия на молекуле ДНК с использованием боргидрида натрия в присутствии поверхностно-активного вещества или с использованием синтетического сополимера. Проведена оценка размеров и формы восстанавливаемых на молекуле ДНК наночастиц золота и палладия методами ДРС и АСМ.

1. Azharuddin M., Zhu G.H., Das D., Ozgur E., Uzun L., Turner A.P., Patra H.K. A repertoire of biomedical applications of noble metal nanoparticles. *Chem. Commun.* **2019**, 55, 6964.
2. Zhou F., Yao Y., Luo J., Zhang X., Zhang Y., Yin D., Wang P. Proximity hybridization-regulated catalytic DNA hairpin assembly for electrochemical immunoassay based on in situ DNA template-synthesized Pd nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2017**, 969, 8–17.
3. Li N., Tittl A., Yue S., Giessen H., Song Ch., Ding B., Liu N. DNA-assembled bimetallic plasmonic nanosensors. *Light Sci. Appl.* **2014**, 3, e226.
4. Chen Zh., Liu C., Cao F., Ren J., Qu X. DNA metallization: principles, methods, structures, and applications. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47, 4017.

Исследование роли внутриклеточных киназ в адаптации нервных клеток к действию глюкозной депривации

*Логинова М. М.¹, Ярков Р. С.¹, Мищенко Т. А.^{1, 2},
Ведунова М. В.¹, Митрошина Е. В.^{1, 2}*

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

² *Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия*

Кином клетки представляет собой совокупность ферментов-киназ, входящих в сигнальные каскады, регулирующие жизнеспособность и функциональную активность клеток нервной системы [1, 2]. В последние годы киназы рассматриваются в качестве перспективных молекулярных мишеней для разработки методов повышения устойчивости клетки к действию различных стресс-факторов [3]. В настоящее время описано более ста киназ, однако роль многих представителей кинома в адаптации нервных клеток к повреждающим воздействиям еще не изучена.

На первом этапе исследования было изучено влияние блокады киназ DYRK1A, PAK4, RET, MAP3K5, AKT1, AKT2, JNK3, eEF2K, IKKb, JAK2, входящих в различные сигнальные каскады (Ras/MAPK, PI3K/Akt, MEK/ERK, JAK/STAT и др. пути) на жизнеспособность нервных клеток в норме и при моделировании глюкозной депривации. Объектом исследования явились первичные культуры коры больших полушарий. Глюкозную депривацию моделировали на 14 день развития культур. Показано, что блокада киназ DYRK1A, PAK4, RET снижает жизнеспособность нервных клеток как в норме, так и при глюкозной депривации. Ингибирование киназ eEF2K и IKKb в условиях глюкозной депривации вызывает достоверное увеличение жизнеспособности первичных культур.

На втором этапе работы было проанализировано влияние блокады наиболее значимых выявленных киназ (PAK4, MAP3K5, eEF2K, IKKb) на функциональную кальциевую активность первичных культур клеток гиппокампа. Ингибирование PAK4 в 20 раз снижало количество клеток, проявляющих функциональную кальциевую активность ($2,79 \pm 1,49$ %). Блокада MAP3K5 киназы не влияла на показатели кальциевой активности в нормальных условиях, но достоверно снижала показатели после моделирования глюкозной депривации ($33,68 \pm 11,5$ %). Ингибирование киназ IKKb и eEF2K достоверно повышало жизнеспособность клеток после глюкозной депривации, но нейропротективного влияния на функциональные показатели кальциевой активности не выявлено. Процент работающих клеток при блокаде IKKb составил – $21,54 \pm 4,58$ %, а eEF2K – $18,41 \pm 2,55$ %.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ (гранты № 18-015-00391, 18-315-20003) и гранта Президента РФ МК-1485.2019.4.

1. Radak D., Katsiki N., Resanovic I., Jovanovic A., Sudar-Milovanovic E., Zafirovic S., Mousad S.A., Isenovic E.R. (2017) Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke, Curr. Vasc. Pharmacol, 15, 115–122.
2. Kameshima S., Okada M., Yamawaki H. (2019) Eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) kinase/eEF2 plays protective roles against glucose deprivation-induced cell death in H9c2 cardiomyoblasts, Apoptosis, 24, 359–368.
3. Mulero M.C., Huxford T., Ghosh G. (2019) NF- κ B, I κ B, and IKK: Integral Components of Immune System Signaling, Adv. Exp. Med. Biol., 1172, 207–226.

Высокоспецифичное взаимодействие мономерного белка S100P с интерфероном бета

*Казаков А. С.¹, Майоров С. А.¹, Дерюшева Е. И.¹, Авхачева Н. В.¹,
Денесюк К. А.^{2,3}, Денесюк А. И.^{1,2}, Растрьгина В. А.¹,
Пермяков Е. А.¹, Пермяков С. Е.¹*

¹ *Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Пущино, Московская область, Россия*

² *Университет г. Турку, лаборатория структурной биоинформатики, факультет науки и техники, Турку, Финляндия*

³ *Университет г. Турку, лаборатория фармацевтических наук, факультет науки и техники, Турку, Финляндия*

Белки S100 – семейство свыше 20 кальцийсвязывающих белков позвоночных суперсемейства «EF-руки», регулирующих различные внутри- и внеклеточные процессы и ассоциированных с развитием множества заболеваний. Некоторые белки S100 служат внеклеточными сигналами повреждений благодаря взаимодействию с отдельными рецепторными белками [1]. Хотя несколько представителей семейства S100 связывают специфические цитокины, распространенность этого явления и его функциональная роль остаются недостаточно изученными [2]. Используя методы химического сшивания, спектроскопии собственной белковой флуоресценции и поверхностного плазмонного резонанса, мы обнаружили, что онкобелок S100P взаимодействует с интерфероном бета (IFN- β) конформационно-зависимым образом. Димерная форма Ca^{2+} -связанного S100P взаимодействует с IFN- β с равновесными константами диссоциации, K_d , в диапазоне величин 50-600 нМ. Мономеризация белка S100P усиливает это взаимодействие, снижая величины K_d до 0,3-2 нМ. Отрыв ионов кальция резко снижает сродство S100P к IFN- β . Другие изученные белки семейства «EF-руки» (кальмодулин, α -парвальбумин и S100G) не связывают IFN- β , что подтверждает селективность взаимодействия между S100P и IFN- β . Тест с кристаллическим фиолетовым показывает, что связывание S100P подавляет цитотоксичность IFN- β в отношении клеток рака молочной железы MCF-7. Поскольку некоторые виды рака (молочной железы, толстой кишки, легкого, печени, и пр.) демонстрируют нарушение функционирования S100P и IFN- β , их взаимодействие может быть связано с развитием онкозаболеваний и разработкой направленных терапевтических воздействий [3].

Исследование поддержано грантом РНФ № 19-14-00289.

1. Donato R. *et al.* Functions of S100 proteins // Current molecular medicine. – 2013. – V. 13. – No. 1. – P. 24–57.
2. Kazakov A.S. *et al.* High-affinity interaction between interleukin-11 and S100P protein // Biochemical and biophysical research communications. – 2015. – V. 468. – No. 4. – P. 733–738.
3. Cancemi P. *et al.* A multiomics analysis of S100 protein family in breast cancer // Oncotarget. – 2018. – V. 9. – No. 49. – P. 29064.

Отсроченные эффекты введения субсептических доз ЛПС крысам

Майстренко В. А., Шолохова Д. О., Карпенко М. Н.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Воспаление, развивающееся в ответ на бактериальное инфицирование, может служить этиологическим фактором болезни Паркинсона [1, 4]. Однако до сих пор не выявлены условия, при которых периферическое воспаление инициирует деструкцию дофаминергических нейронов мозга, и не изучены возможные молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе развития этой формы патологии. Действительно, экспериментальный паркинсонизм у лабораторных грызунов можно инициировать с помощью интрацеребральной, внутривенной или интраперитонеальной инъекции пирогенных доз бактериального липополисахарида (ЛПС) [2, 3]. Однако на сегодняшний день еще не установлено, является ли ЛПС непосредственным индуктором дегенерации дофаминергических нейронов или его действие опосредовано. Целью данной работы было выявление нейробиологических и нейрохимических механизмов дегенеративных изменений в ЦНС при экспериментальной эндотоксинеми.

Ход эксперимента. Самцов крыс Вистар разделяли по 5 на 2 группы: 1 группа – интраперитонеальное (и/п) введение физ. р-р; 2 группа – и/п ЛПС, 1 мг/кг животного. Через 6 месяцев после начала эксперимента у животных из каждой группы брали стриатум. Из части материала выделяли тотальную мРНК, проводили реакцию ОТ-ПЦР в реальном времени с оригинальными праймерами к ИЛ-1 β , ФНО- α , iNOS, Iba-1. Данные нормировали на уровень мРНК β -актина, GAPDH и 18S. Из другой части материала 0,1 М хлорной кислотой экстрагировали моноамины и проводили их количественный анализ с помощью ОФ-ВЭЖХ с электрохимическим детектором.

Результаты и выводы. В клетках стриатума в ответ на введение септической дозы ЛПС наблюдается увеличение уровня мРНК основных провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 β в 0,5 раз и TNF- α в 2 раза, iNOS и Iba1 в 10 раз по сравнению с контролем. Введение ЛПС приводит к снижению уровня дофамина в стриатуме в 1,5 раза по сравнению с контролем. При этом скорость катаболизма дофамина не изменяется, что свидетельствует о дегенерации дофаминергических нейронов.

1. Т. Н. Сергеева, В. Г. Сергеев. Аутоиммунные механизмы паркинсоноподобных нарушений у крыс. Вестник Удмуртского университета. 2011, № 1, стр. 81–87.
2. Blandini F., Armentero M.T. Animal models of Parkinson's disease. FEBS J. 2012 Apr; 279 (7): 11 56–66.
3. Castaño A., Herrera A.J., Cano J., Machado A. Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. J. Neurochem. 1998 Apr; 70 (4): 15 84–92.
4. Paola Heman Bozadas, Rasajna Nadella, Aurora del Carmen Sánchez-García, Daniel de Jesús Rembao Bojórquez, María de Jesús Rovirosa Hernández, Daniel Hernandez Baltazar. Lipopolysaccharide-based endotoxemia produce toxicity in peripheral organs and microglia migration in a dose-dependent manner in rat substantia nigra. Folia Neuropathol 2019; 57 (3): 258–266.

Изучение свойств амилоидных фибрилл различных прионовенных белков дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в системе *in vitro*

Максютенко Е. М.^{1, 3}, Землянко О. М.^{1, 2}, Бондарев С. А.^{1, 2}, Барбитов Ю. А.¹,
Матвеевко А. Г.¹, Журавлева Г. А.^{1, 2}

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

² Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, Россия

jmrose@yandex.ru

Прионы – это инфекционные агенты белковой природы, вызывающие неизлечимые заболевания человека и животных [1]. Один из наиболее известных прионов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – фактор $[PSI^+]$ – изоформа белка Sup35, фактора терминации трансляции [2]. Было показано, что одиночная аминокислотная замена Т341D в неприоновенном домене влияет на прионные свойства Sup35 и приводит к гибели клетки в присутствии $[PSI^+]$ [3]. Такой эффект аминокислотных замен вне прионовенного домена Sup35 может быть связан как с несовместимостью измененного белка со структурой мономеров в амилоидной фибрилле, так и появлением или потерей сайта связывания с молекулярными шаперонами, способствующим поддержанию приона.

Для выяснения возможного механизма влияния миссенс-мутаций, затрагивающих С-конец Sup35, на прионизацию, а также для изучения взаимодействия молекулярных шаперонов с фибриллами различных белков, была разработана схема выделения, очистки и получения агрегатов мутантных вариантов Sup35, а также Rnq1. Мы показали способность белков Sup35wt, Sup35-228 и Rnq1 формировать агрегаты *in vitro*, сравнили скорость их агрегации и морфологию амилоидных фибрилл при помощи ТЭМ. Были обнаружены и охарактеризованы единичные фибриллы для белка Sup35 и олигомеры для Sup35-228, Sup35-10. Фибриллы Sup35 и Sup35-228 характеризовались сходными амилоидными свойствами, однако различались по эффективности связывания красителя Тиофлавина Т. Также мы доработали и применили методику количественной оценки размера фибрилл с помощью SDD-AGE при помощи маркера молекулярного веса ДНК.

Полученные результаты позволят подробно изучить особенности структуры амилоидных фибрилл разных белков и их взаимодействия с системой шаперонов, что имеет важное значение для понимания специфики распространения и поддержания различных прионов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-00537, гранта РНФ 18-14-00050 и ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

1. Prusiner S.B. // J. Science, 216, P. 136–144 (1982).
2. Bondarev S.A., Zhouravleva G.A., Belousov M.V, Kajava A.V. // J. Prion, 9, P. 190–199 (2015).
3. Kabani M., Cosnier B., Bousset L., Rousset J., Melki R., Fabret C. // J. Molecular Microbiology, 81, P. 640–658 (2011).

Влияние сукцинатдегидрогеназы на активность кальпаиновой системы

Маршак А. З.^{1, 2}, Пестерева Н. С.²

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

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Сукцинатдегидрогеназа – это белковый комплекс, расположенный на внутренней мембране митохондрий. Ингибирование сукцинатдегидрогеназы приводит к нарушению в работе дыхательной цепи переноса электронов, что приводит к возникновению окислительного стресса [4]. В литературе показано что окислительный стресс приводит к гиперактивации кальпаиновой системы. Это система кальций-зависимых внутриклеточных протеаз, участвующих во множестве клеточных процессов [2]. При некоторых патологических процессах, в частности при нейродегенеративных заболеваниях, кальпаиновая система гиперактивируется, что приводит к апоптозу [3].

Для ингибирования сукцинатдегидрогеназы в данном исследовании была использована 3-нитропропионовая кислота (3-НПК). 3-НПК это митохондриальный токсин, снижающий активность сукцинатдегидрогеназы, путем блокирования «кармана» для связывания сукцината [1].

Цель: исследовать изменение активности кальпаиновой системы при сниженной активности сукцинатдегидрогеназы.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на самцах линии Wistar. Первая группа получала внутрибрюшинно инъекции 3-НПК в дозе 20 мг/кг веса животного в день на протяжении 5-ти дней (n=5); вторая группа (n=5) – инъекции физиологического раствора в таком же объеме и по той же схеме. На восьмой день после первой инъекции животные подвергались декапитации, из мозга извлекались стриатум, гиппокамп и фрагмент четырехглавой мышцы бедра. В выделенных структурах при помощи метода казеиновой зимографии и иммуноблоттинга была исследована активность и содержание в тканях 1 и 2 кальпаина.

Результаты. В клетках стриатума активность кальпаинов по сравнению с контролем увеличена не была. В клетках гиппокампа детектировалась повышенная активность обеих изоформ кальпаина. А в клетках четырехглавой мышцы бедра активность 1 кальпаина была увеличена только у одного животного. Методом иммуноблоттинга было показано увеличения количества кальпаинов в тканях стриатума.

1. Francis K. *et al.* "The biochemistry of the metabolic poison propionate 3-nitronate and its conjugate acid, 3 nitropropionate". 2013.
2. Goll D.E. *et al.* "The calpain system". *Physiol Rev.*, 2003.
3. Imajoh S. *et al.* "Molecular cloning of the cDNA for the large subunit of the high-Ca²⁺-requiring form of human Ca²⁺-activated neutral protease". *Biochemistry* 27: 8122–8128, 1988.
4. Joderi Farshbaf M. *et al.* "Succinate dehydrogenase: Prospect for neurodegenerative diseases". *Mitochondrion* 77–83, 2018.

Токсичность транскрипционного фактора Sfp1 не связана с его способностью к агрегации в клетках дрожжей

Матвеевко А. Г.*, Зайцева Н. А., Журавлева Г. А.

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

* a.matveenko@sbpu.ru, studentmag01@gmail.com

Транскрипционный фактор дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, Sfp1, является глобальным регулятором генов биогенеза рибосом и рибосомных белков, который активирует их транскрипцию при росте клеток в оптимальных условиях [1]. Кроме того, белок Sfp1 содержит два глутамин- и аспарагин-богатых участка (QN) и является потенциально прионогенным белком [2]. Ранее мы показали, что Sfp1 способен формировать цитоплазматические агрегаты в клетках дрожжей и усиливать токсичность приона [*PSI*⁺] [3]. Мы провели делеционный анализ гена *SFP1*, который показал, что для агрегации Sfp1 необходимо наличие участка, расположенного между двумя QN-богатыми участками. При этом делеция N-терминального QN-богатого района (ΔI) несколько ослабляет токсичность, в то время, как делеция другого QN-богатого домена (ΔII) приводит к значительному ее усилению. Токсичность варианта Sfp1 ΔII была заметна даже в отсутствие приона [*PSI*⁺].

При экспрессии гена *SFP1* под контролем сильных промоторов ранее мы наблюдали парадоксально низкий уровень продуцируемого белка. При этом такая сверхэкспрессия приводила к сильному снижению жизнеспособности. Мы проверили как влияет отсутствие QN-богатых регионов на токсичность *SFP1* при его сильной сверхэкспрессии под контролем промоторов *GPD(TDH3)*, *ADH1* и *GAL1*. Во всех исследованных случаях Sfp1 редко формировал агрегаты, однако мы наблюдали аналогичную картину токсичности: она была снижена при экспрессии *SFP1 ΔI* , но усиливалась при экспрессии *SFP1 ΔII* . Делеция N-терминального фрагмента белка, включающего оба QN-богатых района и участок, необходимый для агрегации, приводила к отсутствию токсичности и увеличенной продукции белка.

Таким образом, токсичность при различных условиях сверхэкспрессии *SFP1*, по-видимому, обусловлена одним и тем же механизмом, который напрямую не связан ни с количеством продуцируемого белка, ни с его агрегацией.

Работа поддержана грантами РФФИ 18-34-00536 и РНФ 18-14-00050, а также ресурсным центром «РМукТ» НП СПбГУ.

1. Marion R.M., Regev A., Segal E., Barash Y., Koller D., Friedman N., & O'Shea E.K. (2004). Sfp1 is a stress-and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(40), 14315–14322.
2. Alberti S., Halfmann R., King O., Kapila A., & Lindquist S. (2009). A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell*, 137(1), 146–158.
3. Matveenko A.G., Drozdova P.B., Belousov M.V., Moskalenko S.E., Bondarev S.A., Barbitoff Y.A., ... & Zhouravleva G.A. (2016). SFP1-mediated prion-dependent lethality is caused by increased Sup35 aggregation and alleviated by Sis1. *Genes to Cells*, 21(12), 1290–1308.

Функциональное состояние организма при наследственной нейродегенерации

Мелентьев П. А., Рябова Е. В., Шарапенков Э. Г., Саранцева С. В.

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

Нервная ткань участвует в интеграции систем организма, регулирует его функциональное состояние как составляющая часть нейроэндокринной системы, а также участвует в контроле поведения как адаптивной реакции на изменяющиеся условия окружающей среды. Генетическая детерминация процессов жизнедеятельности и функционирования клеток нервной ткани стала изучаться в 60-е годы прошлого века на одном из популярных модельных объектов генетики – дрозофиле, – имеющей сложно устроенную нервную систему, состоящую из разных типов клеток, функционально подобных таковым млекопитающим, что с антропоцентрической точки зрения определило роль экспериментальных изысканий на дрозофиле и в наши дни: аспекты нейродегенеративных заболеваний человека исследуют при помощи дрозофилы [1]. Дегенерация нервной ткани способна приводить к нарушениям функций организма, которые могут влиять на метаболизм, поведение, продолжительность жизни. Среди механизмов таких патологических процессов: нарушение гомеостаза кальция, расстройство метаболизма белков, увеличение выработки активных форм кислорода. Сходные процессы наблюдаются при старении, поэтому важно понять, в каких случаях старение приведет к возраст-зависимой нейродегенерации [2]. Для этого необходимо комплексное изучение функций организма у моделей, где развитие нейродегенерации генетически детерминировано.

В данной работе проанализированы показатели, позволяющие судить о функциональном состоянии организма при нейродегенерации, вызванной дисфункцией гена *swiss cheese*, ортологи которого у млекопитающих ассоциированы с нейродегенеративными фенотипами [3].

Проект поддержан грантом РФФИ № 19-34-51044.

1. McGurk L., Berson A., Bonini N.M. *Drosophila* as an *in vivo* model for human neurodegenerative disease. *Genetics*. 2015 Oct 1; 201(2):377–402.
2. Pluvinaud J.V., Wyss-Coray T. Systemic factors as mediators of brain homeostasis, ageing and neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*. 2020 Jan 8:1-0.
3. Kretschmar D., Sunderhaus E.R., Law A.D. Disease-associated PNPLA6 mutations maintain partial functions when analyzed in *Drosophila*. *Frontiers in neuroscience*. 2019; 13:1207.

**Гибридный олигомерный белок РаеНFQ – A β _{1–40}:
выделение, характеристика и изучение самоорганизации**

Миранда Чикурова Н. К.^{1, 2}, Гарбузинский С. А.¹, Михайлина А. О.¹,
Рябова Н. А.¹, Ильина Н. Б.¹, Балобанов В. А.¹

¹ Институт белка РАН, Пущино, Россия

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

mirandank@mail.ru

Объектами исследования в данной работе являются гибридный белок РаеНFQ – A β _{1–40} и две его мутантные формы. РНК-связывающий бактериальный белок НFQ из *Pseudomonas aeruginosa* (РаеНFQ) принадлежит к семейству SM-подобных белков (LSm), образует пончиковидные гомогексамеры и примечателен своей термостабильностью [2]. A β _{1–40} (бета-амилоидный пептид 1–40) образует амилоидные фибриллы, ассоциированные с болезнью Альцгеймера [1, 3].

Нами были созданы генетические конструкции для получения гибридных белков РаеНFQ с A β -пептидами дикого типа и его мутантными формами 3Pro и 4Pro в клетках *E. coli* BL21(DE3). Белки выделяли методами аффинной хроматографии в денатурирующих условиях. Далее, по двум специально разработанным схемам, основанным на значительной разнице в стабильности структур РаеНFQ и A β _{1–40}, белки подвергались ступенчатой ренатурации. Первая ступень – сворачивание РаеНFQ, вторая – образование амилоидоподобных структур A β _{1–40}.

Полученные белки на каждой ступени мы охарактеризовали методами КД-спектроскопии и динамического рассеивания света. За образованием амилоидоподобных структур следили по флуоресценции специфического красителя – тиюфлавина Т.

Полученные гибридные белки после сворачивания РаеНFQ частично структурированы, не содержат крупных агрегатов и имеют размер, ожидаемый для гибридного гомогексомера. Было обнаружено, что при рН ниже 9.5 гибридный белок РаеНFQ – A β WT образует амилоидоподобные структуры. Этот процесс имеет две последовательные стадии. Показано, что скорость образования амилоидоподобных структур зависит от концентрации мочевины и рН, но не зависит от концентрации белка. Примечательно так же, что получаемые структуры не являются фибриллярными. Гибридные белки РаеНFQ – A β 3Pro и РаеНFQ – A β 4Pro, чьи мутантные пептиды не образуют амилоидов, также были исследованы. Эти гибридные белки образуют гомогексамеры, но не образуют амилоидоподобных структур.

1. Lu J.X. *et al.* Molecular structure of β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue // *Cell*. – 2013. – V. 154. – No. 6. – P. 1257–1268.
2. Nikulin A. *et al.* Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2005. – V. 61. – No. 2. – P. 141–146.
3. Terzi E., Hölzemann G., Seelig J. Self-association of β -amyloid peptide (1–40) in solution and binding to lipid membranes // *Journal of molecular biology*. – 1995. – V. 252. – No. 5. – P. 633–642.

Моделирование протекания жидкости сквозь пустотное пространство матриксов

Михуткин А. А.¹, Васильев А. Л.^{1, 2}

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

² *Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография
и фотоника» РАН, Москва, Россия*

Матриксы природного или синтетического происхождения [1] активно используются в медицине как для непосредственной имплантации для выполнения каркасной функции в образовании новой ткани в организме, так и для создания биоискусственных клеточных конструкций в биореакторах. С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) возможно восстановить трехмерную структуру матриксов с определением их морфологических особенностей (размеры волокон и пор и т. п.) [2]. Применение матриксов в биореакторах диктует новые требования к их микроструктуре и морфологии для обеспечения эффективного протока культуральной жидкости. Моделирование протекания жидкости сквозь исследуемый материал позволяет ответить на ряд важных вопросов, связанных с созданием оптимальных условий роста клеток и микроорганизмов в биореакторах. Параметры полей скоростей и давлений и проницаемости получены анализом трехмерных моделей матриксов, изготовленных из различных биосовместимых полимерных материалов. Использовались два подхода: первый - экспериментальное моделирование, основанное на решении уравнений Стокса, где анализируемый объем материала герметично ограничивается плоскостями твердой фазы (с условием отсутствия скольжения) по граням объема, не перпендикулярным направлению основного потока, что позволяет изолировать образец от окружающей среды, не позволяя потоку выйти из системы. С применением закона Дарси численно оценена абсолютная проницаемость материалов. Во втором подходе решается тензорная проблема путем наложения периодических граничных условий так, как если бы образец представлял собой макроскопический, бесконечный материал (более репрезентативно для реальной пористой среды). Вычислялась эффективная проницаемость (тензор проницаемости), которая позволяет определить зависимость интенсивности проницаемости от направления потока. Полученные данные могут быть использованы для разработки микроструктурных параметров матрикса и характеристик потоков культуральной среды в биореакторах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 17-13-01376.

1. Yang S. *et al.* Tissue Engineering. 7, 679 (2001).
2. Mikhutkin A.A. *et al.* BioNanoScience. 8, 511 (2018).
3. Михуткин А. А. и др. Известия РАН. Серия физическая. 83, 1497 (2019).

Измерение сечения реакций $^{151}\text{Eu} (^3\text{He}, xn)$: новые возможности для производства тераностических радионуклидов $^{149, 152}\text{Tb}$

Моисеева А. Н., Алиев Р. А., Загрядский В. А.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

Moiseeva_AN@nrcki.ru

Для лечения раковых опухолей широко распространена идея использования тераностических радионуклидных пар. Это может улучшить целевую точность доставки терапевтического компонента в пораженные клетки. Одной из перспективных радионуклидных пар, которые можно использовать как для диагностики, так и для терапии, является пара тербий-149 / тербий-152, где ^{149}Tb является альфа-излучателем, а также распадается с выделением позитронов и оже-электронов, поэтому его можно использовать в терапии. Тербий-152, как излучатель позитронов, является многообещающим кандидатом для использования в ПЭТ-визуализации [1].

В настоящее время существуют определенные трудности с получением этих радиоизотопов. Недавно был предложен способ получения ^{149}Tb облучением обогащенного оксида европия-151 частицами He-3 [2] и разработана методика очистки изотопов тербия от облученной мишени из европия [3].

В данной работе была проведена серия экспериментов по облучению металлических европиевых мишеней пучком частиц ^3He на циклотроне в НИЦ «Курчатовский институт». Определены сечения реакции для $^{151}\text{Eu} (^3\text{He}; xn)$ $^{154-x}\text{Tb}$ и рассчитаны интегральные выходы этих продуктов на металлической мишени, обогащенной ^{151}Eu , в диапазоне энергий частиц ^3He от 10 до 70 МэВ.

Рассчитанные значения характеризуют возможность получения $^{149, 152}\text{Tb}$ описанным способом, однако, помимо изученных изотопов тербия, пригодных для медицины, образуются изотопы тербия-150, 151, 153 и 154. Тем не менее они имеют относительно короткие периоды полураспада и/или испускают конверсионные и оже-электроны, которые также могут использоваться в целевой лучевой терапии или могут быть удалены путем массового разделения.

1. Müller C., Vermeulen C., Johnston K., Köster U., Schmid R., Türler A., van der Meulen N.P. Preclinical *in vivo* application of ^{152}Tb -DOTANOC: a radiolanthanide for PET imaging. *EJNMMI Res.* **6** (2016).
2. Zagryadskii V.A., Latushkin S.T., Malamut T.Y., Novikov V.I., Ogloblin A.A., Unezhev V.N., Chuvilin D.Y. Measurement of Terbium Isotopes Yield in Irradiation of ^{151}Eu Targets by ^3He Nuclei. *At. Energy.* **123**, 55 (2017).
3. Kazakov A.G., Aliev R.A., Bodrov A.Y., Priselkova A.B., Kalmykov S.N.: Separation of

radioisotopes of terbium from a europium target irradiated by 27 MeV α -particles. Radiochim. Acta. **106**, 135 (2018).

3D-реконструкция травматических повреждений головного мозга

Новожилова М. О., Мищенко Т. А., Ведунова М. В.

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

masananov@yandex.ru

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является актуальной проблемой здравоохранения. Травма головного мозга или хирургия головного мозга может вызвать обширную потерю нейронов [1]. Ежегодно в мире от данного вида травм погибают 1,5 млн человек, а 2,4 млн становятся инвалидами [2]. Применение биоинженерных конструкций – скаффолдов, представляющие собой биоактивные матрицы, содержащие биологические соединения, ускоряющие процессы репарации нервной ткани, является перспективным решением данной проблемы. Трансплантаты могут анатомически реконструировать поврежденный мозг и активировать процессы регенерации, способствуя улучшению функциональной активности мозга [3].

Цель: изучить скаффолда на процессы регенерации ткани головного мозга при моделировании ЧМТ.

В ходе исследования использовались самцы линии C57Bl/6. ЧМТ моделировали методом свободного падения груза на открытый участок головного мозга. На 7 сутки после моделирования травмы опытным группам трансплантируют скаффолды, контрольная группа ЧМТ - без трансплантации. Использовались матрицы, в основе которых лежит метакрилированная гиалуроновая кислота. Скаффолды N10S были дополнены нейротрофических факторов (НФ) BDNF и GDNF. В эксперименте у животных проводили оценку неврологического (оценка неврологического дефицита, тест Гарсия,) и поведенческого статусов (водный лабиринт Морриса). На 7, 14, 21 сутки посттравматического периода мозг извлекается для изготовления гистологических срезов и их изучения.

Применение скаффолдов существенно уменьшает объем поражения после моделирования ЧМТ. Достоверные изменения ($p < 0,05$) зафиксированы начиная с 14 суток. Матрицы с НФ усиливают эффект регенерации поврежденной нервной ткани после ЧМТ. Показано улучшение состояния животного после внедрения 3D биоинженерной конструкции в очаг ЧМТ, что подтвердили поведенческие тесты и оценка неврологического статуса.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 18-315-20003).

1. Jiasong G., Self-assembling peptide nanofiber scaffold promotes the reconstruction of acutely injured brain // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 5. 2009. С. 345–351.
2. Лихтерман Л. Б. Черепно-мозговая травма. Диагностика и лечение. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 488 с.
3. Witte O.W. Lesion-induced plasticity as a potential mechanism for recovery and rehabilitative training // *Curr Opin Neurol*. 1998. С. 655–662.

Крио-ЭМ структура 70S рибосомы из *E.coli* в комплексе с диритромицином

Е.Б. Пичкур^{1,2,5}, Е.В. Полесскова^{1,3}, П.С. Касацкий¹, И.А. Остерман^{4,6} Ю.С. Поликанов⁷, А.Г. Мясников^{1,8}, А.Л. Коневега^{1,2,3}

¹ НИЦ "Курчатовский институт" – ПИЯФ, Гатчина, Россия

² НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия

³ СПбПУ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия

⁵ ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва, Россия

⁶ Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Moscow region 143025, Russia

⁷ Department of Biological Sciences, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60607, USA

⁸ Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA 94143, USA.

Макролиды являются одним из наиболее успешных и широко используемых классов антибиотиков, которые останавливают рост патогенных бактерий, связываясь возле активного сайта рибосомы и препятствуя синтезу белка. Диритромицин (ДИР) относится к классу полусинтетических макролидов, первым представителем которого является эритромицин, отличается от предшественника наличием оксазинового кольца, а также (2-метоксиэтокси)-метильной гидрофобной боковой цепью и демонстрирует более высокую ингибирующую активность. Данная работа направлена на изучение структурных основ взаимодействия диритромицина с бактериальным функциональным рибосомным комплексом из *E. coli* при помощи метода криогенной просвечивающей электронной микроскопии (крио-ЭМ).

Анализ полученной структуры показал, что ДИР связывается в канонической для макролидов области, находящейся вблизи пептидил-трансферазного центра рибосомы, формируя водородные связи между 2'-ОН группой дезозаминового сахара и N1 атомом нуклеотида A2058 23S рРНК. Кроме того, связывание ДИР приводит к повороту нуклеотида A2062 на ~160° с образованием хугстиновской пары (tHN) с нуклеотидом m²A2503. Подобный эффект, наблюдавшийся ранее при связывании макролидов с рибосомами из *Th. thermophilus* [1,2], впервые показан для рибосомы из *E. coli*. (2-метоксиэтокси)-метильная боковая цепь оказалась не разрешена на полученной структуре, и, по всей видимости, направлена в просвет рибосомного туннеля, где может влиять на нормальное прохождение растущего полипептида. Дальнейшая 3D классификация по наличию субстрата в А-сайте позволила визуализировать реорганизацию нуклеотида U2585 при связывании тРНК в А-сайте, а также сдвиги нуклеотидов A2583, U2584, однако значительных конформационных изменений нуклеотидов в пептидил-трансферазном центре рибосомы, вызванных связыванием ДИР, обнаружено

не было. Тем не менее, крайне высокое разрешение полученной крио-ЭМ структуры, составившее 2.1Å по критерию FSC=0.143, обеспечивает структурный базис для дальнейших исследований механизма ингибирования синтеза белка макролидами.

Эксперименты по изучению структуры рибосом методом крио-ЭМ поддержаны грантом РНФ 17-14-01416.

1. Khabibullina NF, Tereshchenkov AG, Komarova ES, Syroegin EA, Shiriaev DI, Paleskava A, Kartsev VG, Bogdanov AA, Konevega AL, Dontsova OA et al. 2019. Structure of dirithromycin bound to the bacterial ribosome suggests new ways for rational improvement of macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* **63**: e02266-02218.
2. Svetlov MS, Plessa E, Chen CW, Bougas A, Krokidis MG, Dinos GP, Polikanov YS. 2019. High-resolution crystal structures of ribosome-bound chloramphenicol and erythromycin provide the ultimate basis for their competition. *RNA Journal* **25**: 600-606.

**Социальная передача вкусовых предпочтений:
экспрессия c-Fos и динамика нейрональной активности**

Плюснин В. В., Торопова К. А., Ивашкина О. И.

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

viktor.plusnin@phystech.edu

Социальная передача вкусовых предпочтений является широко распространенным тестом непространственной памяти, который впервые был описан у крыс [1] и все чаще используется у мышей [2].

Нами была проведена отработка модели социальной передачи вкусового предпочтения у мышей линии C57Bl/6. Для этого был использован протокол обучения, предложенный Wrenn [3], в котором животное-наблюдатель обучается употреблению пищи, имеющей новый вкус и запах, через взаимодействие с животным-демонстратором, ранее уже питавшимся такой пищей. Было показано, что мыши успешно обучаются социальной передаче вкусового предпочтения, и данное обучение приводит к формированию кратковременной и долговременной памяти. Кроме того, нами впервые в мире было проанализировано поведение мышей-демонстраторов через 24 часа после ознакомления с целевым кормом. Животные-демонстраторы запоминали ранее съеденный ими корм, однако, эта память проявлялась в устойчивом предпочтении нового, а не целевого корма. Таким образом, нами было показано, что как индивидуальное, так и социальное обучение одной и той же ситуации внешней среды приводит к формированию устойчивой долговременной памяти, однако эта память по-разному проявляется в поведении в зависимости от того, была ли она сформирована в результате индивидуального опыта или наблюдательного обучения.

Далее нами было проведено исследование нейрональных основ социальной и индивидуальной памяти у мышей. Для этого было проведено картирование активности различных областей мозга мышей при помощи выявления белка-продукта немедленного раннего гена c-fos при извлечении ранее сформированной памяти о новом вкусе. Также была произведена регистрация кальциевой активности нейронов области CA1 гиппокампа с помощью миниатюрного микроскопа nVista во время приобретения и извлечения памяти о вкусовых предпочтениях, сформированных животными индивидуально или переданных им социально.

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ №№ 17-29-07083, 17-00-00215 и 19-315-80020.

1. Galef B.G., Kennett D.J., Wigmore S.W. *Animal Learning & Behavior*. 12: 292 (1984).
2. Kogan J.H. *et al.* *Curr. Biol.*, 7(1): 1–11 (1997).
3. Wrenn C.C. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 8: Unit 8.5G (2004).

Оментин-1 подкожной жировой ткани при ишемической болезни сердца

Побожева И. А.^{1, 2}, Пантелеева А. А.^{1, 2}, Разгильдина Н. Д.¹, Драчева К. В.¹,
Полякова Е. А.², Драганова А. С.², Колодина Д. А.², Пчелина С. Н.^{1, 2},
Мирошникова В. В.¹

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

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

Оментин-1 – один из важнейших адипокинов, экспрессируемых жировой тканью, обладает противовоспалительным, антиокислительным и противоатерогенным эффектом. [1, 2]. В ряде исследований была показана взаимосвязь концентрации циркулирующего в сыворотке крови оментина-1 с диабетом, метаболическим синдромом, атеросклерозом и ишемической болезнью сердца (ИБС) [2, 3].

Цель нашей работы – исследование уровня экспрессии гена *ITLN1* и уровня белка оментина-1 в образцах подкожной жировой ткани (ПЖТ), а также оценка корреляции изученных параметров с уровнем циркулирующего оментина-1 в сыворотке крови пациентов с ИБС и группы сравнения.

Материалы и методы. Были собраны образцы ПЖТ и сыворотки крови 74 пациентов с ИБС, перенесших коронарное шунтирование. В группу сравнения вошли 16 пациентов, оперированных по поводу клапанных пороков сердца. Уровень мРНК гена *ITLN* оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. Для оценки уровня белка оментина-1 в ПЖТ использовался метод вестерн-блот. Концентрацию белка оментина-1 в сыворотке крови измеряли методом ИФА. Статистическая обработка материала выполнялась с использованием программы SPSS 23.0.

Результаты. Концентрация оментина-1 в сыворотке крови была ниже в группе пациентов с ИБС по сравнению с контрольной группой ($p=0,001$). При этом у женщин концентрация оментина-1 в сыворотке крови была выше, чем у мужчин ($p=0,04$). Уровень мРНК гена *ITLN1* достоверно коррелировал с уровнем белка оментина-1 в ПЖТ ($p<0,05$). Не было выявлено статистически значимых различий в содержании белка и мРНК гена *ITLN1* в ПЖТ между исследуемыми группами. Был выявлен более высокий уровень белка оментина-1 в ПЖТ у всех обследованных мужчин по сравнению с женщинами ($p=0,03$).

Выводы. Наше исследование подтвердило антиатерогенную роль циркулирующего оментина-1 сыворотки крови, однако не выявило ассоциации между экспрессией гена *ITLN1* в подкожной жировой ткани и развитием ИБС. При этом показаны гендерные особенности экспрессии оментина-1 в ПЖТ.

Поддержано грантом РФФИ мол_а 18-315-00382.

1. Watanabe T., Watanabe-Kominato K., Takahashi Y., Kojima M., Watanabe R. Adipose Tissue-Derived Omentin-1 Function and Regulation // *Compr. Physiol.* 2017. V. 7. No. 3. P. 765–781. doi: 10.1002/cphy.c160043
2. Du Y., Ji Q., Cai L., Huang F., Lai Y., Liu Y. *et al.* Association between omentin-1 expression in human epicardial adipose tissue and coronary atherosclerosis // *Cardiovasc Diabetol.* 2016. V. 15. P. 90. doi: 10.1186/s12933-016-0406-5
3. Yoo H.J., Hwang S.Y., Hong H.C., Choi H.Y., Yang S.J., Seo J.A. *et al.* Association of circulating omentin-1 level with arterial stiffness and carotid plaque in type 2 diabetes // *Cardiovasc Diabetol.* 2011 V. 10. P. 103. doi: 10.1186/1475-2840-10-103

Влияние белкового окружения на динамику S_2 - S_1 внутренней конверсии лютеина в LHCII растений

Поддубный В. В., Козлов М. И.

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

LHCII – основной светопоглощающий комплекс растений. В его состав входят хромофоры, которые можно разделить на 2 типа: хлорофиллы (a и b) и каротиноиды (лютеин, неоксантин и виолоксантин), поглощающие свет с длиной волны около 670 и 450 нм, соответственно. При возбуждении каротиноидов (лютеина, в частности) они переходят во второе электронное возбужденное состояние S_2 , и далее энергия с них переносится на хлорофиллы. Однако с этим процессом конкурирует внутренняя конверсия [1] – переход в состояние S_1 . Дальнейшая конверсия S_1 - S_0 на лютеине (LUT 620) играет важную роль в процессе нефотохимического тушения флуоресценции в комплексе LHCII [2]. На примере растворов было показано, что скорость внутренней конверсии каротиноидов достаточно сильно зависит от их окружения [3]. В связи с этим возникает вопрос, о том, как на скорости этих процессов влияет белковое окружение в рассматриваемом комплексе.

В работе представлены результаты моделирования диссипативной динамики указанных процессов с участием лютеина (LUT 620) в комплексе LHCII и динамики внутренней конверсии лютеина в растворе. Поскольку в ходе электронных переходов каротиноидов происходит и изменение его колебательных состояний, для расчета динамики был использован метод, разработанный нами ранее [4] способный описывать эти особенности. Параметры модели были рассчитаны с помощью высокоточных методов квантовой химии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-33-01122.

1. P.J. Walla *et al.* // J. Phys. Chem. A, 2002, V. 106, P. 1909–1916.
2. A.N. Macpherson, T. Gillbro // J. Phys. Chem. A 1998, V. 102, P. 5049–5058.
3. R.Goss, B. Lepetit // J. Plant Physiol., 2015, V. 172, P. 13–32.
4. V.V. Poddubnyy *et al.* // J. Phys. Chem. B, 2017, V. 121, P. 10639–10647.

Модельные ДНК для изучения эксцизионной репарации нуклеотидов

Попов А. А.¹, Евдокимов А. Н.¹, Петрусева И. О.¹, Лаврик О. И.^{1, 2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

depolice@mail.ru

В настоящее время модельные ДНК весьма эффективно применяются для изучения ряда молекулярных процессов, происходящих в эукариотических клетках. Среди подобных процессов значительный интерес представляет эксцизионная репарация нуклеотидов (NER), обеспечивающая сохранение целостности и стабильности генома путем удаления из ДНК объемных повреждений. В контексте изучения NER модельные ДНК могут быть применены не только для определения относительной эффективности реакции эксцизии в клеточных экстрактах [1] и поиска новых белков-участников данного процесса [2, 3], но и для эффективного подавления процесса NER. В связи с этим, использование модельных ДНК в качестве аналогов субстратов и промежуточных интермедиатов процесса NER представляет важное фундаментальное и прикладное значение.

В данной работе представлены особенности дизайна серии модельных ДНК различной длины, содержащих фторхлоразидопиридиновую (Far), флуоресцеиновую (nFlu) или антраценильную (nAnt) группы в качестве объемных повреждений, изучены свойства таких ДНК, а также оптимизированы условия их получения. Были получены модельные ДНК, содержащие как одиночные, так и множественные повреждения.

Было показано, что nFlu и nAnt являются повреждениями, с высокой эффективностью удаляемыми системой NER из состава ДНК, в то время как Far можно оценить как нерепарируемое повреждение. Протяженная ДНК, содержащая множественные Far-dC-группы, способна связывать белковые факторы NER, что приводит к подавлению активности этой системы. Учитывая возможность ковалентной пришивки белков с использованием Far-dC-содержащей ДНК методом фотоаффинной модификации, представленные в данной работе ДНК-структуры являются перспективными инструментами для проведения как фундаментальных, так и прикладных исследований.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-10056).

1. Evdokimov A.N., Tsidulko A.Y., Petruseva I.O., Koroleva L.S., Serpokrylova I., Silnikov V.N., Lavrik O.I. New synthetic substrates of mammalian nucleotide excision repair system // *Nucleic Acids Research*, 2013. – V. 41. – No. 12. – P. e123.
2. Евдокимов А. Н., Петрусева И. О., Пестряков П. Е., Лаврик О. И. Фотоактивируемые ДНК-аналоги субстратов системы эксцизионной репарации нуклеотидов и их взаимодействие с белками NER-компетентного экстракта клеток HeLa. Синтез и применение протяженных модельных ДНК // *Биохимия*, 2011. – Вып. 76. – № 1. – С. 188–200.
3. Петрусева И. О., Тиханович И. С., Мальцева Е. А., Сафронов И. В., Лаврик О. И. Фотоактивируемые ДНК-аналоги субстратов белков системы эксцизионной репарации нуклеотидов и их взаимодействие с белками NER-компетентного экстракта клеток HeLa // *Биохимия*, 2009. – Вып. 74. – № 5. – С. 607–619.

Нитропроизводные пуринов – потенциальные ингибиторы фосфодиэстераз

Протасов А. В.^{1, 2}, Барановская И. Л.^{1, 2}, Цветков В. Б.^{1, 3}, Миргородская О. А.¹

¹ Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

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

Острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ) – группа клинически и морфологически подобных острых воспалительных заболеваний органов дыхания.

Одним из регуляторов воспаления в дыхательных путях является фосфодиэстераза 4 типа (PDE4) [1]. Она относится к семейству 3',5'-цАМФ специфичных фосфодиэстераз. Ингибирование PDE4 приводит к снижению уровня воспаления в тканях верхних дыхательных путей [2,3].

Нами было сделано предположение о том, что триазаверин (натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она) и его аналоги, являясь синтетическими аналогами азотистых оснований аденина и гуанина, могут выступать в роли ингибиторов цАМФ и цГМФ специфичных фосфодиэстераз.

Способность триазаверина к ингибированию фосфодиэстераз была проверена на фосфодиэстеразе 1 типа (PDE1), специфичной как к цАМФ, так и к цГМФ, с использованием PDE Activity Assay Kit (Abcam, ab139460). Все рассматриваемые соединения ряда азолазинов показали способность к ингибированию PDE1. Концентрация азолазинов, при которой наблюдается 50% ингибирование активности PDE1 составила 100 мМ. Эта концентрация сопоставима с ингибирующей активностью стандартного неконкурентного ингибитора фосфодиэстераз 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX). Также была выдвинута гипотеза о возможности оказывать ингибирующее действие исследуемых структур на один из регуляторов воспаления верхних дыхательных путей PDE4. Для ее проверки было проведено молекулярное моделирование посредством докинга с использованием MolSoft ICM, которое показало, что наиболее вероятный сайт связывания с PDE4 располагается в области активного центра. Взаимодействие с PDE4 как самого триазаверина, так и его производных по результатам докинга обусловлено формированием координационных связей с ионами, располагающимися в каталитическом центре.

Таким образом, было показано ингибирование PDE1 азолазинами. По результатам молекулярного докинга мы предполагаем, что азолазины также будут оказывать ингибирующее действие на PDE4.

1. Jin S., Ding S., Lin S. Phosphodiesterase 4 and its inhibitors in inflammatory diseases // *Chang Gung Med J.* – 2012. – V. 35(3). – P. 197–210.
2. Sharma G., Champalal Sharma D., Hwei Fen L. *et al.* Reduction of influenza virus-induced lung inflammation and mortality in animals treated with a phosphodiesterase-4 inhibitor and a selective serotonin reuptake inhibitor // *Emerging Microbes and Infections.* – 2013. – V. 2.
3. Edwards M., Facchinetti F., Civelli M., Villetti G., Johnston S. Anti-inflammatory effects of the novel inhaled phosphodiesterase type 4 inhibitor CHF6001 on virus-inducible cytokines // *Pharmacology Research and Perspectives.* – 2016. – V. 4(1). – P. 1–14.

Деконволюция конфокальных изображений нейронов с помощью экспериментально определенной функции рассеяния точки

Пчицкая Е. И.¹, Безпрозванный И. Б.^{1, 2}

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

² *Юго-Западный медицинский центр Университета штата Техас,
кафедра физиологии, Даллас, США*

katrincreative@yandex.ru

Ограничение детального изучения морфологии дендритных шипиков нейронов заключается в недостаточном разрешении широко применяемой в биологических исследованиях лазерной сканирующей микроскопии для визуализации мельчайших деталей их морфологии [1]. Получение изображения светящегося объекта (g) при помощи флуоресцентной микроскопии можно описать операцией свертки функции рассеяния точки (h) (ФРТ), характеризующей ответ оптической системы на точечный источник света, и функции, характеризующей истинное распределение интенсивностей свечения отдельных точек исследуемого объекта (f). Деконволюция представляет собой обратный процесс, в ходе которого при известной ФРТ (h) восстанавливается исходное изображение объекта (f). ФРТ может быть рассчитана теоретически, исходя из известных параметров оптической системы (тФРТ), или определена экспериментально (эФРТ) путем анализа изображения флуоресцентных микросфер известного диаметра. В данной работе было определено, что в задаче реконструкции конфокальных изображений таких малых объектов как дендритные шипики, деконволюция с эФРТ значительно превосходит по качеству получаемых изображений деконволюцию с тФРТ. С помощью программного обеспечения DeconvolutionLab2 [2], был определен оптимальный алгоритм деконволюции, продемонстрировавший наилучшие результаты в уточнении формы дендритных шипиков гиппокампальных нейронов – алгоритм Ричардсона-Люси с полной вариацией в качестве регуляризирующего члена [3]. Задание границ объекта является необходимым этапом перед определением численных значений морфологических параметров синаптических контактов нейронов. Авторами продемонстрировано преимущество адаптивной сегментации перед глобальной для определения границ дендритных шипиков на двумерной проекции серии изображений нейронов после деконволюции.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00183\19 (Пчицкая Е. И.) и грантом Российского научного фонда № 19-15-00184 (Безпрозванный И. Б.).

1. Пчицкая Е. И., Крылов И. С., Власова О. Л., Болсуновская М. В., Безпрозванный И. Б. Переход от классического деления дендритных шипиков нейронов на типы к альтернативным методам анализа // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. – 2019. – Т. 12(2). – С. 88–100.
2. Sage D., Donati L., Soulez F., Fortun D., Schmit G., Seitz A., Guiet R., Vonesch C., Unser M. DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy // Methods. 2017. V. 115. P. 28–41.
3. Dey N., Blanc-Feraud L., Zimmer C., Roux P., Kam Z., Olivo-Marin J. C., Zerubia J. Richardson-Lucy algorithm with total variation regularization for 3D confocal microscope deconvolution // Microsc. Res. Tech. 2006. V. 69, No. 4. P. 260-6.

Влияние соединений бора на выживаемость клеток злокачественных глиом при облучении протонами в пике Брэгга

Разгильдина Н. Д.¹, Гараева Л. А.^{1, 2, 3}, Волницкий А. В.^{1, 2}, Бурдаков В. С.^{1, 2},
Верлов Н. А.^{1, 2}, Американов Д. А.^{1, 2}, Пак Ф. А.^{1, 2}, Лебедев Д. В.^{1, 2},
Коневега А. Л.^{1, 2, 3}, Штам Т. А.^{1, 2}

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

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

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

Razgildina_ND@pnpi.nrcki.ru

Протонная терапия считается наиболее передовым видом лучевой терапии и заключается в использовании пучка высокоэнергетических протонов для облучения опухолей [1]. Благодаря своим преимуществам, протонная терапия используется для лечения многих видов рака и особенно подходит в ситуациях, когда лучевая терапия с использованием пучка фотонов подвергает пациентов неприемлемым рискам для здоровья [2]. К таким ситуациям относятся опухоли головного мозга, в частности глиомы. Основным преимуществом протонной терапии является возможность фокусировки облучения непосредственно на опухоли. Однако, для минимизации дозовой нагрузки на близлежащие к опухоли здоровые ткани, актуален поиск низкомолекулярных соединений, способных усиливать воздействие радиоактивного излучения на злокачественные клетки. В частности, на сегодняшний день опубликованы единичные работы, показывающие преимущества облучения потоком протонов опухолевых клеток, насыщенных изотопом бора-11 (^{11}B) [1, 3].

Целью данной работы стало выявление сенсibiliзирующих эффектов соединений бора при облучении культивируемых *in vitro* клеток глиом протонами в пике Брэгга.

В ходе исследования преинкубированные с ^{11}B (тетраборат натрия) клетки линий глиобластом облучали на протонном синхроциклотроне СЦ-1000 в диапазоне доз 0.5-20 Гр с последующей оценкой выживаемости опухолевых клеток с помощью MTS-теста и окрашиванием жизнеспособных колоний кристаллическим фиолетовым. В результате проведенных опытов на примере ряда клеточных линий мультиформных глиобластом мы показали способность соединений бора индуцировать гибель злокачественных клеток при облучении протонами в пике Брэгга. Комбинированное воздействие радиотерапии с тетраборатом натрия на злокачественные клетки увеличивает их

чувствительность к облучению протонами при низкой токсичности препарата, содержащего ^{11}B , для клеток нормальной морфологии.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ № 1363).

1. K. Hideghéty *et al.* Anticancer Res. 2019 May; 39(5):2265–2276.
2. Yolanda Prezado1 *et al.* Nature, 2018: 8:16479.
3. G.A.P. Cirrone *et al.* Nature, Sci Rep., 2018 Jan 18; 8(1):1141.

Гиперэкспрессия белка EB3 предотвращает дегенеративные изменения дендритных шипиков в условиях низкой амилоидной токсичности

Раковская А. В.¹, Пчицкая Е. И.¹, Безprozванный И. Б.^{1, 2}

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

² *Юго-Западный медицинский центр Университета штата Техас, кафедра физиологии, Даллас, США*

Микротрубочки – полярные биополимеры, состоящие из длинных цепочек белка тубулина. Белок End-binding protein 3 (EB3), крепящийся к положительному концу нейрональной микротрубочки, является характерным для нейрональных клеток членом семейства белков EB [1]. Гиперэкспрессия белка EB3 значительно увеличивает число грибовидных дендритных шипиков в гиппокампальных нейронах дикого типа и нейронах, полученных из мышей линии PS1-M146V-KI, моделирующих болезнь Альцгеймера (БА) [2]. Данная трансгенная линия характеризуется ассоциированной с наследственной формой БА мутацией M146V в белке Пресенилине 1, но в нейронах мышей линии PS1-M146V-KI не происходит характерное для БА накопление бета-амилоида [3]. В продолжение исследования авторами был проанализирован эффект гиперэкспрессии белка EB3 на морфологию дендритных шипиков в условиях амилоидной токсичности. Первичные гиппокампальные нейроны визуализировались путем проведения кальций-фосфатной трансфекции плазмидой, кодирующей флуоресцентный белок mCherry или mCherry и FLAG-EB3, на 7 день культивирования *in vitro* (DIV). На 10-11 DIV в среду для культивации добавлялась олигомерная фракция A β до достижения концентрации 0,1 мкМ. На 14-15 DIV нейрональные культуры фиксировались и далее были получены серии конфокальных изображений нейронов на микроскопе Thorlabs (1024 × 1024 пикселя, разрешение 0,11 мкм/пиксель). Обработка изображений производилась с помощью метода деконволюции по алгоритму Ричадсона-Люси; количественный анализ морфологии дендритных шипиков производился в программе NeuronStudio и ImageJ.

В результате проведенных исследований выявлено, что гиперэкспрессия EB3 увеличивает число грибовидных дендритных шипиков в условиях низкой амилоидной токсичности, что позволяет сделать вывод о том, что динамика тубулинового цитоскелета нейронов имеет существенное значение в определении формы дендритных шипиков гиппокампальных нейронов.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-15-00184 (Безprozванный И. Б.).

1. Nakagawa H., Koyama K., Murata Y., Morito M., Akiyama T., Nakamura Y. EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue // *Oncogene*. 2000. V. 19. No. 2. P. 210-6.
2. Pchitskaya E., Kraskovskaya N., Chernyuk D., Popugaeva E., Zhang H., Vlasova O., Bezprozvanny I. Stim2-Eb3 Association and Morphology of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons // *Sci Rep*. 2017. V. 7. No. 1. P. 017-17762.
3. Пчицкая Е. И., Попугаева Е. А., Власова О. Л., Безprozvanny И. Б. Роль белка STIM2 в формировании дендритных шипиков в условиях амилоидной синаптоксичности // Научный форум с международным участием «Неделя науки СПбПУ». Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций СПбПУ. 2015. С. 445–447.

Структура люминесцирующих кластеров серебра, стабилизированных тРНК

Рамазанов Р. Р., Сыч Т. С.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал, касающийся синтеза люминесцентных кластеров серебра на ДНК. Однако очень мало известно о структуре и спектральных свойствах кластеров, стабилизированных на транспортной РНК [1]. В настоящее время тРНК, меченные различными органическими красителями, широко используются для исследований *in vivo*. Тем не менее, новые стратегии маркировки тРНК необходимы, для улучшения фотостабильности и снижения влияния метки на функциональность биомолекулы. В наших недавних исследованиях нам удалось вырастить «зеленый» и «красный» кластеры серебра на двойных участках спиралей тРНК, не влияя на функциональность «петлей» РНК [2].

В настоящей работе на основе сравнения экспериментальных данных ИК и УФ спектроскопии и компьютерного моделирования комплексов кластеров с фрагментами РНК, содержащими цитозины, были получены модели кластеров соответствующих люминесцентным. Расчеты оптических свойств кластеров проводились с использованием теории функционала плотности и функционала M06-2x, штутгартского псевдопотенциала для атомов серебра. Показано, что как и в случае ДНК-матрицы [3], на тРНК образуются частично окисленные линейные структуры кластеров серебра, содержащие не более 10 атомов. Результаты показывают, что в зависимости от соотношения концентрации ионов серебра к количеству сайтов связывания и концентрации химического восстановителя, на одних и тех же структурах могут образовываться различные по люминесцентным свойствам кластеры серебра.

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках проекта № 18-33-00603.

1. Afonin K.A. *et al.* Silver nanoclusters for RNA nanotechnology: Steps towards visualization and tracking of RNA nanoparticle assemblies // *Methods Mol. Biol. Humana Press Inc.*, 2015. V. 1297. P. 59–66.
2. Sych T.S. *et al.* tRNA as a stabilizing matrix for fluorescent silver clusters: Photophysical properties and IR study // *Nanoscale Adv. Royal Society of Chemistry*, 2019. V. 1. No. 9. P. 3579–3583.
3. Ramazanov R.R. *et al.* Ag-DNA Emitter: Metal Nanorod or Supramolecular Complex? // *J. Phys. Chem. Lett.* 2016. V. 7. No. 18. P. 3560–3566.

Идентификация новых мутантных линий мышей, проявляющих признаки эпилепсии

Рыбакова В. П.¹, Жидкова Н. М.¹, Белоусова И. И.²,
Бабаев А. А.¹, Тарабыкин В. С.¹

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

² *Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава РФ,
Нижний Новгород, Россия*

verunya.rubackova@mail.ru

В настоящее время эпилепсия является одним из наиболее распространенных тяжелых неврологических заболеваний. Причины развития эпилептических припадков неоднозначны, однако немалую роль отводят влиянию генетических факторов, но при этом их конкретные функции до конца не установлены. На сегодняшний день хорошо изучены симптоматические формы заболевания, и поэтому свою задачу мы ставим в поиске генетических причин.

Целью исследования явилась идентификация новых мутантных эпилептических линий мышей. Для проведения исследования были сгенерированы мышинные мутанты путем химического мутагенеза N-этил-N-нитрозомочевинной (ENU). Было произведено 3 серии ENU-инъекции 95 самцов мышей линии СЗН с дозой 90 мг/кг. Выявление и отбор мышинных мутантов с повышенной склонностью к эпилептическим припадкам осуществлялись с применением методики Крушинского, учитывающей степень проявления аудиогенных судорог. Результатом стало выявление 17 линий животных с различной степенью проявления эпилептической активности. Тестирование проводилось дважды: на Р20-25 и Р>60. Дополнительные методы скрининга включали применение химической пилокарпиновой модели и метод фотостимуляции. Проведены мероприятия по закреплению признака эпилепсии у мутантных линий мышей согласно разработанной схеме скрещивания. Создание линий с рецессивной мутацией проводилось с отбором животных, показывающих аберрантный фенотип во второй раз. Наследование аберрантного фенотипа подтверждалось в G5-поколении мышей. Для характеристики полученных эпилептических линий использовали базовое поведенческое фенотипирование с проведением тестирований на память, способность к обучению, моторно-двигательные реакции и оценку эмоционального статуса. Проведенный комплекс поведенческих исследований выявил отличия в показателях акустической реакции вздрагивания, двигательной активности, уровне тревожности и обучаемости между данными

линиями, а также по сравнению с контрольными группами животных. На следующей стадии эксперимента потомство с эпилептиформной активностью будет анализироваться на поиск закрепленных рецессивных мутаций в соответствующих генах методом позиционного картирования.

Роль гена *swiss cheese* в нервной системе *Drosophila melanogaster*

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

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

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

ryabova_ev@pnpi.nrcki.ru

SWS выполняют функцию сериновой эстеразы и имеют домен пататин-подобной фосфолипазы [1]. Связывание органофосфатов с этим доменом приводит к дегенерации мотонейронов и, следовательно, локомоторному нарушению у *Drosophila melanogaster*. У первых мутантов *swiss cheese* ранее было показано, что потеря белка в псевдокатриджной глии вызывает образование многослойного глиального обертывания в коре ламины [2]. Также подавление его экспрессии в глиальных клетках приводит к повреждению аксонов.

Данный белок является эволюционно-консервативным и имеет ортологи у разных организмов, включая человека – NTE (*neuropathy target esterase*). Мутации в гене *NTE* вызывают сложный синдром у людей, который включает аутосомно-рецессивную форму наследственной спастической параплегии типа SPG39, синдром Лоренса-Муна, синдром Гордона Холмса, синдром Гаучера-Нейгауза и синдром Оливера-Макфарлейна. NTE широко выражен в нейронах, но также образуется в глии; однако его функции в нервной системе (НС) до сих пор оставалась не до конца изученной.

Ранее нами было показано распределение SWS в нервной системе личинок *Dr. melanogaster* [3]. Данная же работа направлена на изучение влияния подавленной экспрессии гена *sws* с помощью РНК интерференции (*UAS-RNAi-sws*) на *Dr. melanogaster* в моторных нейронах и глиальных клетках. Результаты данного исследования показывают, что потеря белка приводит к различным нарушениям в НС насекомого.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-34-90151.

1. Lush M.J., Li Y., Read D.J., Willis A.C., Glynn P. Neuropathy target esterase and a homologous *Drosophila* neurodegeneration-associated mutant protein contain a novel domain conserved from bacteria to man // 1998, Biochem J., V. 15. P. 1–4.
2. Dutta S., Rieche F., Eckl N., Duch C., Kretschmar D. Glial expression of Swiss cheese (SWS), the *Drosophila* orthologue of *neuropathy target esterase* (NTE), is required for neuronal ensheathment and function // 2016, Disease Models & Mechanisms. V. 9. P. 283–294.
3. Ryabova E. *et al.* Swiss cheese, *Drosophila* orthologue of *hereditary spastic paraplegia* gene NTE, maintains neuromuscular junction development and microtubule network // *Drosophila melanogaster* – Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics // INTECH – 2018. P. 209–225.

Характеристика внеклеточных металлопептидаз мозга птиц

Ситдикова К. К.^{1, 2}, Кропотова Е. С.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

Регулирование функций мозга у живых организмов осуществляется с участием нейромедиаторов, в том числе, пептидных нейромедиаторов (нейропептидов) [1]. Нейропептиды секретируются определенными клетками и, распространяясь во внеклеточной среде мозга, воздействуют на рецепторы нейронов, регулируя их активность. Однако и сами нейропептиды должны быть под контролем, который у млекопитающих осуществляют специфические и неспецифические пептидазы. Ранее в мозге млекопитающих была выявлена группа внеклеточных низкоспецифичных пептидаз (NEMP) [2], вероятной функцией которых является контролируемый катаболизм нейропептидов. Исследуя данную группу ферментов, было решено также рассмотреть их возможные ортологи, выделенные нами из мозга птиц.

Целью нашего исследования является определение первичных характеристик внеклеточных пептидаз мозга птиц, которое в дальнейшем позволит провести более точный анализ ферментов группы NEMP, а также позволит создать систему защиты лекарственных пептидных препаратов от деградации внеклеточными ферментами.

Эксперименты проводились на изолированных аксонных окончаниях нейронов (синапсосамах). Для отделения пептидаз от синапсосом использовался буфер, содержащий 0,1 % детергента Тритон X-100. Присутствие пептидаз на поверхности синапсосом определяли при инкубации тестовых пептидов в суспензии тщательно отмытых синапсосом при температуре 37°C [3].

В результате работы было выявлено, что полученные ферменты, являющиеся металлопептидазами, проявляют аминопептидазную, карбоксипептидазную, эндопептидазную и трипептидазную активность. Однако было замечено, что фермент, разрушающий три- и дипептиды до отдельных аминокислот, не способен гидролизовать пептидную связь в молекуле карнозина (дипептида, состоящего из бета-аланина и гистидина). Это говорит о возможности создания защищенных пептидов (в т.ч. лекарственных средств на их основе), не деградирующих в присутствии металлопептидаз. Также было выявлено, что обнаруженные ферменты теряют свою активность при pH<6.

1. Flood J.R., Cherkin A., and Morley J. E. Antagonism of endogenous opioids modulates memory processing. *Brain Res.* 422, 218–234 (1987).
2. Kropotova E.S., Mosevitsky M.I. A group of weakly bound to neurons extracellular metallopeptidases (NEMPs). *Neurochem. Res.* 41, 2666–2674 (2016).
3. Checler F., Vincent J.P., Kitabgi P. Purification and characterization of a novel neurotensin-degrading peptidase from rat brain synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 261, 11274–11281 (1986).

Исследование изменений конформации гема и глобина при изменении температуры и нормобарической гипоксии

Слатинская О. В., Лунева О. Г., Деев Л. И., Максимов Г. В.

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

В настоящее время широко обсуждается вопрос о роли структурных изменений цитоплазмы («краудинг») в регуляции объема и гемодинамики эритроцитов в сосудах. В связи с этим, разрабатываются подходы оценки состояния эритроцитов *in vitro*, с использованием таких методов, как спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) и ее разновидности, атомно-силовой микроскопии и лазерной интерференционной микроскопии, а также ряд стандартных биохимических методов. Так, было установлено, что диффузия молекул O_2 и NO_x через плазматическую мембрану эритроцита зависит от упорядоченности жирнокислотных хвостов фосфолипидов плазматической мембраны и состояния цитоскелета эритроцита, а способность гемоглобина (Гб) связывать и сбрасывать эти молекулы — от его локализации в примембранной области и цитоплазме клетки. Об этом свидетельствуют данные о различном состоянии конформации гема и глобина Гб в различных областях эритроцита [1].

В работе исследованы изменения конформации гема и глобина гемоглобина эритроцитов человека физиологическом диапазоне температур 20–38°C и различном содержании O_2 методом КР. Показано, что при гипоксии меняется конформация Гб за счет увеличения вклада пиррольных колец гемопорфирина и валентных колебаний групп винилов, а также выявлены изменения вклада валентных симметричных и ассиметричных колебаний CH_2 - и CH_3 -радикалов аминокислот глобина [3]. Дальнейшее увеличение температуры может приводить к разрушению цитоскелета и изменению конформации Гб [2], которая также зависит от температуры инкубации эритроцитов. По мнению авторов, изменения объема или активация рецепторов эритроцита стимулирует процессы изменения конформации в белковых молекулах как в мембране (при изменении вязкости), так и примембранного и цитоплазматического Гб, связанного с цитоскелетом и упорядоченностью Гб в цитоплазме, что способствует эффективному перераспределению O_2 в эритроците.

1. Brazhe N. A. *et al.* New insight into erythrocyte through *in vivo* surface-enhanced Raman spectroscopy // Biophysical journal. – 2009. – V. 97. – No. 12. – P. 3206–3214.
2. Parshina E. Y. *et al.* Thermal inactivation of volume-sensitive K^+ , Cl^- cotransport and plasma membrane relief changes in human erythrocytes // Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. – 2013. – V. 465. – No. 7. – P. 977–983.

3. Marzec K. M. *et al.* Red Blood Cells Polarize Green Laser Light Revealing Hemoglobin's Enhanced Non-Fundamental Raman Modes // ChemPhysChem. – 2014. – V. 15. – No. 18. – P. 3963–3968.

Конъюгаты комплексов платины с пептидами в терапии болезни Альцгеймера

Слободина А. Д.¹, Соломатина А. И.², Рябова Е. В.¹,
Большакова О. И.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*

Наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием в современном обществе является болезнь Альцгеймера (БА), сопровождающаяся накоплением в головном мозге фибриллярных агрегатов амилоидного пептида бета (Аβ) [1]. Сегодня ведутся интенсивные работы по поиску препаратов, способных замедлить или предотвратить агрегацию амилоида. При скрининге комбинаторных пептидных библиотек был определен пептид RHVLPKVQA, блокирующий различные стадии образования амилоидных фибрилл. К этому пептиду присоединили векторный пептид, способный проходить через клеточные мембраны и ГЭБ [2–4]. Для визуализации полученного составного пептида (Р) с помощью конфокального микроскопа к нему присоединили люминесцентные платиновые комплексы Pt1 и Pt2 [5].

Полученные пептиды были изучены на способность проходить через мембраны клеток линий ECV304 и Hela. Сигнал люминесценции конъюгата Pt1-Р не удалось детектировать, что связано с малым квантовым выходом соединения или низкой способностью к проникновению через мембраны клеток. Конъюгат Pt2-Р проходил внутрь клеток обеих линий и регистрировался в цитоплазме. Для анализа токсичности пептидов применили МТТ-тест. Исследуемые конъюгаты не токсичны для клеток ECV304, а максимальная концентрация конъюгата Pt2-Р оказалась токсичной для клеток Hela.

Для анализа прохождения пептидов через ГЭБ дрозофилы применили метод инъекций пептидов в абдомен мух с последующей их детекцией в мозге через определенные промежутки времени. Сигнал люминесценции конъюгата Pt2-Р детектировался внутри мозга, что говорит о его прохождении через ГЭБ.

Также было исследовано связывание модифицированных пептидов с амилоидными отложениями в мозге дрозофилы. Для этого использовали трансгенные линии *Drosophila melanogaster*, воспроизводящие основные признаки БА, в частности отложение Аβ в мозге. Было показано, что в мозге мух обеих линий сигнал от исследованных пептидов распределен равномерно по всему мозгу и не локализован в отдельных его областях.

Работа поддержана грантом № 18-33-00954.

1. Родин Д. И., Шварцман А. Л., Саранцева С. В. Современные подходы к терапии при болезни Альцгеймера: от амилоида к поиску новых мишеней // Ученые записки СПбГМУ им. Акад. И.П. Павлова. – 2014. – Т. 21. – № 1. – С. 6–10.
2. Huong V.T., Shimanouchi T., Shimauchi N., Yagi H., Umakoshi H., Goto Y., Kuboi R. Catechol derivatives inhibit the fibril formation of amyloid- β peptides // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2010. – V. 109. – No. 6. – P. 629–634.
3. Bednarikova Z., Huy P.D.Q., Mocanu M.M., Fedunova D., Li M.S., Gazova Z. Fullerenol C₆₀(OH)₁₆ prevents amyloid fibrillization of A β ₄₀ – *in vitro* and *in silico* approach // The Royal Society of Chemistry. – 2016. – V. 00. – No. 1–3. – P. 1–16.
4. Schwarzman A.L, Tsiper M., Gregori L., Goldgaber D., Frakowiak J., Mazur-Kolecka B., Taraskina A., Pchelina S., Vitek M.P. Selection of peptides binding to the amyloid b-protein reveals potential inhibitors of amyloid formation // Amyloid. – 2005. – V. 12. – No. 4. – P. 199–209.
5. Solomatina A.I., Chelushkin P.S., Abakumova T.O., Zhemkov V.A., Mee-Whi Kim, Bezprozvanny I., Gurzhiy V.V., Melnikov A.S., Anufrikov Y.A., Koshevoy I.O., Shih-Hao Su, Pi-Tai Chou, Tunik S.P. Reactions of Cyclometalated Platinum(II) [Pt(N[^]C)(PR₃)Cl] Complexes with Imidazole and Imidazole-Conjugated Biomolecules: Fine-Tuning Reactivity and Photophysical Properties via Ligand Design // Inorg. Chem. – 2019. – V. 58. – P. 204–217.

Нокдаун гена *swiss cheese* приводит к нарушению метаболизма липидов в нервной системе *Drosophila melanogaster*

Сурина Н. В., Рябова Е. В., Жмуйдина Д. Р., Саранцева С. В.

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

Липидные капли (ЛК) – это внутриклеточные органеллы, содержащие в своем составе преимущественно нейтральные липиды. Их функции в клетке выходят за пределы участия в липидном метаболизме. В настоящее время известно, что ЛК участвуют в накоплении энергии, поддержании энергетического гомеостаза, хранении гидрофобных витаминов и сигнальных предшественников, а также управляют клеточным стрессом.

Метаболизм липидов играет решающую роль в нервной системе (НС): в функционировании и поддержании гомеостаза клеточных мембран, а также участвует в клеточной коммуникации.

В настоящее время появляется все больше и больше работ, выявляющих присутствие ЛК в глиальных клетках при определенных заболеваниях, и предполагается, что нарушение функций ЛК может способствовать нейродегенерации [1].

Наследственные спастические параплегии (НСП) – это наследственные нарушения, характеризующиеся моторно-сенсорной дегенерацией аксонов, слабостью нижних конечностей и спастичностью. Мутации в более чем 50 локусах могут вызывать НСП, а клеточные функции кодируемых белков демонстрируют удивительную гетерогенность.

Одну из форм НСП вызывают мутации в гене, кодирующем NTE, нейротоксичную эстеразу. У *Drosophila melanogaster* найден ортолог NTE – ген *swiss cheese* (*sws*). Функции данного гена на сегодняшний день еще до конца не изучены, но его участие в жизнедеятельности глиальных клеток и нейронов, а также то, что мутации и нокдаун *sws* приводят к нейродегенерации, показаны в нескольких работах [2, 3]. Т.к. белок SWS имеет функцию фосфолипазы В, расщепляя фосфотидилхолин на мембранах клетки и ЭПС, что дает возможность предположить, что он является активным участником липидного обмена.

Удобным модельным объектом для исследований является *Drosophila melanogaster*, имеющая аналоги глиальных клеток млекопитающих, сложно устроенную нервную систему, а также ортолог NTE – ген *sws*.

В данной работе были использованы линии *Drosophila melanogaster* с измененной экспрессией гена *sws* в нейронах и определенных типах глиальных клеток. Липидные капли в мозге *Drosophila melanogaster* были идентифицированы с помощью специфичного к нейтральным липидам

красителя – BODIPY^{493/503}. Максимальные изменения в количестве липидных капель наблюдаются у линии с нокаутом *sws* в нейронах.

1. Welte M.A. Expanding roles for lipid droplets // *Current biology*. – 2015. – V. 25. – No. 11. – P. R470–R481.
2. Ryabova E. *et al.* Swiss cheese, *Drosophila* ortholog of hereditary spastic paraplegia gene NTE, maintains neuromuscular junction development and microtubule Network // *Drosophila melanogaster: Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*. – 2018. – P. 209.
3. Kretzschmar D. *et al.* The swiss cheese mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* // *Journal of Neuroscience*. – 1997. – V. 17. – No. 19. – P. 7425–7432.

Исследование процесса деградации фиброина при растворении в ионных жидкостях

Сусанин А. И.¹, Сашина Е. С.¹, Новоселов Н. П.¹, Захаров В. В.^{2, 3, 4}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

drsusanin@yandex.ru

Фибриллярный белок фиброин – это основной структурный компонент шелкового волокна, состоящий из тяжелой (390 кДа) и легкой (25 кДа) цепей [1]. В отличие от легкой цепи, которая не содержит повторяющихся последовательностей, тяжелая цепь состоит из 12 доменов, содержащих повторяющийся пептидный мотив Gly-X, где X – аланин или серин, которые формируют «кристаллическую» β -структурную часть фиброина [2]. Эти домены соединяются между собой с помощью коротких линкеров, формирующих «аморфные» участки фиброина [3]. Высокое содержание «кристаллической» структуры делает фиброин устойчивым к растворению во многих традиционных растворителях. В последнее время в качестве растворителя фиброина предложено использовать ионные жидкости (ИЖ) [4].

При растворении «кристаллические» участки фиброина переходят в неупорядоченное состояние, в котором белок является более уязвимым к действию растворителей и температуры [5]. В результате происходит деградация фиброина, сопровождающаяся снижением молекулярной массы тяжелой цепи, что является одной из причин низких механических характеристик, получаемых на основе фиброина, материалов [6].

Данная работа посвящена изучению влияния природы ИЖ и температурно-временных параметров растворения фиброина на его молекулярную массу, которую оценивали методом электрофореза в градиентном ПААГ. Источником фиброина служил шелк тутового шелкопряда (отходы шелкопряда), в качестве ИЖ использовали ацетат и хлорид 1-бутил-3-метилимидазолия и хлорид 1-бутил-3-метилпиридиния.

В результате исследования было показано, что с ростом температуры и времени растворения фиброина в ИЖ усиливаются процессы деградации тяжелой и легкой цепей. Предложены оптимальные условия растворения фиброина, позволяющие сохранить тяжелую и легкую цепи в интактном состоянии.

1. Inoue S. *et al.* J. of Biol. Chem. and mol. biol. 275 (2000).
2. Ha S.W. *et al.* Biomacromolecules. 6, 5 (2005).
3. Zhou C.Z. *et al.* PROTEINS: Structure, Function, and Genetics. 44 (2001).
4. Phillips D.M. *et al.* J. Am. Chem. Soc. 126 (2004).
5. Aznar-Cervantes S.D. *et al.* Mat. Scien. and Engineering C 33, 4 (2013).
6. Susanin A.I. *et al.* Russ. J. App. Chem. 91, 7 (2018).

Исследование морфологии полиэлектролитных капсул с наноалмазами в составе оболочки методами просвечивающей электронной микроскопии

*Суфиянова А. Э., Юрина Д. Г., Атанова А. В.,
Трушина Д. Б., Хмеленин Д. Н., Бородина Т. Н.*

Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

На сегодняшний день актуальной задачей биомедицины является создание систем адресной доставки лекарственных компонентов с целью уменьшения нежелательного воздействия лекарственного препарата на здоровые ткани, а также защиты инкапсулированного вещества от окисления. Особое внимание привлекают полиэлектролитные многослойные капсулы, полученные методом поочередной адсорбции [1]. Включение различных типов наночастиц в полиэлектролитные оболочки является перспективным методом синтеза новых систем транспортировки лекарств с приданием им уникальных физико-химических свойств. К числу многообещающих материалов, применяемых в данной технологии, относят наноалмазы детонационного синтеза, которые характеризуются низкой токсичностью и высокой биосовместимостью [2]. Модификация полимерной оболочки микрокапсул наноалмазами позволяет обеспечить чувствительность к внешнему микроволновому воздействию, контролируемым образом изменяющему структуру и проницаемость оболочек таких капсул [3].

В работе были получены капсулы на основе биосовместимых полимеров поли-L-лизина и альгината натрия, оболочка которых модифицирована наноалмазами.

Визуализацию капсул проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа FEI Tecnai Osiris (200 кВ), оснащенного системой кремниевых детекторов SuperX EDS для сверхбыстрого элементного картирования, что при работе с полимерными образцами позволяет получать качественные карты распределения элементов без деградации материала и не требует специальной пробоподготовки образца.

Исследования показали, что капсулы имеют преимущественно сферическую форму, а их размер составляет 3-5 мкм. Оболочка капсул равномерно покрыта наночастицами алмаза размером до 5 нм.

Исследования проведены на оборудовании ЦКП ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения работ по государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

1. Т. Н. Бородина, Л. Д. Румш, С. М. Кунижев, Г. Б. Сухоруков, Г. Н. Ворожцов, Б. М. Фельдман, Е. А. Марквичева. Полиэлектролитные микрокапсулы как системы доставки биологически активных веществ. Биомедицинская химия, 53(5), 557–565 (2007).
2. A.M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. Schlager, E. Osawa, S. Hussain. Are diamond nanoparticles cytotoxic? // J. Phys. Chem. B. 2007. V. 111, No. 1. P. 2–7.
3. A.S. Timin, Hui Gao, D.V. Voronin, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov. Inorganic/Organic Multilayer Capsule Composition for Improved Functionality and External Triggering, 2016, 1600338.

Использование модифицированных флуоресцентными кластерами серебра молекул тРНК для внутриклеточной визуализации

Сыч Т. С.

*Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет,
кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров, Санкт-Петербург, Россия*

inxalid@gmail.com

Кластеры благородных металлов – особый сорт нанобъектов. Ввиду их малых размеров – порядка 10 атомов – их электронно-энергетическая структура становится похожа на молекулярную. И хотя кластеры золота характеризуются высокой химической стабильностью [1], для биологических применений более интересны кластеры серебра. Это связано с тем, что они обладают целым рядом преимуществ: высокий квантовый выход флуоресценции и сечения поглощения, а также хорошая биосовместимость.

тРНК – молекула, обеспечивающая физическую связь между матричной РНК (мРНК) и аминокислотной последовательностью белка. В отличие от ДНК [2], а также множества белков [3], тРНК ранее не использовалась в качестве стабилизирующей матрицы для синтеза флуоресцентных кластеров.

В данной работе были получены и охарактеризованы несколько спектральных типов кластеров, стабилизированных матрицей тРНК (лиофилизат из культуры пекарских дрожжей). Полученные результаты хорошо согласуются с предыдущими исследованиями в этой области [4] (тРНК из культуры Кишечной палочки). Полученные кластеры прошли стадии очистки и концентрирования (с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с люминесцентным детектором), после чего была произведена попытка инкорпорации меченых тРНК в клетки культуры пекарских дрожжей с целью их последующей внутриклеточной визуализации.

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 18-13-00603).

1. Chakraborty I., Pradeep T. Atomically Precise Clusters of Noble Metals: Emerging Link between Atoms and Nanoparticles // Chem. Rev., 2017, 117, 8208–8271.
2. Copp S.M. *et al.* Cluster Plasmonics: Dielectric and Shape Effects on DNA-Stabilized Silver Clusters // Nano Lett., 2016, 16 (6), 3594–3599.
3. Guo C., Irudayaraj J. Fluorescent Ag Clusters via a Protein-Directed Approach as a Hg(II) Ion Sensor // Anal. Chem., 2011, 83 (8), 2883–2889.
4. Syich T.S. *et al.* tRNA as stabilizing matrix for fluorescent silver clusters: photophysical properties and IR study // Nanoscale Adv., 2019, 1, 3579–3583.

Мультиплексный анализ факторов воспаления в сыворотке крови с применением метода MALDI-TOF-масс-спектрометрии

Тараскин А. С.^{1, 2}, Протасов А. В.^{1, 2}, Миргородская О. А.¹

¹ Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

taraskin_07@bk.ru

В настоящий момент существует порядка двухсот биомаркеров, потенциально представляющих интерес при диагностике системного воспаления и сепсиса [1]. Однако ни один из предлагаемых в качестве маркера воспалений белковый фактор не обладает необходимой надежностью, чтобы использовать его в качестве единого критерия молекулярной диагностики [2, 3].

В данной работе предложен подход, который делает MALDI-масс-спектрометрию подходящим инструментом для одновременной идентификации и количественного определения сразу нескольких белков острой фазы воспаления: альфа-2-макроглобулина (α2-МГ), альфа-2-HS-гликопротеина (фетуин А), сывороточного амилоида А (САА) и фибринопептида А, в сыворотках крови человека для диагностики системного воспаления и сепсиса с использованием малых объемов реагентов и образцов. В предлагаемом подходе показана возможность использования структурно-функциональных свойств анализируемых соединений при определении их концентрации, что позволяет исключить необходимость предварительного фракционирования образцов, то есть работать с цельной сывороткой крови. Для получения необходимого внутреннего стандарта была использована методика изотопного обмена. Отличительной особенностью методики является возможность получения одновременно нескольких параметров в едином технологическом решении (мультиплексность). Является существенным также и то, что количество материала (объем сыворотки крови), требуемого для анализа, составляет всего порядка 1 мкл. Такое количество материала можно получить, заменив отбор крови из локтевой вены, на отбор крови из пальца. Предлагаемая методика количественной оценки α2-МГ позволяет получить результаты в течение десятков минут, что является существенным преимуществом по сравнению со стандартными методами диагностики [4]. С помощью данного метода был измерен уровень исследуемых маркеров в сыворотках 19 пациентов стационара СПб ГБУЗ «Городская больница № 14» с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей в динамике лечения.

1. Sepsis // Diagnostic Methods and Protocols. – 2015. – P. 460.
2. Kelly B.J. *et al.* Combined biomarkers discriminate a low likelihood of bacterial infection among surgical intensive care unit patients with suspected sepsis //Diagnostic microbiology and infectious disease. – 2016. – V. 85. – No. 1. – P. 109–115.
3. Han J.H. *et al.* Use of a combination biomarker algorithm to identify medical intensive care unit patients with suspected sepsis at very low likelihood of bacterial infection // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2015. – C. AAC. 00958-15.
4. Протасов А. В. и др. Количественное определение ряда маркеров сыворотки крови без ее предварительного фракционирования с использованием особенностей взаимодействия трипсина с альфа-2-макроглобулином человека методом MALDI-MS // Научное приборостроение. – 2019. – Т. 29. – № 2.

Экспрессия Siah1 в коже ассоциирована с контролем пролиферации и дифференцировки кератиноцитов

Тверье Е. А., Соловьева Е. В., Усакин Л. А., Пантелеев А. А.

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

Е3 убиквитинлигаза Siah1 регулирует активность разнообразных белков, участвующих в контроле важных биологических процессов, таких как апоптоз [1], адаптация к гипоксии [2, 3], контроль клеточного цикла [4], пролиферация и миграция клеток [5]. Потенциальная роль этого белка в коже остается мало изученной.

Для изучения функций Siah1 была произведена оценка его экспрессии в коже и в культуре первичных кератиноцитов человека (НПК) с использованием иммунофлуоресценции и qRT-PCR. Для активации дифференцировки, клетки культивировались в среде с высоким Ca^{2+} (1,5мМ) или помещались в условия гипоксии, характерной для верхних (наиболее дифференцированных) слоев эпидермиса.

Иммунофлуоресцентное окрашивание кожи мышей и человека, показало, что Siah1 локализуется преимущественно в супрабазальных слоях эпидермиса и имеет сходный паттерн экспрессии с маркером дифференцировки кератином 10. Siah1 был также выявлен в некоторых клетках базального слоя, что позволяет предположить, его связь с контролем клеточной пролиферации. Кроме этого, Siah1 был обнаружен в волосяном фолликуле (вф) на стадиях анагена (стадия роста) и катагена (стадия регрессии), главным образом, в областях ORS (outer root sheath) и IRS (inner root sheath) и в матриксе фолликула. На стадии телогена (покоя вф) экспрессия Siah1 отсутствует. Результаты qRT-PCR образцов НПК мышинной кожи, показали изменения уровня экспрессии Siah1 в течении цикла вф и выявили максимум экспрессии в период перехода фолликула из стадии анагена в катаген.

В НПК уровень экспрессии Siah1 и маркеров дифференцировки (K1, K10, INV и FLG), увеличивался как при активации дифференцировки, так и при гипоксией (1 % O_2). При этом локализация Siah1 изменялась с ядерной (при 0,1мМ Ca^{2+}) на цитоплазматическую (1,5мМ Ca^{2+}). Подобное изменение паттерна экспрессии Siah1 наблюдалось и в ответ на гипоксию.

Эти результаты, позволяют предположить, что роль Siah1 в коже ассоциирована с контролем пролиферации и дифференцировки кератиноцитов.

Это исследование было поддержано внутренними грантами Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» и частично грантом РФФИ 19-015-00306.

1. Yuan F., Chen X., Liu J., Feng W., Wu X., Chen S.Y. Up-regulation of Siah1 by ethanol triggers apoptosis in neural crest cells through p38 MAPK-mediated activation of p53 signaling pathway, 2017; Archives of toxicology; 91 (2).
2. Jianfei Qi, Hyungsoo Kim, Marzia Scortegagna, Ze'ev A Ronai. Regulators and effectors of Siah ubiquitin ligases; 2013; Cell Biochem Biophysiks, 67(1).
3. Akiko Matsui-Hasumi, Yayoi Sato, Ayako Uto-Konomi, Satoshi Yamashita, Junji Uehori, Akihiko Yoshimura, Masakatsu Yamashita, Hiroshi Asahara, Shinobu Suzuki, Masato Kubo. E3 ubiquitin ligases SIAH1/2 regulate hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)-mediated Th17 cell differentiation; 2017; International Immunology, 29.
4. Reiko Ban, Hideki Matsuzaki, Tomohiro Akashi, Gyosuke Sakashita,, Hisaaki Taniguchi, Sam-Yong Park, Hirofumi Tanaka, Koichi Furukawa, Takeshi Urano. Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and Aurora mitotic kinases; 2009; The journal of biological chemistry; 284.
5. Deng Q., Hou J., Feng L., Lv A., Ke X., Liang H., Wang F., Zhang K., Chen K., Cui H. PHF19 promotes the proliferation, migration, and chemosensitivity of glioblastoma to doxorubicin through modulation of the SIAH1 / β -catenin axis; 2018; Cell death & disease; 9(11).

Особенности ИК-спектроскопии белков сыворотки крови больных множественной миеломой

Тельная Е. А.¹, Плотникова Л. В.¹, Гарифуллин А. Д.²,
Кувшинов А. Ю.², Волошин С. В.², Поляничко А. М.¹

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

² Российский научно-исследовательский институт гематологии
и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

serlina1624@gmail.com

Множественная миелома – онкогематологическое заболевание, сопровождающееся гиперпродукцией иммуноглобулинов определенного типа и понижением уровня сывороточного альбумина в крови. Иммуноглобулины и сывороточный альбумин – два наиболее многочисленных белка сыворотки крови. Их вторичная структура сильно различается. Иммуноглобулины состоят на 70 % из β -слоистых фрагментов, а сывороточный альбумин содержит 65 % α -спиральных участков. В рамках данной работы проведен сравнительный анализ содержания вторичных структур разного типа в образцах сыворотки крови больных множественной миеломой и здоровых доноров.

Для определения вторичной структуры использовали метод ИК-спектроскопии. Информацию о вторичной структуре белков можно получить, анализируя полосы Амид I. Сравнение исследуемых образцов проводили по содержанию в них α -спиральных и β -слоистых участков.

По результатам работы наблюдалось повышение содержания β -слоистых фрагментов на 6–9 %, и понижение содержания α -спиральных участков на 8–16 % в образцах сыворотки крови больных множественной миеломой, по сравнению со здоровыми донорами.

Авторы признательны за финансовую поддержку РФФИ (грант № 18-08-01500). Часть работ проводили с использованием оборудования Научного Парка СПбГУ: ресурсных центров «Оптические и лазерные методы исследования вещества» и «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники».

Разработка бифункциональных противоопухолевых препаратов – производных гидроксамовой кислоты

Толичева О. А.¹, Осипов В. Н.², Колотаев А. В.², Вартамян А. А.³,
Хоченков Д. А.³, Балаев А. Н.⁴, Трашков А. П.^{1, 5, 6},
Коневега А. Л.^{1, 5, 6}, Хачатрян Д. С.²

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

² *Институт химических реактивов и особо чистых химических веществ
НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

³ *Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина
Минздрава РФ, Москва, Россия*

⁴ *АО «Фарм-Синтез», Москва, Россия*

⁵ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия*

⁶ *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

Несмотря на развитие ранней диагностики злокачественных новообразований, техники и тактики оперативного удаления опухолей и их метастазов и увеличение количества противоопухолевых препаратов с различными механизмами действия, результаты терапии онкологических заболеваний в большинстве случаев остаются на неприемлемо низком уровне [1]. Основным методом лечения онкологических больных на сегодняшний день является химиотерапия. Синтез и поиск новых противоопухолевых агентов, направленных сразу на несколько мишеней, является перспективным направлением научных исследований. Объединение нескольких фармакофорных групп в одной молекуле позволяет получить более широкий и, возможно, принципиально новый спектр противоопухолевой активности и снизить вероятность возникновения лекарственной устойчивости у онкологических пациентов.

Гистондеацетилазы (HDACs) – группа ферментов, удаляющих ацетильные группы от гистонов и, таким образом, регулирующих экспрессию генов. Ингибиторы HDACs (HDACi) индуцируют гиперацетилирование гистонов, приводя к замедлению роста, повышению иммуногенности, дифференцировке и гибели опухолевых клеток [2, 3]. Также HDACi демонстрируют выраженный синергичный эффект при комбинировании с другими противоопухолевыми препаратами [4]. Среди применяемых в клинической практике HDACi широкое распространение получили производные гидроксамовой кислоты.

В данной работе были исследованы 57 синтезированных нами новых гибридных соединений гидроксамовой кислоты, содержащих фрагменты хинозалинового цикла – как потенциальных ингибиторов HDACs, так и

обладающие антиангиогенными свойствами. Были оценены: влияние на перекисное окисление липидов гомогената мозга крыс, способность хелатировать ионы металлов переменной валентности, влияние на ферментативную активность HDAC I и II классов, антиангиогенные и цитотоксические свойства. В результате анализа были сконструированы соединения с оптимизированной структурой, из которых после расширенных биологических испытаний будет выявлено наиболее активное соединение и подготовлено для дальнейших доклинических испытаний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-11-2018-172 от 03.12.18. Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62418X0051).

1. Трашков А. П. Влияние меглюмина акридонацетата на развитие экспериментальной аденокарциномы толстой кишки и опухоль-ассоциированных изменений системы крови у мышей линии BALB/c / А. П. Трашков, А. Л. Коваленко, Е. И. Дрогомирецкая, Я. Д. Бараков, М. Г. Хотин, А. А. Калатанова, А. А. Кравцова, Е. А. Пушкина, А. Г. Васильев // Патогенез. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 51–61.
2. West A.C., Johnstone R.W. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment // The Journal of clinical investigation. – 2014. – V. 124. – No. 1. – P. 30–39.
3. West A.C., Smyth M.J., Johnstone R.W. The anticancer effects of HDAC inhibitors require the immune system // Oncoimmunology. – 2014. – V. 3. – No. 1. – P. e27414.
4. Arrighetti N. Drug Combinations with HDAC Inhibitors in Antitumor Therapy. Crit. Rev. Oncog. – 2015. – IF 2.58.

Специфика транскрипции некоторых генов слюнных желез у мутантов *Chd1 Drosophila melanogaster*

Торощина А. В.*, Ильина Ю. А., Конев А. Ю.

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

*toroshchina_av@pnpi.nrcki.ru

Хроматин – структура, отвечающая за хранение наследственной информации, находящаяся в пределах ядерной оболочки эукариотических клеток. Большую часть хроматина составляет ДНК, которая плотно накручена на специальные органоиды – нуклеосомы, состоящие, в свою очередь, из гистоновых белков. Для правильного прохождения транскрипции и дальнейшей экспрессии генов необходимо освободить нить ДНК от нуклеосом. За их перемещения, помимо прочих, отвечают АТФ – зависимые факторы ремоделирования хроматина, одним из которых является фактор CHD1. Впервые *in vivo* участие в сборке хроматина АТФ-зависимых факторов было показано для белка CHD1 [1].

CHD1 (хромодоменсодержащая ДНК- связывающая геликаза) – это консервативная SNF2-подобная АТФ-аза. У человека есть 2 гомолога CHD: CHD1 и CHD2, и тот, и другой являются онкогенами. Как сверхпродукция белка CHD1, так и гомозиготные делеции гена *Chd1* являются причиной некоторых типов онкологии простаты [2], что делает белок CHD1 возможной терапевтической мишенью. В геноме дрозофилы был найден всего один ген *Chd1*. Отсутствие или дисфункция белка CHD1 провоцирует нарушение сборки хроматина в мужском пронуклеусе и, как следствие - нежизнеспособность эмбрионов дрозофилы. Известно, что CHD1 необходим для включения вариантного гистона H3.3 в репликативно-независимой сборке хроматина [1]. CHD1 принимает участие в регуляции транскрипции, в политенных хромосомах он колокализуется с элонгирующей формой РНК полимеразы II, необходим при работе РНК полимеразы I [3].

Ранее в нашей лаборатории было показано, что сверхпродукция нативной и каталитически неактивной форм белка CHD1 вызывает серьезную деформацию политенных хромосом в слюнных железах дрозофилы. На первом этапе были исследованы гены из пуфированного района 3C: *Sgs4*, *ng2* и *Pig1*.

В данной работе мы исследовали влияние сверхэкспрессии *Chd1* в его нативной, доминант-негативной форме и у нуль-мутанта на транскрипцию генов из участков с дефектами пуффирования политенных хромосом слюнных желез дрозофилы.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (№ гранта 20-04-00864 А).

1. Konev A.Y., M. Tribus S.Y., Park V., Podhraski C.Y. *et al.* CHD1 motor protein is required for deposition of histone variant H3.3 into chromatin *in vivo*. *Science*. 2007. V. 317(5841). P. 1087–1090.
2. Rodrigues L.U., Rider L., Nieto C., Romero L. *et al.* Coordinate loss of MAP3K7 and CHD1 promotes aggressive prostate cancer. *Cancer Res*. 2015. V. 15, 75(6). P. 1021–34.
3. McDaniel I.E., Lee J.M., Berger M.S., Hanagami C.K., Armstrong J.A. Investigation of CHD1 function in transcription and development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2008. V. 178(1). P. 583–587.

Активность кальпаинов при детерминированном нарушении дофаминергической передачи

Трактиров Д. С.¹, Пестерева Н. С.²

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

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

mr.hobdob@gmail.com

Кальцийзависимая кальпаиновая система является глобальной протеолитической машинерией, представленной как в отделах ЦНС, так и на периферии. В ЦНС наиболее изученными являются кальпаин-2 и кальпаин-1, чья функциональная активность приводит к неполному расщеплению субстратов, среди которых протеинкиназа С, различные сигнальные молекулы, факторы транскрипции (например, c-fos, c-jun, ядерный фактор -кВ (NFκB), белки цитоскелета (талин, фодрин), многочисленные молекулы адгезии. Гиперактивация кальпаиновой системы считается маркером нейродегенеративного процесса, что было показано для болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза. Одним из факторов, приводящих к нарушениям работы кальпаиновой системы, является увеличение концентрации внутриклеточного кальция. Повышенный уровень кальция обуславливает интенсификацию транспорта синаптических везикул и, как следствие, высвобождение нейромедиаторов в синаптическую щель, в частности, дофамина.

Целью данной работы являлось изучение активности кальпаинов 1 и 2 при повышенном уровне внеклеточного дофамина. Для этого в качестве экспериментальной группы были использованы пять самцов крыс с нокаутом гена, кодирующего белок обратного захвата дофамина (DAT). В результате данной мутации у таких животных дофамин накапливается во внеклеточной среде в больших количествах, что сопровождается повышением содержания метаболитов дофамина.

Для сравнения ферментативной активности кальпаинов мутантных и контрольных крыс использовался метод казеиновой зимографии в геле. При помощи данного метода было показано увеличение активности обеих форм кальпаина (1, 2) в таких структурах мозга, как гиппокамп и стриатум. Можно предположить, что повышенный уровень внеклеточного дофамина является дополнительным фактором, активирующим кальпаиновую систему, а значит, косвенным проапоптотическим фактором.

1. Wang K.K.W. Calpain zymography: General methodology and protocol // *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., 2017. V. 1626. P. 279–285.
2. Goll D.E. *et al.* The calpain system // *Physiological Reviews*. American Physiological Society, 2003. V. 83, No. 3. P. 731–801.
3. Łopatniuk P., Witkowski J.M. Conventional calpains and programmed cell death // *Acta Biochimica Polonica*. 2011. V. 58, No. 3. P. 287–296.

Индукцируемые фотодинамической терапией иммуногенные пути клеточной гибели опухолевых клеток

Турубанова В. Д.^{1,2}, Балалаева И.¹, Альзеибак Р.¹, Пескова Н.¹,
Митрошина Е.¹, Мищенко Т.¹, Ведунова М.¹, Крысько Д.^{1, 2}

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

² Гентский университет, кафедра анатомии и регенерации человека,
лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT), Гент, Бельгия

Успех лечения рака увеличивается в случае, если терапия вызывает иммуногенную гибель клеток (ICD) [Mishenko, 2019]. ICD характеризуется выбросом молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP), что приводит к индукции сильных противоопухолевых иммунных реакций. Следовательно, при разработке новых стратегий лечения рака крайне важно выбрать такие терапевтические методы, которые индуцировали бы ICD и, позволяли бы активировать противоопухолевый иммунный ответ, приводящий к наиболее полному разрушению раковых клеток [Angeli, 2019].

Целью данной работы является анализ способности широко используемых в клинической практике фотосенсибилизаторов индуцировать все характеристики иммуногенной клеточной смерти. Важной задачей является подбор условий ФДТ на клетки, которые приводили бы к ICD.

Гибель клеток глиомы линии GL261 и фибросаркомы MCA205 была вызвана фотодинамическим воздействием при действии Фотосенса(ФС) или Фотодитазина (ФД). После ФДТ клетки культивировали в течение 24 часов и гибель клеток анализировали с помощью МТТ или проточной цитометрией. Мы демонстрируем, что ФС локализуется в лизосомах, и гибель клеток идет по смешанному пути апоптоза и ферроптоза. Напротив, ФД накапливается в ЭПР и аппарате Гольджи, и гибель клеток, вызванная ФД-ФДТ, ингибировалась только ингибитором апоптоза. Нами показано, что умирающие клетки GL261 и MCA205 эффективно поглощаются дендритными клетками костного мозга, и вызывают их созревание и активацию. Помимо этого, клетки, гибнущие при фотодинамическом воздействии, вызывают секрецию IL-6, что подтверждает иммуногенный характер смерти клеток.

Проведен анализ иммуногенности *in vivo* [Aaes, 2016] и показана способность умирающих раковых клеток индуцировать защитный противоопухолевый иммунный ответ после вакцинации мышей.

В целом, эти результаты идентифицируют фотосенс и фотодитазин как новые индукторы иммуногенной гибели клеток, которые можно эффективно использовать в комбинации с ФДТ в терапии рака.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-15-00279).

1. T.A. Mishchenko, V.D. Turubanova, E.V. Mitroshina *et al.* Effect of novel porphyrazine photosensitizers on normal and tumor brain cells // J. Biophotonics, 2019.
2. J.P.F. Angeli, D.V. Krysko, M. Conrad. Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion // Nature Reviews Cancer, 2019.
3. T.L. Aaes, A. Kaczmarek *et al.* Vaccination with necroptotic cancer cells induces efficient anti-tumor immunity // Cell reports, 2016.

Маркеры старения в дермальных фибробластах человека, полученных от пациентов с наследственными опухолевыми синдромами

Ушаков Р. Е.¹, Ноздрачёва А. В.¹, Куранова М. Л.²

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

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Около 10 % случаев онкологических заболеваний обусловлены наследственной предрасположенностью, выявлено более 50 наследственных опухолевых синдромов [1]. Среди женщин самым распространенным является рак молочной железы [2]. 5–10 % пациенток с раком молочной железы имеют мутацию в гене *BRCA1*, частота патогенных мутаций в *BRCA1* может составлять 1:500 – 1:1000 [3]. Вероятность возникновения злокачественных опухолей в молочных железах возрастает при мутации в гене *ATM*, в том числе и при гетерозиготном носительстве, встречающемся у 1-2 % населения [4].

Клеточное старение (сенесценция) представляет собой необратимый арест клеточного цикла в ответ на укорочение теломер и на действие различных стрессоров (на повреждение ДНК активными формами кислорода, ионизирующим излучением, на экспрессию онкогенно). Однако сенесцентные клетки выделяют целый ряд сигнальных молекул, обладающих в том числе провоспалительным действием, при этом с возрастом происходит накопление сенесцентных клеток в организме и секретируемые ими факторы способствуют сенесценции пролиферативно активных клеток, развитию воспалений и возникновению злокачественных опухолей [5].

Исследованные на распределение некоторых маркеров старения дермальные фибробласты, полученные от пациентов с наследственной предрасположенностью к опухолеобразованию (от носительницы мутации в гене *BRCA1*, имеющей случаи рака молочной железы в семейном анамнезе, и, предположительно, от гетерозиготной носительницы мутации в гене *ATM*), демонстрируют накопление ассоциированной со старением бета-галактозидазы. В клетках линии с мутацией в гене *BRCA1* наблюдается повышение интенсивности флуоресценции гетерохроматинового белка HP1γ по сравнению с контрольными линиями. Повышенная экспрессия HP1γ связана с образованием ассоциированных со старением гетерохроматиновых фокусов в клетках доброкачественной опухоли, пытающихся избежать злокачественной трансформации путем запуска клеточного старения [6].

Работа поддержана Грантом Президента РФ МК-3638.2019.7.

1. The Genetics of Cancer. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/>. 09.05.2019
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2018. 68: 394–424.
3. Apostolou P., Fostira F. Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *BioMed Research International*. 2013. 2013:747318.
4. Jerzak K.J., Mancuso T., Eisen A. Ataxia-teleangiectasia gene (ATM) mutation heterozygosity in breast cancer: a narrative review. *Current Oncology*. 2018 Apr. 25(2):176–180.
5. Campisi J. Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer*. 2003. May 3(5): 339–49.
6. Collado M., Gil J., Efeyan A., Guerra C., Schuhmacher A.J., Barradas M., Benguria A., Zaballos A., Flores J.M., Barbacid M., Beach D., Serrano M. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005 Aug 4. 436(7051):64.

Структурно-функциональный анализ димера L14-RsfS из *Staphylococcus aureus*

Харрасов Д. Р.¹, Валиуллин Э. Э.¹, Фатхуллин Б. Ф.^{1, 2}, Исламов Д. Р.¹,
Нуруллина Л. И.¹, Гараева Н. С.¹, Усачев К. С.¹, Юсупов М. М.^{1, 3}, Валидов Ш. З.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Институт белка РАН, Пущино, Россия

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

danisharrasov@gmail.com

Клетки расходуют до 40 % общей энергии на синтез белка, поэтому регуляция этого процесса крайне важна для живых организмов. В условиях голодания или других стрессов белки гибернации и сайленсинга приостанавливают работу рибосом, сохраняя их в виде отдельных субъединиц 30s и 50S, и в виде димеров 100S. Рибосомы в комплексе с гибернационными белками не чувствительны к атаке антибиотиков, что может быть основой неспецифической устойчивости к антибиотикам.

Фактор сайленсинга рибосомы RsfS обнаружен у множества бактерий, а также в органеллах клеток эукариот в митохондриях и пластидах. Экспрессия RsfS в бактериях происходит в условиях перехода из логарифмической фазы роста в стационарную фазу роста, а также при смене питательной среды с богатой на бедную. RsfS соединяется с консервативным белком рибосомы – L14 во время сайленсинга рибосом, блокируя образование функционального активного комплекса S70. Таким образом RsfS играет важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов, в частности такого патогенного организма как *Staphylococcus aureus*.

В рамках данной работы были клонированы гены l14 и rsfS из *S. aureus*, которые выделялись в виде гетеродимера L14-RsfS при гетерологичной экспрессии в *E. coli*. Данный димер был очищен, кристаллизован, после чего методом рентгеноструктурного анализа была получена структура этого комплекса с разрешением 2.3 Å. Поскольку структура L14-RsfS была идентична таковой при взаимодействии RsfS и 50S субъединицы рибосомы, мы использовали гетеродимер для определения аминокислотных остатков необходимых для его формирования как в белке L14, так и в RsfS. Поскольку гистидиновый таг содержится только на белке L14 (L14-his), совместное выделение двух белков с помощью аффинной хроматографии свидетельствует об их прочном соединении, как это происходит в L14^{wt}-RsfS^{wt}. Проведя сайт-направленный мутагенез мы заменили аминокислоты, которые были критичны для формирования гетеродимера L14 и RsfS и показали, что замена

аминокислот E70A Y98A, W77E – в RsfS и R107A, L117E, R97A, K113A – в L14, является критичной для димеризации.

1. Roman Hauser, Markus Pech, Jaroslaw Kijek *et al.* RsfA (Ybea) Protein Are Conserved Ribosome Silencing Factor. PLoS Genetics, 2012.
2. X. Li, Q. Sun, C. Jiang, K. Yang, L.W. Hung, J. Zhang, J.C. Sacchettini. Structure of Ribosomal Silencing Factor Bound to Mycobacterium tuberculosis Ribosome. Structure. 2015; 23: 2387–2405.
3. T. Prossliner, K. Skovbo Winther, M.A. Sorensen, K. Gerdes. Ribosome Hibernation. Annu Rev Genet 2018; 52: 321–348.

Поиск новых путей получения радионуклидов ^{149}Tb и ^{152}Tb

Хоменко И. А.^{1, 2}, Алиев Р. А.¹, Моисеева А. Н.¹

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

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский
университет), Долгопрудный, Россия

homenko.ia@phystech.edu

В настоящее время ядерная медицина активно развивается благодаря улучшению диагностического и терапевтического оборудования, а также разработке новых радиофармацевтических препаратов (РФП) [1]. Однако частым ограничением на использование перспективных для медицины радиоизотопов становится отсутствие доступных путей их производства, поэтому одной из главных задач до сих пор является исследование и поиск подходящих способов получения.

Радионуклиды ^{149}Tb и ^{152}Tb интересны для использования в так называемой тераностике: терапии, совмещенной с диагностикой. Помимо испускания альфа-частиц, пригодных для терапии, ^{149}Tb при распаде также испускает гамма-кванты и позитроны [2]. ^{152}Tb испускает позитроны и обладает оптимальным периодом полураспада в 17,5 часов, что позволяет рассматривать его в качестве претендента на использование в ПЭТ.

На данный момент хорошо исследованы три способа получения ^{149}Tb и ^{152}Tb : по реакции под действием тяжелых частиц на мишенях из Nd, где недостатком являются низкие значения выходов [3]; реакции под действием легких частиц на Gd, обладающие более высокими значениями сечений, но требующие энергий налетающих частиц около 100 МэВ [4]; реакции скалывания на танталовой мишени при облучении протонами с энергией 1,4 ГэВ [5], однако установки с такими возможностями малодоступны. В качестве нового способа было рассмотрено получение изотопов тербия путем облучения мишеней из Eu альфа-частицами с энергией 63 МэВ.

В рамках проделанной работы при помощи гамма- и альфа-спектрометрических приборов были рассчитаны активности соответствующих изотопов. Далее определены сечения реакций их образования и выходы ^{149}Tb и ^{152}Tb . Результаты исследования показали перспективность использования предложенного метода.

1. Budinger T.F., Jones T. History of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. In: *Comprehensive Biomedical Physics*. Elsevier (2014).
2. Müller C., Reber J., Haller S., Dorrer H., Köster U., Johnston K., Zhernosekov K., Türlér A., Schibli R.: Folate Receptor Targeted Alpha-Therapy Using Terbium-149. *Pharmaceuticals*. 7, 353 (2014).
3. Qaim S.M., Scholten B., Neumaier B. New developments in the production of theranostic pairs of radionuclides. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 318, 1493 (2018).
4. Beyer G.J., Čomor J.J., Daković M., Soloviev D., Tamburella C., Hagebø E., Allan B., Dmitriev S.N., Zaitseva N.G. Production routes of the alpha emitting ^{149}Tb for medical application. *Radiochim. Acta*. 90, 247 (2002).
5. Allen B.J., Goozee G., Sarkar S., Beyer G., Morel C., Byrne A.P. Production of terbium-152 by heavy ion reactions and proton induced spallation. *Appl. Radiat. Isot.* 54, 53 (2001).

Депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа 5xFAD-мышей

Хунагов Т. А.^{1, 2}, Скобелева К. В.¹, Казначеева Е. В.¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

Болезнь Альцгеймера (НБА) нейродегенеративное заболевание, характеризующееся ранним началом (45-60 лет) [1]. Большинство мутаций при НБА обнаружено в генах *PSEN1* и *APP*, которые кодируют белки пресенилин-1 (PS1) и белок – предшественник амилоида (APP). Мутации в этих генах приводят к накоплению в мозге амилоидных бляшек. Наряду с отложением амилоида при НБА наблюдается нарушение кальциевого гомеостаза. Кальциевый гомеостаз поддерживается многими системами в клетке, в том числе депо-управляемым входом кальция. Депо-управляемые кальциевые каналы активируются в ответ на опустошение внутриклеточных кальциевых депо эндоплазматического ретикулума (ЭР). При падении концентрации кальция в ЭР кальциевые сенсоры S1TM перемещаются к плазматической мембране и активируют депо-управляемые кальциевые каналы (Orai, TRPC). Депо-управляемые каналы принимают участие в регуляции синаптической пластичности, высвобождении нейромедиаторов и экспрессии генов [2]. Цель данной работы – исследовать депо-управляемый вход кальция в нейронах, моделирующих НБА.

В работе были использованы мыши 5xFAD и контрольные животные. Нейроны трансгенных мышей 5xFAD несут вставку с генами *PSEN1* и *APP* с пятью ассоциированными с НБА мутациями [3]. В клеточных лизатах, приготовленных из гиппокампа шестимесечных мышей, с помощью иммуноблоттинга анализировали уровни экспрессии генов белков, участвующих в депо-управляемом входе кальция. Депо-управляемый вход кальция в культуре нейронов гиппокампа исследовали флуоресцентным зондом Fura2-AM.

Было обнаружено, что в нейронах 5xFAD-мышей увеличен депо-управляемый вход кальция. При этом уровни белков, участвующих в депо-управляемом входе кальция (Orai1, Orai3, Stim1, Stim2), в лизатах гиппокампов не различались. Вероятно, увеличение депо-управляемого входа кальция в нейронах 5xFAD-мышей связано с изменением регуляции активности каналов.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-54-80006 и программой Президиума РАН № 19 «Современные проблемы высокотехнологичной медицины».

1. Cacace R., Sleegers K., Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited // *Alzheimer's and Dementia*. Elsevier Inc., 2016. V. 12, No. 6. P. 733–748.
2. Moccia F. *et al.* Stim and Orai proteins in neuronal Ca²⁺ signaling and excitability // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. V. 9, No. April. P. 153.
3. Oakley H. *et al.* Intraneuronal beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation // *J. Neurosci.* 2006. V. 26, No. 40. P. 10129–10140.

Оптимизация условий подготовки ультратонких клеточных срезов для криогенной электронной томографии методом фокусированного ионного пучка

Чесноков Ю. М.^{1, 2}, Камышинский Р. А.^{1, 2}, Орехов А. С.^{1, 2}

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

² Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

chessyura@yandex.ru

Развитие криогенной просвечивающей электронной микроскопии привело к «революции разрешения», что позволило исследовать крупные биологические макромолекулы с околоатомным разрешением без необходимости их кристаллизации [1]. Не менее важной задачей является получение информации о взаимном расположении различных макромолекул в клетках в процессе их жизнедеятельности. Применение методов криогенной электронной томографии с последующей реконструкцией позволяет получить трехмерную информацию о строении объекта с разрешением несколько нм [2], при этом условие прозрачности для электронов накладывает ограничение на толщину образца, которая не должна превышать 300 нм. Применение метода травления фокусированным ионным пучком при криогенных условиях позволяет получить тонкие срезы витрифицированных клеток в состоянии, близком к нативному. Томографические исследования и последующая обработка данных позволила получить контекстуальную трехмерную информацию о взаимном расположении различных макромолекул и их трехмерную реконструкцию с разрешением выше 2 нм [3]. Однако, при приготовлении образцов при криогенных температурах возникает множество технических сложностей и весь процесс требует существенной оптимизации.

В качестве тестовых объектов исследования были использованы как прокариоты – бактерии *Escherichia coli*, так и эукариоты – дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Содержащий клетки раствор подвергался витрификации в установке Vitrobot Mark IV (ThermoFisher Scientific, US). Ионное травление проводилось с помощью двухлучевого электронно-ионного микроскопа Versa 3D (ThermoFisher Scientific, US), оборудованного газоинжекторной системой напыления Pt и криогенной приставкой Quorum PP3010 (Quorum Technologies Ltd, UK). Для проведения томографических исследований использовался криогенный просвечивающий электронный микроскоп Titan Krios 60-300 (ThermoFisher Scientific, US).

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (№ 1360).

1. Werner Kühlbrandt, The Resolution Revolution, *Science*: V. 343, Issue 6178, pp. 1443–1444.
2. Irobalieva R.N., Martins B., Medalia O. Cellular structural biology as revealed by cryo-electron tomography. *J Cell Sci.* 2016 Feb 1; 129(3):469-76.
3. Schaffer M., Pfeffer S., Mahamid J., Kleindiek S., Laugks T., Albert S., Engel B.D., Rummel A., Smith A.J., Baumeister W., Plitzko J.M. A cryo-FIB lift-out technique enables molecular-resolution cryo-ET within native *Caenorhabditis elegans* tissue. *Nat Methods*. 2019 Aug; 16(8):757–762.

Результаты селекции аммонификаторов, выделенных из пресноводных экосистем для целей биоремедиации

Сидорова Н. А., Чечкова Н. А.

Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

Оптимизация процессов биоремедиации считается востребованной применительно к природоохранным мероприятиям [1]. Для северо-западного характерно накопление в природных экосистемах азотсодержащего органического загрязнения (АОЗ), которое образуются в процессе восстановления нитритов и нитратов сероводородом или гумусовыми веществами или при разложении белковых соединений, вносимых со сточными водами [2]. Сброс органических видов загрязняющих веществ составляет порядка 2 %, их влияние негативно отражается на источниках питьевого водоснабжения [3]. Для предотвращения накопления АОЗ в экосистемах целесообразно использовать технологии биоремедиации, основанные на ферментативной активности особой эколого-трофической группы бактерий – аммонификаторов.

Для проведения микробиологического анализа пробы воды (15 мл) отбирали с акватории Кондопожской губы Онежского озера с 5 станций. В лабораторных условиях 0,1 мл воды засеивали на среды, содержащие гидролизаты аминокислот или пептона в качестве единственного источника углерода, азота и энергии. Разнообразие выделенных штаммов оценивали по комплексу культуральных, тинкториальных, физиологических и биохимических признаков. Для определения активности геминовой каталазы бактерий определяли количество пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом. Определение численности проводили согласно «Методам изучения водных микроорганизмов» [4]. Работы по культивированию бактерий выполняли в термостате ТСО-200 СПУ при температуре 37 °С.

В работе представлены результаты селекции микроорганизмов, участвующих в процессах аммонификации в природных водоемах. Изучена метаболическая активность 10 изолированных штаммов, выделенных в чистую культуру из микрофлоры воды Кондопожской губы Онежского озера. Доказано, что сообщество бактерий, способных к дезаминированию аминокислот в природных водах, состоит из множества видов, которые незначительно отличаются по своей способности использовать различные органические соединения.

1. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года (утв. Правительством РФ 24.04.2012 N 1853п-П8).
2. Яковлев С. В., Прозоров Н. В., Иванов Е. Н., Губий И. Г. Рациональное использование водных ресурсов: учеб. для вузов по спец. «Водоснабжение, канализация, рац. использ. и охрана водных ресурсов». М.: Высш. шк., 1991. 400 с.
3. Громцев А. Н., Кузнецов О. Л., Шкиперова Г. Т. Государственный доклад о состоянии окружающей среды Республики Карелия в 2017 г. / Министерство природных ресурсов и экологии Республики Карелия. Петрозаводск, 2018. 292 с.
4. Кузнецов С. И., Дубинина Г. А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 285 с.

Синтез люминесцирующих серебряных кластеров из наночастиц серебра с помощью белков, пептидов и аминокислот

Чуйко Я. В., Ревезук З. В., Капитонова М. А., Кононов А. И.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

st063378@student.spbu.ru

За два последних десятилетия нанокластеры на основе благородных металлов привлекают все больше внимания. Для их создания часто используются биополимерные белковые матрицы. Области возможного применения люминесцирующих нанокластеров различны и многочисленны: сенсоры для ионов ртути и низкомолекулярных веществ, биомиджинг и селективная детекция определенных биомолекул [1]. По сравнению с другими подобными объектами металлические нанокластеры просты в синтезе, имеют высокий квантовый выход и фотостабильны. Люминесцентные метки на основе белковых молекул хорошо совместимы с живыми системами, также биополимерные матрицы обеспечивают протекцию металлических кластеров от агрессивной среды [2]. По своим физико-химическим свойствам нанокластер занимает промежуточное положение между молекулой и наночастицей (НЧ).

Механизм формирования люминесцирующих кластеров серебра на белковых матрицах до сих пор остается предметом споров. Традиционный способ их получения заключается в восстановлении ионов серебра, которые предварительно связались с матрицей. Нами был опробован другой подход – травление наночастиц серебра [3].

Синтез сферических НЧ серебра проводили на ледяной бане путем восстановления ионов серебра борогидридом натрия [4]. Далее растворы наночастиц и биомолекул (бычий сывороточный альбумин – БСА, инсулин, лизоцим и глутатион) перемешивались в равных объемах и хранились при 37 °С. Измерения спектров поглощения и люминесценции проводились в течение месяца. Изменения в спектре поглощения наночастиц были зафиксированы уже на следующие сутки эксперимента. Через семь дней после запуска процесса этчинга изменения в спектрах прекращались.

БСА и лизоцим через 7 дней полностью растворили серебряные НЧ. На БСА были обнаружены люминесцирующие кластеры серебра с максимумами возбуждения/испускания на 390/460 нм. Наличие инсулина слабо отразилось на наночастицах. Лизоцим растворил НЧ, однако люминесцирующих кластеров не образовалось. В растворе глутатиона и наночастиц образуются темновые кластеры с максимумом поглощения на 360 нм.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 16-13-10090.

1. Juewen L. *et al.* Trends in Analytical Chemistry, 58, 99–111 (2014).
2. Sych T. *et al.* Phys. Chem. C, 122, 51, 29549–29558 (2018).
3. Guével X. *et al.* Nano Res. 2012, 5(6): 379–387 (2014).
4. Larmour I.A. *et al.* J. of Raman Spectroscopy, 43(2):202–206 (2012).

Миграция клеток из тела многоклеточного сфероиды на различных подложках

Шабалина Е. Ю., Сорова Е. Ю., Петерсен Е. В.

Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

evgenyashb@mail.ru

Двумерные (2D) клеточные модели – это несложный и эффективный метод исследования реакций клеток на внешние раздражители, но все чаще речь идет о его недостатках. В работе с двумерной культурой клеток нет фактора трехмерного окружения клеток, естественного для почти всех клеток в организме. Как итог, результаты 2D тесты на клеточных культурах не описывают в полной мере ситуацию *in vivo*. [1–4] Тем предпочтительней 3D-модели. До сих пор не определены четкие критерии оценки эффективности функционирования клеток в 3D-окружении, позволяющие проводить скрининг 3D культур.

Миграция – одна из характеристик опухолевых клеток. Целью данной работы было изучение миграции клеток на различных подложках. Сфероиды, полученные методом микромолдов из клеточной линии A549 (карцинома легкого) высаживались на культуральный пластик и коллагеновый гель концентрацией 1 мг/мл. Наблюдение проводилось в течение 36 часов. Для отслеживания уровня метаболизма клеток проводилось окрашивание резазурином.

Скорость миграции клеток из тел сфероидов, одиночных на подложке, достоверно не различима вплоть до 8 часов. Спустя 36 часов с момента посадки увеличение радиуса сфероиды относительно его первоначального значения на пластике достигло 145 %. Для коллагена это значение составляет 117 %.

В случае высадки на подложку пары сфероидов скорость миграции клеток из тела сфероидов на коллагене значительно превышает скорость на пластике – 31 % (4 ч) и 43 % (6 ч) против 4 % и 9 % соответственно. В течение эксперимента значения для коллагена и пластика статистически различимы. Окрашивание резазурином показало, что пик активности метаболизма клеток пришелся на 24 часа.

Таким образом, на миграцию клеток из тела сфероиды влияет как подложка, так и наличие рядом других сфероидов. В дальнейшем планируется в качестве подложки протестировать децеллюляризованный стерильный крысиный матрикс.

1. Birgersdotter A., Sandberg R., Ernberg I. Gene expression perturbation *in vitro* – a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol* 2005; 15:405–412.
2. Weaver V.M., Petersen O.W., Wang F. *et al.* Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and *in vivo* by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 1997; 137:231–245.
3. Bhadriraju K., Chen C.S. Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discov Today* 2002; 7:612–620.
4. Baharvand H., Hashemi S.M., Kazemi Ashtiani S., Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems *in vitro*. *Int J Dev Biol* 2006; 50:645–652.

Молекулярное склеивание олигонуклеотидов ионами серебра

Шалыгин В. Е., Рамазанов Р. Р., Соколов П. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

shalygin.ve@mail.ru

Структурная организация макромолекул нуклеиновых кислот, основанная на гибридизации некомплементарных оснований с помощью ионов металлов, привлекает большое внимание исследователей [1]. Было показано [2], что ионы серебра(I) формируют цитозиновые димеры. Это свойство используется для разработки многих функциональных систем, таких как конформационные переключатели [3] и нанопровода [4]. Тем не менее, на данный момент экспериментальные условия и фундаментальные механизмы самосборки цитозинов, направленной ионами серебра(I), недостаточно изучены. Для исследования данного явления нами была предложена и исследована система, состоящая из двуцепочечных олигонуклеотидов с липкими концами, состоящими из разного количества цитозинов.

Контроль сшивки липких концов в присутствии ионов серебра производился при помощи атомно-силовой и электронной микроскопии, электрофореза, спектрофотометрии и метода динамического рассеяния света.

Так же в данной работе были подобраны условия модификации золотых наночастиц липкими цитозиновыми концами. Далее исследовались условия агрегации таких наночастиц, вызванной склеиванием их цитозиновых оболочек ионами серебра(I). В качестве варьируемых параметров были рассмотрены количество ионов серебра на пару цитозин-цитозин, число цитозинов в липком хвосте, pH, ионная сила и температура. Помимо этого были изучены альтернативные пути агрегации наночастиц.

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» и «Нанотехнологии».

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-73-00113.

1. Ki Soo Park and Hyun Gyu Park. Technological applications arising from the interactions of DNA bases with metal ions. *Current Opinion in Biotechnology*, 28:17–24 (2014).
2. Akira Ono and Yoko Miyake. Highly selective binding of metal ions to thymine-thymine and cytosine-cytosine base pairs in DNA duplexes. Oxford University Press *Nucleic Acids Research Supplement* No. 3. 227–228 (2003).
3. Yongxiang Wang *et al.* Silver Ions-Mediated Conformational Switch: Facile Design of Structure-Controllable Nucleic Acid Probes *Anal. Chem.* 82, 6607–6612 (2014).
4. Jiro Kondo *et al.* Metallo-DNA nanowire with uninterrupted one-dimensional silver array. *Nature Chemistry* 9, 956–960 (2017).

Анализ тканеспецифичности экспрессии гена *swiss cheese Drosophila melanogaster*

Шарапенков Э. Г.^{1, 2}, Рябова Е. В.², Мелентьев П. А.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

sharapenkov_eg@pnpi.nrcki.ru

Ген *swiss cheese (sws) Drosophila melanogaster* является эволюционно-консервативным и участвует в контроле поддержания жизнедеятельности клеток нервной системы [1]. Нарушение функции ортолога *sws* – гена *NTE* человека, вызывает развитие различных нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся синдромами спастичности и атаксии [2].

Роль *sws* в нормальном функционировании нервной системы впервые была отмечена в последней четверти прошлого века [3]. С тех пор выполнено множество работ, в которых показано, какие эффекты вызывает подавление функции *sws* в различных типах клеток нервной системы. Особая значимость этого гена отмечена в работе глиальных клеток [4]. Однако до сих пор мало исследованными остаются иные потенциально возможные функции *sws* в других тканях и органах *Dr. melanogaster*. Для их изучения, в первую очередь, необходимо понять, в каких тканях наблюдается экспрессия данного гена.

В работе использована трансгенная линия мух с экспрессией GFP в мембране клеток, в которых активен промотор гена *sws*. Проанализированы яйца, личинки, куколки и отдельные органы имаго. В результате показано, что экспрессия *sws* в различных органах не одинакова и может меняться с возрастом. Более того, в пределах одного органа разные группы клеток демонстрируют различную экспрессию. Также обнаружена высокая экспрессия данного гена в репродуктивных органах самцов в отличие от самок, что может говорить о специфической функции. Таким образом, ген *sws* может быть важен для функционирования не только клеток нервной системы, но и других тканей и органов.

1. Kretzschmar D. *et al.* The *swiss cheese* mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* // Journal of Neuroscience. – 1997. – V. 17. – No. 19. – P. 7425–7432.
2. Knoch S. *et al.* Mutations in PNPLA6 are linked to photoreceptor degeneration and various forms of childhood blindness // Nature communications. – 2015. – V. 6. – P. 5614.
3. Heisenberg M. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means / M. Heisenberg, K. Böhl // Z. Naturforsch. – 1997. – V. 34. – P. 143–147.
4. Dutta S. *et al.* Glial expression of Swiss cheese (SWS), the *Drosophila* orthologue of neuropathy target esterase (NTE), is required for neuronal ensheathment and function // Disease models & mechanisms. – 2016. – V. 9. – No. 3. – P. 283–294.

Биополимеры для тканевой инженерии

Шарилов Р. В., Тенчурин Т. Х., Камышинский Р. А.

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

Значительный прогресс в области регенеративной медицины связывают с созданием трехмерных структур, наделенных биоподобными свойствами. Разработанные к настоящему времени синтетические каркасы с морфологическими, структурными и механическими свойствами необходимыми для прикрепления и пролиферации клеток недостаточно эффективны вследствие того, что не обеспечивают адекватного межклеточного окружения для направленной адгезии, миграции и дифференцировки клеток [1]. Поведение клетки в организме определяется химическими и морфологическими особенностями окружающей ее трехмерной сетки внеклеточного матрикса (ВКМ) [2]. В связи с чем исследование таких биополимеров как коллаген и спидроин является перспективным направлением тканевой инженерии из-за их высокой биосовместимости. Метод электроформования позволяет получать из растворов полимеров нетканые волокнистые матриксы, применимые для этих целей.

В данной работе объектами исследования являются коллаген и рекомбинантные спидроины 1F9 и 2E12 – аналоги нативных спидроинов MaSp1 и MaSp2, которые являются составляющими каркасной нити паука, с молекулярными массами 94 и 113 кДа соответственно [3].

Целью работы является получение тканеинженерных конструкций из биополимеров с сохранением вторичной структуры белков. Поэтому для успешного электроформования из растворов/дисперсий коллагена было изучено влияние температуры, скорости сдвига и концентрации растворов уксусной кислоты на денатурацию белка. Получены нетканые материалы методом электроформования из растворов коллагена с волокнообразующей добавкой полиэтиленоксид различной молекулярной массы, а также произведены клеточные испытания данных ВКМ. Также были произведены реологические и структурные исследования водных растворов рекомбинантных спидроинов 1F9 и 2E12 и в гексафторизопропанол. Показано, что в водных растворах спидроины способны к самоорганизации при сдвиговой деформации фибриллярные структуры. Было обнаружено, что растворы спидроина 1F9 являются структурированными жидкостями, а 2E12 – нет.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-33-70071 мол_а_мос, № 18-29-17071 мк) и Правительства города Москвы.

1. Li Y., Xiao Y., Liu C. The horizon of materiobiology: a perspective on material-guided cell behaviors and tissue engineering // Chemical reviews. – 2017. – V. 117. – No. 5. – P. 4376–4421.
2. Humphrey J.D., Dufresne E.R., Schwartz M.A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis // Nature reviews Molecular cell biology. – 2014. – V. 15. – No. 12. – P. 802–812.
3. Bogush V.G. *et al.* A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins // Journal of neuroimmune pharmacology. – 2009. – V. 4. – No. 1. – P. 17.

Мутационный анализ первично-множественных опухолей у пациентов

Шахматова А. Д.¹, Гринькова Е. Я.¹, Мирлина Е. Д.¹, Бутрович Г. М.¹,
Гуляев А. В.², Вострюхина О. А.¹

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова

НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Петрова

Минздрава РФ, Песочный, Санкт-Петербург, Россия

Первично-множественные опухоли (ПМО) или полинеоплазии – это одновременное или поочередное образование очагов злокачественного роста, которые развиваются самостоятельно и независимо друг от друга в пределах одного или нескольких органов [1]. ПМО в настоящее время привлекают все более пристальное внимание клиницистов вследствие увеличения частоты их выявления и сложностью лечения этой категории больных. Основные трудности возникают при дифференциальной диагностике между второй опухолью и рецидивом, т.е. прорастанием или метастазом первой злокачественной опухоли

Целью данной работы явился ретроспективный анализ генетических изменений, накапливающихся в клетках двух больных - пациента с тремя мультифокальными аденокарциномами желудка и пациента с 7-ю последовательно возникающими опухолями разной локализации. Предполагалось, что идентичные мутационные профили опухолей подразумевают метастатический характер второй (и далее) карциномы.

Мутационные профили опухолей определяли с применением техники PCR-SSCP и метода электрофореза в денатурирующих условиях, а также секвенирования. Анализировали наличие повреждений в микросателлитах BAT26 и BAT40, в генах - мишенях дефектной работы системы коррекции неспаренных оснований ДНК - *TGFBRII*, *BAX*, *MSH3*, *MSH6*, *IGFIIR* и др., в «горячих точках» мутагенеза генов *TP53*, *BRAF*, *APC*, *KRAS*, *PTEN* и в маркерах потери гетерозиготности (*TP53*, *CHRNA1* и *D17S786*).

Результаты молекулярно-генетического анализа опухолей сопоставлены с клинико-патологоанатомическими данными пациентов, на основе чего составлены предположительные схемы поэтапного развития заболеваний для пациента с тремя опухолями желудка.

Также было проведено таргетное секвенирование части образцов пациента с семью опухолями для обнаружения соматических (в опухолевых образцах) и герминальных (в крови) мутаций. Подтверждена ранее обнаруженная микросателлитная нестабильность – повреждения в генах *BLM*,

данных можно предположить, что опухоли имеют различающиеся между собой мутационные профили, что указывает на их независимое происхождение.

Давыденко П. И., Дубова Е. А., Егоров В. И. и др. Первично-множественный синхронный рак: обзор литературы и клиническое наблюдение. Медицинская визуализация. 2010; 6: 133–135.

Царьков П. В., Кравченко А. Ю., Тулина И. А., Миракян С. С. Стратегия «сначала удаление первичной опухоли» в лечении синхронного метастатического рака толстой кишки // Практическая онкология. 2012. Т. 13. № 4. С. 255–260.

3. Vakiani E., Janakiraman M., Shen R. *et al.* Comparative Genomic Analysis of Primary Versus Metastatic Colorectal Carcinomas // J. Clin. Oncol. 2012. 30(24), p. 2956–2962.

Функциональная роль оперона генов *ukfJ-prfH Escherichia coli*

Ширяев Д. И.¹, Prince T. M.², Бердникович Е. А.², Зареченская А. С.²,
Остерман И. А.^{1, 2}, Сергеев П. В.^{1, 2}, Донцова О. А.^{1, 2}

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

² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

Около половины всей энергии, накапливаемой бактериальной клеткой, расходуется на синтез белка [1]. В этом сложном многостадийном процессе могут возникать различные аварийные ситуации, такие как торможение и некорректная работа рибосом за счет действия антибиотиков (например, макролидов) и УФ-излучения; «застывание» рибосомы на мРНК, не содержащей стоп-кодона. Для того чтобы сохранить столь важную и дорогостоящую клеточную машину от деградации в случае аварии, в организме предусмотрены разнообразные системы спасения рибосом. Часто они предусматривают появление мРНК без стоп-кодона, после чего в игру вступают либо система *транс*-трансляции, либо системы ArfA/B [2]. Поиск и изучение таких систем, во-первых, позволяют расширить знания о механизме бактериальной трансляции, во-вторых, способны привести к созданию новых классов антибактериальных препаратов, останавливающих высвобождение рибосом в случае аварийной ситуации, и, в-третьих, могут облегчить понимание работы аналогичных систем в клетках человека.

Целью настоящей работы является поиск функциональной роли возможной системы спасения рибосом, состоящей из оперона генов *ukfJ-prfH*, в *E. coli* (названия приведены согласно штамму К-12). Ген *prfH* обнаружен в 2006 году [3], соответствующий белок PrfH гомологичен известным факторам терминации трансляции RF1 и RF2, а YkfJ имеет сходство с белками семейства РНК-лигаз RtcB. Нами было показано, что добавление белка PrfH в бесклеточную систему бактериальной трансляции позволяет «освобождать» рибосомы, застрявшие на мРНК вследствие действия макролидов, а белок YkfJ способен обеспечивать лигирование модельного РНК-олигонуклеотида, содержащего 5'-гидроксильную и 3'-фосфатную группы. В настоящее время проводится исследование работы этой системы *in vivo*, ее специфичности и регуляции. Возможно, система *ukfJ-prfH* служит для высвобождения рибосом, застрявших при действии антибиотика и/или при нарушении целостности РНК-остова.

Работа проводится при поддержке гранта РФФИ 20-14-00171.

1. Russell J.B., Cook G.M. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* 59, 48–62 (1995).
2. Keiler K.C. Mechanisms of ribosome rescue in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 285–297 (2015).
3. Baranov P.V. *et al.* Diverse bacterial genomes encode an operon of two genes, one of which is an unusual class-I release factor that potentially recognizes atypical mRNA signals other than normal stop codons. *Biology Direct.* 1:28 (2006).

Спиросочлененные триптантрины и пирролопирролизины: потенциальные небелковые ингибиторы STAT3 и MDM2

Шмаков С. В.¹, Князев Н. А.², Латыпова Д. К.¹, Ключников А. С.¹,
Еуров Д. А.³, Степаков А. В.⁴, Бойцов В. М.^{1, 5}

¹ Санкт-Петербургский академический университет им. Ж. И. Алферова,
Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Санкт-Петербургский научный центр РАН, Санкт-Петербург, Россия

stas-svs@list.ru

Соединения, содержащие спиросочлененный пирролизиновый фрагмент, являются перспективными классами для поиска противоопухолевых препаратов [1–4]. В работе представлен метод синтеза соединений с триптантриновым и пирролопирролизиновым фрагментами, выполнено разделение образующихся диастереомеров, различающихся конфигурацией спироатома, проведено сравнение цитотоксичности полученных диастереомеров, изучено их влияние на экспрессию сигнального белка и активатора транскрипции STAT3, играющего важную роль в развитии онкологических заболеваний, а также онкосупрессора p53 и его негативного регулятора MDM2.

С помощью MTS-теста проведено сравнение цитотоксичности полученных изомеров на клетках культур HeLa, K-562 и МН-22а, выявлена существенная разница в активностях спиро-R- и -S-изомера: значение IC₅₀ для клеток K-562 составили 1.9±0.2 мкг/мл для R-изомера и 7.8±0.2 для S-изомера (72 часа). Показано отсутствие острой токсичности.

Методом вестерн-блоттинга показано, что экспрессия белка STAT3 увеличивающего пролиферацию, выживаемость и инвазию опухолевых клеток, одновременно подавляющего противоопухолевый иммунитет [5], при воздействии на клетки более активным R-изомером подавляется на 30 % в сравнении с контролем, а при воздействии S-изомеров увеличивается на 50 %. Экспрессия p53, являющегося одним из важнейших онкосупрессоров [6], при обработке R-изомером, возрастает по сравнению с контролем в 3 раза, экспрессия MDM2, являющегося его негативным регулятором и, таким образом, играющего важную роль в развитии опухолевых заболеваний [7], составила 29 % от контроля. Обработка клеток S-изомером не изменила уровень экспрессии p53 и уменьшила определяемое количество MDM2 до 68 % от контроля.

Полученные результаты позволяют говорить о существенной зависимости активности спиросочлененных триптантринов и пирролопирролизинов от пространственной ориентации групп относительно спироатома и потенциальной возможности применения таких соединений в качестве средства для противоопухолевой терапии.

1. Filatov A.S. *et al.* Stereo- and Regioselective 1,3-Dipolar Cycloaddition of the Stable Ninhydrin-Derived Azomethine Ylide to Cyclopropenes: Trapping of Unstable Cyclopropene Dipolarophiles // *Journal of Organic Chemistry*. – 2019 – V. 84 – No. 11 – P. 7017–7036.
2. Filatov A.S. *et al.* Concise Synthesis of Tryptanthrin Spiro Analogues with *in vitro* Antitumor Activity Based on One-Pot, Three-Component 1, 3-Dipolar Cycloaddition of Azomethine Ylides to Cyclopropenes // *Synthesis*. – 2019. – V. 51. – No. 03. – P. 713–729.
3. Filatov A.S. *et al.* A Highly Diastereoselective One-Pot Three-Component 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cyclopropenes with Azomethine Ylides Generated from 11H-Indeno[1,2-b]-quinoxalin-11-ones // *Organic Chemistry Frontiers*. – 2018 – V. 5 – No. 4 – P. 595–605.
4. Filatov A.S. *et al.* Synthesis of functionalized 3-spiro[cyclopropa[a]pyrrolizine] and 3-spiro[3-azabicyclo[3.1.0]hexane]oxindoles from cyclopropenes and azomethine ylides via [3+2]-cycloaddition // *Journal of Organic Chemistry*. – 2017 – V. 82 – No. 2 – P. 959–975.
5. Yu H., Pardoll D., Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 // *Nature reviews cancer*. – 2009. – V. 9. – No. 11. – P. 798.
6. Hollstein M. *et al.* p53 mutations in human cancers // *Science*. – 1991. – V. 253. – No. 5015. – P. 49–53.
7. Oliner J.D. *et al.* Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas // *Nature*. – 1992. – V. 358. – No. 6381. – P. 80–83.

Система для поиска и анализа соединений с антибактериальной активностью

Шуленина О. В.^{1, 2, 3}, Яровой Б. Ф.¹, Егоров В. В.^{1, 4},
Полесскова Е. В.^{1, 2}, Коневега А. Л.^{1, 2, 3}

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

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

³ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия*

⁴ *Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

shulenina_ov@pnpi.nrcki.ru

Отсутствие строгого контроля использования антимикробных терапевтических и ветеринарных препаратов привело к распространению устойчивости к антибиотикам среди патогенных бактерий, что вынуждает человечество расширять спектр новых антибактериальных соединений. Источниками новых препаратов могут служить как искусственно синтезированные вещества, так и вещества природного происхождения [1].

Целью данного исследования является поиск соединений с антибактериальной активностью и изучение молекулярного механизма их действия. Данная работа является комплексным исследованием, которое подразделяется на три основных этапа, каждый из которых представляет собой отдельную научную задачу.

Первый этап – скрининг коллекций и библиотек соединений. В нашей работе мы проводим скрининг антибактериальной активности коллекции дрожжей и дрожжеподобных грибов, сформированной в ОМРБ ПИЯФ [2].

Второй этап – обнаружение активных соединений и установление их биологической активности. Работа на данном этапе включает анализ вторичных метаболитов штаммов коллекции, а также искусственно синтезированного соединения «984» с известной структурой и неизвестным механизмом действия.

Третий этап – определение молекулярного механизма действия соединений с установленной биологической активностью. Нашим объектом исследования на данном этапе является антибиотик мадумицин, структура и мишень которого известны. Мадумицин связывается с активным центром бактериальной рибосомы и ингибирует процесс трансляции [3].

Работы по скринингу коллекции дрожжей поддержаны грантом РФФИ 17-00-00368.

1. Munita J.M. and Arias C.A. Microbiol Spectr. 4 (2), 2016.
2. Суслов А. В. и др. Радиационная биология. Радиоэкология. 44 (5), 2004.
3. Osterman I.A. *et al.* Nucleic Acids Research. 45 (12), 2017.

Конформация статинов в комплексе с модельными мембранами по методам ЯМР-спектроскопии

Шуршалова Г. С., Клочков В. В.

*Институт физики Казанского (Приволжского) федерального университета,
кафедра медицинской физики, Казань, Россия*

guzel.musabirova@bk.ru

Лекарственные препараты на основе статинов были впервые синтезированы из грибов вида *Monascus ruber* и *Aspergillus terreus* (правастатин, симвастатин и ловастатин), а остальные виды были получены синтетически (флувастатин, аторвастатин, розувастатин и питавастатин). Хотя все эти статины сохраняют лактонный фрагмент для связывания с ГМГ-КоА-редуктазой, они обладают очень разнообразными фармакокинетическими свойствами, включая различия в метаболизме, экскреции, периодах полувыведения, биодоступности, времени приема и липофильности [1]. Данные препараты принимают для снижения уровня холестерина, и используют для лечения дислипидемии и снижения риска развития атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний. С тех пор как был развит метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения, спектры ЯМР стали основным методом изучения как синтезированных, так и натуральных продуктов, полученных из грибов, растений или бактерий.

Существует гипотеза о том, что фармакологические свойства статинов зависят от их положения в клеточной мембране [2]. Таким образом в ходе исследования были изучены 6 статинов в растворе с модельными клеточными мембранами методами ЯМР спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера. Результаты экспериментов показали, что все изученные статины формируют молекулярные комплексы с модельными клеточными мембранами на основе мицелл додецилфосфохолина и додецилсульфата натрия. Также было определено расположение данных статинов по отношению к мицелле ДФХ и СДС [3, 4]. Даже незначительные различия в структуре статинов приводят к различному взаимодействию с модельной мембраной, и данные различия могут объяснить фармакологические свойства статинов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Казанского (Приволжского) федерального университета.

1. A.J. McFarland, S. Anoopkumar-Dukie *et al.* Int. J. Mol. Sci. 15(11):20607-37 (2014).
2. R.P. Mason, M.F. Walter, Ch.A. Day, R.F. Jacob. Am. J. of Cardiology, 11–23, 96 (2005).
3. L.F. Galiullina, G.S. Musabirova *et al.* J. Mol. Structure, 69–77, 1167 (2018).
4. L.F. Galiullina, G.S. Musabirova *et al.* J. BBA Biomembranes, 259–300, 1859(2017).

Уточнение значений времен релаксации T₁ в ЯМР-приложениях метаболомики

Якимов А. П.^{1, 2}, Шабалин К. А.¹, Нериновский К. Б.³

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова

НИИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,

Санкт-Петербург, Россия

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Для сокращения времени ЯМР эксперимента по определению значений концентраций растворенных метаболитов [1] ранее был предложен подход использовать малую задержку t между повторениями накоплений FID [2], что приводит к возникновению погрешностей при определении значений интегралов сигналов, принадлежащих разным атомам одного химического соединения. Из общезначимых принципов следует, чтобы значения интегралов от разных атомов, находящихся в одинаковой концентрации должны совпадать с точностью ограниченной возможностями используемой техники. В настоящий момент для коррекции значений интегралов используется решение уравнения Блоха в следующем виде $M_z = M_0 [1 - e^{(-t/T_1)}]$, где значения T_1 были получены на референсных образцах и могут не соответствовать реальным из-за изменившегося растворителя, примесей и т. д. Возникает идея, что возможно вычислить реальные значения T_1 путем анализа выборки по всей измеренной серии образцов. Модифицируя уравнение следующим образом

$M_{z_{ij}} = M_{0_{ij}} [1 - e^{\frac{-t}{T_{1_i} + \delta T_{1_i}}}]$, где значения δT_1 решение задачи линейного программирования [3] минимизации суммы $(\sum_{j=1}^N \sigma_j)$ значений среднеквадратичных отклонений σ_j значений интегралов после коррекции для

к

а При наличии нескольких десятков однотипных образцов данный подход может дать некоторое увеличение точности при определении концентраций метаболитов в растворе [2].

о

г

о

о

б

р

а

з

ц

а

,

1. Kulikova V., Shabalin K., Nerinovski K. *et al.* (2015). Generation, Release, and Uptake of the NAD Precursor Nicotinic Acid Riboside by Human Cells // Journal of Biological Chemistry, 290(45).
2. Shabalin K., Nerinovski K., Yakimov A. *et al.* (2018). NAD Metabolome Analysis in Human Cells Using ¹H NMR Spectroscopy // International Journal of Molecular Sciences, 19(12), 3906.
3. Dantzig George B., Thapa Mukund Narain (1997). Linear programming. New York: Springer. pp. xxvii. ISBN 0387948333.

Потенциальная роль пирофосфатазы человека NUDT13 в регуляции митохондриального пула NAD

Якушева А. В.¹, Кротов А. В.², Нериновский К. Б.³, Якимов А. П.^{1, 4},
Никифоров А. А.², Куликова В. А.^{1, 2, 5}

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

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

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

⁵ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

alena_yakusheva@outlook.com

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) является основным коферментом в окислительно-восстановительных реакциях центральных метаболических путей. Также NAD является субстратом для нескольких семейств регуляторных белков, контролирующих важнейшие механизмы жизнедеятельности клетки: апоптоз, репарацию ДНК, экспрессию генов и другие [1]. На данный момент неизвестно, каким образом регулируется митохондриальный пул NAD в клетках человека.

В рамках данного исследования мы проверяем возможность регуляции уровня NAD в митохондрии за счет его расщепления Nudix-пирофосфатазой NUDT13. Nudix-пирофосфатазы контролируют уровень метаболитов и сигнальных молекул в клетке. Мышиный белок Nudt13 расщепляет NADH и NADPH *in vitro* и локализуется в митохондриях [2]. К настоящему моменту функции NUDT13 в клетках человека не установлены.

Прежде всего, нами была подтверждена митохондриальная локализация рекомбинантного FLAG-слитого белка человека NUDT13 после сверхэкспрессии в клетках HeLa.

Далее для оценки изменения уровня митохондриального NAD мы использовали клеточную модель сверхэкспрессии каталитического домена поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 (PARP1) в митохондриальном матриксе (Mito-PARP). В присутствии NAD белок Mito-PARP авто-поли-ADP-рибозилируется, при этом, концентрация NAD в митохондрии прямо пропорциональна количеству полимеров ADP-рибозы (PAR) [3]. Уровень PAR оценивается методом иммуноблоттинга. Коэкспрессия Mito-PARP с белком NUDT13 приводит к существенному снижению уровня PAR в митохондриальном матриксе. Это позволяет предположить, что пирофосфатаза NUDT13 влияет на уровень NAD в митохондрии за счет его ферментативного расщепления.

Также мы оптимизировали метод аффинной очистки белка NUDT13, слитого с 6xHis, после сверхэкспрессии в *E. coli* и частично охарактеризовали субстратную специфичность пирофосфатазы NUDT13 *in vitro*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-74-00081.

1. Kulikova V.A., Gromyko D.V., and Nikiforov A.A. (2018) The Regulatory Role of NAD in Human and Animal Cells, *Biochemistry (Moscow)*, 83:800–812.
2. Abdelraheim S.R., Spiller D.G., and McLennan A.G. (2017) Mouse Nudt13 is a Mitochondrial Nudix Hydrolase with NAD(P)H Pyrophosphohydrolase Activity, *Protein*, 36:425–432.
3. VanLinden M.R., Niere M., Nikiforov A.A., Ziegler M., Dölle C. (2017) Compartment-Specific Poly-ADP-Ribose Formation as a Biosensor for Subcellular NAD Pools, *Methods in Molecular Biology*, 1608:45–56.