

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

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

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

26 февраля – 2 марта 2024 г.

**Тезисы докладов  
Молодежной конференции**



## **Дорогие коллеги!**

Организационный комитет рад приветствовать участников и гостей XXIII Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, которая проходит в пригороде Санкт-Петербурга на побережье Финского залива с 26 февраля по 2 марта 2024 года.

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

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

Научную программу Школы составляют доклады приглашенных лекторов, круглые столы и Молодежная конференция, включающая в себя устные доклады и две стендовые сессии.

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

**Тезисы докладов  
Молодежной конференции**

## Роль субъединиц комплекса INO80 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в УФ-индуцированном мутагенезе

Алексеева Е. А., Евстюхина Т. А., Скобелева И. И., Пешехонов В. Т.,  
Бахланова И. В., Королев В. Г.

НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

*alekseeva\_ea@npi.nrcki.ru*

Комплекс INO80 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* включает 15 различных субъединиц: Ino80, Rvb1, Rvb2, Arp4, Arp5, Arp8, Act1, Taf14, Nhp10, Ies1, Ies2, Ies3, Ies4, Ies5 и Ies6 [1].

Роль генов NHP10, IES5 комплекса INO80, в индуцированном мутагенезе ранее не изучалась. Нами были получены делеционные мутанты по этим генам.

Анализ чувствительности к УФ-свету мутантов *nhp10Δ* и *ies5Δ*, показал, что *nhp10Δ* более чувствителен к УФ-свету, по сравнению со штаммом дикого типа и мутантом *ies5Δ* (совпадает с чувствительностью к УФ-свету штамма дикого типа). При этом мутант *nhp10Δ* показал достоверно более высокую частоту УФ-индуцированного мутагенеза по сравнению с таковой штамма дикого типа. Частота УФ-индуцированного мутагенеза мутанта *ies5Δ* совпадала с таковой штамма дикого типа.

Также мы проверили как делеции генов, кодирующих субъединицы гистонацетилазных и гистондеацетилазных комплексов NuB4 и RPD3 будут влиять на УФ-индуцированный мутагенез в мутантных штаммах *nhp10Δ* и *ies5Δ*.

Было показано, что у двойных мутантов *ies5Δ hsm3Δ* и *ies5Δ hif1Δ*, *nhp10Δ hsm3Δ*, *nhp10Δ hif1Δ* и *ies5Δ rpd3Δ* частота УФ-индуцированного мутагенеза оказалась достоверно ниже, чем у штамма дикого типа и обоих одиночных мутантов.

Таким образом, мы обнаружили, что мутации в генах, контролирующих субъединицы комплекса INO80, могут проявлять сильные взаимодействия с мутациями в генах, кодирующих субъединицы гистонацетилазных и гистондеацетилазных комплексов NuB4 и RPD3, соответственно.

*Часть работы (эксперименты по ПЦР в реальном времени) была проведена в рамках программы развития Центра геномных исследований «Курчатовский геномный центр – ПИЯФ» (соглашение № 075-15-2019-1663). Остальная часть работы была выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 1023031500033-1-1.6.7;1.6.4;1.6.8.).*

1. Tosi A., Haas C. *et al.*, Cell. 154, 6 (2013).

## Различные формы поверхностного белка вируса Ласса для использования в аффинной селекции

Арипов В. С., Исаева А. А., Ильичев А. А., Щербаков Д. Н., Волкова Н. В.

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

*aripov\_vs@vector.nsc.ru*

Технологии отбора рекомбинантных антител позволяют получать *in vitro* высокоспецифичные антитела против любых инфекций. При этом на этапе отбора антител важную роль играет правильно подобранная антиген-мишень, поскольку именно она определяет аффинность паратопов отбираемых антител.

Ранее нами была получена фаговая библиотека однодоменных антител к вирусу Ласса [1]. Следующий этап заключался в проведении отбора высокоспецифичных антител с использованием специфичных мишеней. Поэтому целью нашей работы является получение различных форм поверхностного белка вируса Ласса для использования в аффинной селекции.

В качестве мишеней нами были выбраны псевдовирусные частицы вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного поверхностным гликопротеином GPC вируса Ласса (VLPs LASV), а также тример поверхностного гликопротеина GPC LASV. Для получения VLPs LASV был сконструирован вектор ph-GPC-Lassa, а для получения тримера вектор PVEAL3-Lassa-TriM, который обеспечивает синтез и секрецию рекомбинантного поверхностного гликопротеина GPC LASV в клетках млекопитающих.

Полученные псевдовирусные частицы способны только к однократному инфицированию чувствительных клеток без дальнейшей репликации. С помощью электронной микроскопии был определен титр псевдовирусов –  $10^{11}$  частиц. Способность псевдовирусов проникать в клетки мишени была подтверждена при помощи функционального анализа, который показал высокий уровень активности полученных частиц.

Плазмидой PVEAL3-Lassa-TriM трансфецировали клетки млекопитающих CHO-K1. Отобранные моноклоны показали уровень детектируемого сигнала взаимодействия рекомбинантного белка GPC-LASV с антителом 37.7H от 2,7 до 3,4 OD, с антителом iB20 равную 0,11 OD.

Полученные рекомбинантные формы GPC LASV обладают свойствами антигена и проявляют специфическое взаимодействие с моноклональными антителами.

1. Арипов В. С., Мордвинова Е. Д., Таранин А. В. и др. Получение фаговой библиотеки антител против вируса Ласса // IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков – 2022: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2022. С. 69.

## Особенности экспрессии гена *Nxf1* в нервной системе *Drosophila melanogaster*

Ахромов К. В.<sup>1,2</sup>, Голубкова Е. В.<sup>1</sup>, Саранцева С. В.<sup>2</sup>, Рябова Е. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологий, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

ahromov.kv@gmail.com

*Nxf1* (nuclear export factor) – ген эволюционно консервативного семейства *Nxf*, представители которого обнаруживаются у заднежутиковых [1]. Роль белка NXF1 в клетке – экспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Он функционирует в форме гетеродимера, связываясь с белком NXT1 (NTF2-related export protein 1). NXF1 содержит 4 домена: RBD (RNA-binding domain), необходимый для димеризации LRRs (Leucine-rich repeats), NTF2-like и UBA-like (ubiquitin associated-like). NTF2-like домен отвечает за взаимодействие с NTF2 (nuclear transport factor 2) при взаимодействии транспортируемого комплекса с ядерной порой [2]; UBA-like необходим для связывания с белками ядерной поры [3].

Известно, что ген *Nxf1* имеет не менее пяти транскриптов, возникающих в ходе альтернативного сплайсинга [4].

Целью данной работы является изучение распределения белковых продуктов гена *Nxf1* в нервной системе *Drosophila melanogaster*.

В результате работы было обнаружено наличие белка NXF1 в нервной системе как на личиночной стадии, так и на стадии имаго; кроме того, у мутантов по гену *Nxf1* наблюдаются нарушения в строении нервно-мышечных соединений. Исходя из этого можно сделать вывод, что продукты гена *Nxf1* играют важную роль в развитии и функционировании нервной системы.

1. Herold A., Suyama M., Rodrigues J.P., Braun I.C., Kutay U., Carmo-Fonseca M., Bork P., Izaurralde E. (2000). TAP (NXF1) belongs to a multigene family of putative RNA export factors with a conserved modular architecture. *Mol. Cell. Biol.* 20(23):8996–9008.
2. Katahira J., Strässer K., Podtelejnikov A., Mann M., Jung J.U., Hurt E. The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J.* 1999 May 4; 18(9):2593-609. doi: 10.1093/emboj/18.9.2593. PMID: 10228171; PMCID: PMC1171339.
3. Braun I.C., Herold A., Rode M., Izaurralde E. Nuclear export of mRNA by TAP/NXF1 requires two nucleoporin-binding sites but not p15. *Mol Cell Biol.* 2002 Aug; 22(15):5405-18. doi: 10.1128/MCB.22.15.5405–5418.2002.



4. Ivankova N., Tretyakova I., Lyozin G.T., Avanesyan E., Zolotukhin A., Zatsepina O.G., Evgen'ev M.B., Mamon L.A. Alternative transcripts expressed by small bristles, the *Drosophila melanogaster* nxf1 gene. *Gene*. 2010 Jun 15; 458(1-2):11-9. doi: 10.1016/j.gene.2010.02.013. Epub 2010 Mar 7.

**Изменение активности лизосомных ферментов  
в первичной культуре макрофагов  
как биомаркер дифференциальной диагностики синуклеинопатий**

Башарова К. С.<sup>1</sup>, Безрукова А. И.<sup>1, 2</sup>, Байдакова Г. В.<sup>3</sup>, Милюхина И. В.<sup>2, 4</sup>,  
Захарова Е. Ю.<sup>3</sup>, Пчелина С. Н.<sup>1, 2</sup>, Усенко Т. С.<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

*kbasharova@yandex.ru*

Болезнь Паркинсона (БП), деменция с тельцами Леви (ДТЛ) и множественная системная атрофия (МСА) относятся к синуклеинопатиям и имеют схожие клинические симптомы на ранних стадиях заболевания, что затрудняет дифференциальную диагностику. Предполагается, что в основе патогенеза синуклеинопатий может лежать дисфункция лизосом [1].

Оценка активности лизосомных ферментов и концентрации сфинголипидов в первичной культуре макрофагов периферической крови при БП, ДТЛ, МСА.

Активность альфа-галактозидазы (GLA), кислой сфингомиелиназы (ASMase), галактозилцереброзидазы (GALC), глюкоцереброзидазы (GCase), и концентрацию глоботриаозилсфингозина (LysoGb3), сфингомиелина (LysoSM), гексозилсфингозина (HexSph) оценивали в трех повторах высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией в макрофагах, дифференцированных из мононуклеаров периферической крови пациентов с БП ( $N = 10$ ), ДТЛ ( $N = 6$ ), МСА ( $N = 10$ ) и индивидуумов контрольной группы ( $N = 8$ ).

Концентрация HexSph повышена в макрофагах пациентов с БП, МСА, ДТЛ по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ). Пациенты с МСА характеризовались снижением активности GCase, GALC, ASMase по сравнению с БП, контролем ( $p < 0,05$ ), а также снижением активности GLA по сравнению с контролем ( $p = 0,007$ ). Для оценки прогностической значимости исследуемых параметров был проведен ROC-анализ, который выявил пороговые концентрации HexSph для БП (0,5 нг/мл, AUC = 0,896,  $p = 0,0009$ ), ДТЛ (0,54 нг/мл, AUC = 1,  $p = 0,0006$ ), МСА (0,49 нг/мл, AUC = 0,896,  $p = 0,0002$ ). Также выявлены пороговые значения активности GCase (8 мМ/л/ч, AUC = 0,843,  $p = 0,0006$ ), GALC (2,04 мМ/л/ч, AUC = 0,751,  $p = 0,02$ ), ASMase (1,78 мМ/л/ч, AUC = 0,883,  $p = 0,0001$ ), GLA (12,3 мМ/л/ч, AUC = 0,745,  $p = 0,02$ ) для МСА.

Полученные результаты подтверждают роль дисфункции лизосом в патогенезе синуклеинопатий. Комплексная оценка изменений активности GCase, GALC, ASMase и GLA может быть использована в качестве биомаркера дифференциальной диагностики МСА.

1. Usenko T.S., Senkevich K.A., Bezrukova A.I., Baydakova G.V., Basharova K.S., Zhuravlev A.S., Gracheva E.V., Kudrevatykh A.V., Miliukhina I.V., Krasakov I.V., Khublarova L.A., Fursova I.V., Zakharov D.V., Timofeeva A.A., Irishina Y.A., Palchikova E.I., Zalutskaya N.M., Emelyanov A.K., Zakharova E.Y., Pchelina S.N. Impaired Sphingolipid Hydrolase Activities in Dementia with Lewy Bodies and Multiple System Atrophy. *Mol. Neurobiol.* 59(4):2277–2287 (2022).

**Экспрессия генов mTOR-зависимой аутофагии у пациентов с болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1*, и бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA1* в мононуклеарах периферической крови**

Безрукова А. И.<sup>1,2</sup>, Башарова К. С.<sup>1</sup>, Милюхина И. В.<sup>1,2,3</sup>,  
Пчелина С. Н.<sup>1,2</sup>, Усенко Т. С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

*bz.nastya96@gmail.com*

Молекулярные механизмы нейродегенеративного заболевания болезни Паркинсона (БП), ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (*GBA1*-БП), кодирующем фермент глюкоцереброзидазу (*GCCase*), не известны. Последние данные предполагают роль дисфункции mTOR-зависимой аутофагии в патогенезе БП и *GBA1*-БП [1, 2].

Цель заключалась в оценке уровня мРНК генов mTOR-зависимой аутофагии, у носителей мутаций в гене *GBA1* как с установленным диагнозом БП, так и без него.

В ходе данного исследования были собраны мононуклеары периферической крови 16 пациентов с *GBA1*-БП (9 с тяжелой мутацией – L444P/N; 7 с легкой мутацией – N370S/N) и 15 бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA1* (*GBA1*-носители) (6 с тяжелой мутацией – L444P/N; 9 с легкими мутациями: 7 N370S/N, 1 R159W/N, 1 M124T/N), 30 пациентов со спорадической формой БП (сБП) и 45 контроля, в которых была оценена экспрессия генов, вовлеченных в mTOR-зависимую аутофагию (*mTOR*, *MAP1LC3B*, *BECN1*, *SQSTM1*, *CTSD*), методом количественной ПЦР в режиме реального времени. Тяжесть мутаций *GBA1* определяется по остаточной активности *GCCase* – 5 % тяжелые, 30–50 % – легкие.

Показано увеличение экспрессии гена *MAP1LC3B* у пациентов с *GBA1*-БП и *GBA1*-носителей по сравнению с пациентами с сБП ( $p < 0,05$ ), а также увеличение экспрессии гена *MAP1LC3B* у пациентов с *GBA1*-БП по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ) за счет вклада тяжелых мутаций. Экспрессии гена *mTOR* повышена у пациентов с *GBA1*-БП и сБП по сравнению с *GBA1*-носителями и контролем ( $p < 0,05$ ). Выраженное снижение экспрессии гена *mTOR* у *GBA1*-носителей обусловлено наличием мягких мутаций. Носительство мутаций в гене

*GBA1* ассоциировано со снижением экспрессии гена *SQSTM1* у пациентов с БП ( $p < 0,05$ ).

Показано изменение экспрессии генов mTOR-зависимой аутофагии у носителей мутаций в гене *GBA1*. Повышенная экспрессия гена *MAB1LC3B* характерна для носителей тяжелых мутаций в гене *GBA1* не зависимо от статуса БП. Изменение уровня экспрессии гена *mTOR* может быть потенциальным маркером БП у носителей мутаций в гене *GBA1*.

*Исследование поддержано грантом Российского научного фонда 24-25-00212.*

1. Pang S.Y-Y., Rachel Ch.N.L. *et al.*, *Transl. Neurodegener.* 11, 5 (2022).
2. Usenko T., Bezrukova A. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* 24, 12164 (2023).

## Система визуализации поэтапного синтеза пептидов

Биджиева М. С.<sup>1,2</sup>, Толочева О. А.<sup>1</sup>, Полесскова Е. В.<sup>1,2</sup>, Сергеев П. В.<sup>3, 4, 5, 6</sup>,  
Коневега А. Л.<sup>1,2, 7</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>5</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>6</sup> Институт функциональной геномики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>7</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

*bidzhieva\_ms@pnpi.nrcki.ru*

Антибиотики – это разнообразные природные или синтетические вещества, избирательно подавляющие жизнеспособность микроорганизмов. Большая группа антибиотиков выступает в качестве ингибиторов трансляции. Изучение их механизмов действия и специфичности необходимо для понимания работы аппарата биосинтеза белка и центральной его части – рибосомы.

Для анализа процесса трансляции рутинно используется метод радиоактивного мечения. Наряду со всеми преимуществами этот метод имеет несколько ограничений, таких как высокая цена, сложная утилизация отходов, необходимость соответствия условий и организации лаборатории для работы с источниками излучения.

В данной работе представлен новый, быстрый и простой метод мониторинга поэтапной трансляции в реконструированной *in vitro* системе, где в качестве метки на тРНК был использован флуорофор BODIPY [1]. Эффективность и адекватность работы системы были подтверждены контрольными экспериментами с использованием радиоактивных меток и ингибиторов биосинтеза белка с известными механизмами действия.

Было продемонстрировано, что использование BODIPY-меченой инициаторной метионил-тРНК позволяет визуализировать пошаговый синтез пептидов от 1 до 7 аминокислот с помощью гель-электрофореза. Разработанная система дает возможность визуализировать и разделять полипептиды в

полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с беспрецедентным разрешением в одну аминокислоту.

Уникальными особенностями разработанной системы являются ее сверхвысокая чувствительность с порогом детектирования в области 0,1 пмоль полипептида. Среди остальных преимуществ метода стоит отметить его простоту использования, короткую длительность эксперимента, дешевизну и экологичность.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00278).*

1. Marina V.I. *et al.* An easy tool to monitor the elemental steps of *in vitro* translation via gel electrophoresis of fluorescently labelled small peptides // RNA (2023).

**Пример использования контролируемой дивергенции пучка на лабораторном дифрактометре для пространственного разрешения рефлексов в дифракционном эксперименте кристалла белка с большими параметрами элементарной ячейки**

*Биктимиров А. Д.<sup>1,2</sup>, Исламов Д. Р.<sup>1,2</sup>, Юсупов М. М.<sup>3</sup>, Усачев К. С.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

<sup>2</sup> *Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия*

<sup>3</sup> *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France*

*biktimirov.artyom@gmail.com*

Рентгеноструктурный анализ играет ключевую роль в исследовании трехмерной структуры белков, предоставляя уникальную возможность более глубокого анализа их молекулярного строения. Полученные данные в ходе рентгеноструктурного анализа служат основой для биохимических исследований, направленных на более глубокое понимание молекулярных механизмов биологических процессов. Этот метод обеспечивает точное определение расположения атомов в белковых молекулах, что не только способствует пониманию их функциональности, но также является критически важным при разработке новых лекарств и терапевтических подходов [1].

При анализе кристаллов с большими параметрами элементарной ячейки возникает проблема перекрытия дифракционных рефлексов, что может создавать сложности или даже делать невозможным корректное описание и интерпретацию полученных дифрактограмм. Увеличение расстояния между образцом и детектором не только снижает отношение «сигнал – шум», но также существенно увеличивает время выполнения эксперимента (соответствующие сечения сферы Эвальда на кадре уменьшаются). Однако увеличение расстояния между образцом и детектором не решает проблемы перекрытия дифракционных рефлексов для некоторых объектов. Другими словами, каждый дифракционный рефлекс формирует конус с угловым разбросом, соответствующим исходному пучку.

С использованием дифрактометра Synergy-S Rigaku Oxford Diffraction нами проведено рентгеноструктурное исследование кристаллов белка с параметрами элементарной ячейки  $a = b = 78,85 \text{ \AA}$ ,  $c = 251,18 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  и пространственной группой  $P4_12_12$ . Регулировка дивергенции пучка до уровня  $1,7 \text{ мРад}$  привела к значительному улучшению пространственного разрешения



дифракционных рефлексов. Это в свою очередь позволило собрать набор данных с разрешением 3,0 Å, достаточным для последующего анализа структуры белка на лабораторном дифрактометре без необходимости использования источника синхротронного излучения.

*Исследования выполнены за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.*

1. Maveyraud L., Mourey L. Protein X-ray Crystallography and Drug Discovery. *Molecules*. 2020 Feb 25; 25(5):1030.

**Изучение кинетики сплайсинга  
с помощью *in vivo* мечения РНК 5-этинилуридином**

Болихова А. К.<sup>1,2</sup>, Буян А. И.<sup>3,4</sup>, Марьясина С. С.<sup>2,4</sup>, Донцова О. А.<sup>1,2,4</sup>,  
Сергиев П. В.<sup>1,2,4,5</sup>

<sup>1</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии  
им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт белка РАН, Пущино, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический  
факультет, Москва, Россия

<sup>5</sup> Институт функциональной геномики Московского государственного  
университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

[anastasia\\_b7@mail.ru](mailto:anastasia_b7@mail.ru)

Сплайсинг, процесс удаления интронов из транскриптов эукариотической РНК, является одним из важнейших этапов созревания РНК у всех эукариот. Вырезание интронов происходит по специализированным сайтам сплайсинга, которые могут использоваться с разной эффективностью, что приводит к появлению альтернативных продуктов сплайсинга. Более того, скорость сплайсинга различных сайтов может варьироваться, добавляя дополнительный уровень регуляции созревания РНК [1].

Мы использовали недавно предложенную технологию мечения РНК 5-этинилуридином в клетках HeLa для секвенирования новосинтезированных транскриптов [2] и определения скорости сплайсинга каждого донорного и акцепторного сайта. Последующий анализ позволил сопоставить особенности транскрипта и скорость сплайсинга его интронов. Большая часть обнаруженных нами закономерностей была ожидаема. Например, мы показали снижение скорости сплайсинга с уменьшением комплементарности донорного сайта к мяРНК U1 и акцепторного сайта к мяРНК U2, также обнаружили более быстрое использование донорного сайта в составе коротких интронов. Другие зависимости были более интересными, например, влияние длины 3'-нетранслируемой области на скорость сплайсинга последнего интрона.

Проведенный нами анализ дополняет существующие знания о том, как различные характеристики интронов коррелируют со скоростью сплайсинга и позволяет чуть дальше продвинуться в понимании сложных закономерностей, регулирующих созревание РНК.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-64-00006.*

1. Wachutka L., Caizzi L., Gagneur J., Cramer P., Global donor and acceptor splicing site kinetics in human cells. *eLife*, 8, e45056 (2019).
2. Palozola K.C., Donahue G., Zaret K.S., EU-RNA-seq for *in vivo* labeling and high throughput sequencing of nascent transcripts. *STAR protocols*, 2(3), 100651 (2021).

## Подходы для поиска белков, способных к коагрегации с амилоидами

Бондарев С. А.<sup>1,2</sup>, Трубицина Н. П.<sup>1</sup>, Землянко О. М.<sup>1,2</sup>, Каява А. В.<sup>3</sup>,  
Журавлева Г. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологий, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier, CNRS, Université Montpellier, Montpellier, France

s.bondarev@spbu.ru, stanislavspbg@gmail.com

Амилоиды – это белковые фибриллы, обладающие кросс-β структурой, элементарным компонентом которой является β-арка. Формирование амилоидов в первую очередь связано с изменением структуры одного белка, но уже описан целый ряд случаев, когда в состав агрегатов входят разные белки. Несмотря на уже известное многообразие этого феномена, до недавнего времени отсутствовала единая классификация молекулярных механизмов, которые лежат в его основе. Ранее мы предложили разделить способы взаимодействия белка с амилоидными агрегатами на четыре группы: титрование, секвестрирование, аксиальная и латеральная коагрегация [1]. Учитывая многообразие феномена коагрегации, актуальным является вопрос поиска новых примеров этого явления. Мы предложили биоинформатический подход, названный AmyloComp, для поиска пар белков, способных к аксиальной коагрегации. В его основе лежит следующий принцип: два белка могут формировать единую фибриллу, если они включают фрагменты, образующие «совместимые» β-арки. Программа AmyloComp демонстрирует точность более 94 % на модельном наборе данных, а также адекватно классифицирует известные положительные и отрицательные примеры коагрегации белков [2].

Для экспериментальной проверки коагрегации белков мы разработали тест-систему, основанную на анализе агрегации белка интереса *in vitro* при добавлении в раствор бактериальных клеток с амилоидными агрегатами на поверхности. Эта методика была апробирована на хорошо изученном примере Sup35NM. В первую очередь, мы продемонстрировали, что фибриллы Sup35NM, продуцируемые бактериями, ускоряют агрегацию этого белка *in vitro* [3]. Последующие эксперименты показали, что методика применима и для изучения агрегации гетерологичных белков. Она воспроизводит результаты для двух описанных в литературе примеров: агрегаты Rnq1 стимулируют агрегацию

Sup35NM, в то время как фибриллы  $\alpha$ -синуклеина не обладают подобным эффектом [4].

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (22-74-10042).*

1. Bondarev S., Antonets K., Kajava A., Nizhnikov A., Zhouravleva G., IJMS, 19, 2292 (2018).
2. Bondarev S.A., Uspenskaya M.V., Leclercq J., Falgarone T., Zhouravleva G.A., Kajava A.V., AmyloComp: a bioinformatic tool for prediction of amyloid co-aggregation, JMB, 168437 (2024).
3. Трубицина Н. П., Землянко О. М., Журавлева Г. А., Бондарев С. А., Использование бактериальной системы C-DAG для анализа способности амилоидов индуцировать агрегацию белка *in vitro*, Микробиология, принято в печать (2024).
4. Derkatch I.L., Uptain S.M., Outeiro T.F., Krishnan R., Lindquist S.L., Liebman S.W., Effects of Q/N-rich, polyQ, and non-polyQ amyloids on the *de novo* formation of the [PS<sup>+</sup>] prion in yeast and aggregation of Sup35 *in vitro*, PNAS, 101, 12934–12939 (2004).

## Структура светособирающего комплекса LH2 из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* с разрешением 1,7 Å

Бурцева А. Д.<sup>1,2</sup>, Баймухаметов Т. Н.<sup>3</sup>, Илясов И. О.<sup>1</sup>, Большаков М. А.<sup>4</sup>,  
Ашихмин А. А.<sup>4</sup>, Бойко К. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А. Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

<sup>3</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт фундаментальных проблем биологии РАН Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН, Пущино, Россия

[a.burtseva@fbras.ru](mailto:a.burtseva@fbras.ru)

Основой фотосинтетического аппарата пурпурных фотосинтезирующих бактерий являются светособирающие пигмент-белковые комплексы (LH комплексы). Комплекс LH2 представляет собой мультисубъединичную структуру, элементы которой построены по модульному принципу и содержат несколько полипептидных цепей, бактериохлорофилл, а также каротиноиды. При этом количество субъединиц в таких комплексах может быть различно. В связи с этим знания о структурной организации комплексов LH2 из различных организмов, а также о функциональной роли отдельных молекул, образующих эти комплексы, представляют фундаментальный научный интерес.

На сегодняшний день известны три пространственные структуры LH2 комплексов из пурпурных несерных бактерий [1–3]. В то же время для пурпурных серных бактерий подобные данные высокого разрешения до сих пор неизвестны [4, 5].

Настоящая работа посвящена исследованию пространственной архитектуры LH2 из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* методом крио-ЭМ. Экспериментальные данные были получены с помощью просвечивающего криоэлектронного микроскопа Titan Krios 60-300 (НИЦ «Курчатовский институт»). Полученная структура комплекса LH2 с разрешением 1,7 Å демонстрирует характерную архитектуру для объектов данного типа. Выявлены ключевые структурные особенности комплекса, определяющие его спектральные свойства, а также проведен сравнительный анализ с известными структурами светособирающих комплексов пурпурных бактерий.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00062).*

1. McDermott G., Prince S.M., Freer A.A. *et al.*, Nature, 374 (1995).
2. Коепке J., Hu X., Muenke C. *et al.*, Structure, 4 (1996).
3. Papiz M.Z., Prince S.M., Howard T. *et al.*, Journal of Molecular Biology, 326 (2003).
4. Leiger K., Linnanto J.M., Ratsep M. *et al.*, The Journal of Physical Chemistry, 123 (2019).
5. Бурцева А. Д., Баймухаметов Т. Н., Илясов И. О. и др., Кристаллография, 68, 6 (2023).

## **Множественные аномалии метилирования генов в ворсинах хориона спонтанных абортусов**

*Васильева О. Ю., Саженова Е. А., Никитина Т. В., Толмачева Е. Н.,  
Васильев С. А.*

*Научно-исследовательский институт медицинской генетики  
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН,  
Томск, Россия*

*oksana.vasilyeva@medgenetics.ru*

Гибель эмбрионов в первом триместре беременности связывается в первую очередь с анеупloidией по различным хромосомам. Одной из наиболее частых анеупloidий в первом триместре беременности является трисомия 16. Помимо цитогенетических аномалий при патологиях беременности отмечаются и эпигенетические нарушения, включая аномалии метилирования генов [1].

Целью настоящей работы стал анализ распространенности нарушений метилирования генов, нарушения метилирования которых характерны для различных патологий беременности, в ворсинах хориона спонтанных абортусов первого триместра беременности с нормальным кариотипом и с трисомией 16.

Анализ профиля метилирования 7 генов (*ADORA2B, NPR3, PRDM1, PSG2, PHTLH, SV2C, TICAM2*) был проведен с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования в ворсинах хориона медицинских абортусов ( $n = 10$ ), спонтанных абортусов первого триместра беременности с нормальным кариотипом ( $n = 33$ ), трисомией 16 ( $n = 14$ ). У большинства спонтанных абортусов с трисомией 16 (79 %) было выявлено множественное нарушение метилирования одновременно по нескольким исследованным генам. В ворсинах хориона каждого анализируемого спонтанного абортуса с трисомией 16 было выявлено гиперметилирование по одному или более исследованным генам. В группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом нарушение метилирования менее выражено по сравнению с группой с трисомией 16 – множественное метилирование генов наблюдалось у 48 % образцов.

Ранее нашей группой также были выявлены множественные нарушения импринтированных генов у спонтанных абортусов [2]. По-видимому, множественные нарушения метилирования генов в ворсинах хориона не ограничиваются только импринтированными генами, а охватывают гораздо больший спектр генов.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда  
№ 23-15-00341.*



1. Wang W.J. *et al.*, Genome-wide placental gene methylations in gestational diabetes mellitus, fetal growth and metabolic health biomarkers in cord blood. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 13 (2022).
2. Sazhenova E.A., Skryabin N.A. *et al.*, Multilocus epimutations of imprintome in the pathology of human embryo development. *Molecular Biology*. 46 (2012).

## Разработка систем доставки малых интерферирующих РНК на *in vitro* модели хронического миелолейкоза

Высочинская В. В.<sup>1,2</sup>, Забродская Я. А.<sup>1,2</sup>, Довбыш О. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

veravv2509@gmail.com

Применение малых интерферирующих РНК (миРНК) для специфического подавления экспрессии химерного онкогена *BCR-ABL*, играющего ключевую роль в основе патогенеза хронического миелолейкоза (ХМЛ), является перспективным направлением разработки препаратов для таргетной терапии ХМЛ. Однако для успешного внедрения в клиническую практику технологий на основе миРНК, основной задачей остается разработка эффективной системы их доставки в клетки-мишени.

В исследовании в качестве средств доставки противоопухолевой миРНК были использованы и сравнены проникающий в клетку эндосомолитический пептид EB1 и оригинальные катионные липосомы на основе катионного амфифила 1,26-бис(холест-5-ен-3 $\beta$ -илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорида (2X3) [1] и цвиттерионного липида DOPE, модифицированных DSPE-PEG<sub>2000</sub> (2X3-DOPE-PEG). Оба подхода обеспечивают эффективную внутриклеточную доставку миРНК, при этом катионные липосомы 2X3-DOPE-PEG демонстрируют более высокую эффективность. Было продемонстрировано, что ПЭГ-модификация липосом 2X3-DOPE обеспечивает высокую эффективность трансфекции, выход миРНК из эндосом, сайленсинг таргетного гена *BCR-ABL* и противоопухолевый эффект. Кроме того, мы обнаружили, что пегилирование липосом 2X3-DOPE, обычно используемое для повышения эффективности доставки нуклеиновых кислот липосомами *in vivo*, не только не снижает эффективность доставки *in vitro*, но приводит к увеличению эффективности трансфекции миРНК по сравнению с непегилированными липосомами в клетках K-562 [2]. Таким образом, липосомы 2X3-DOPE-PEG могут быть рекомендованы в качестве эффективных средств доставки терапевтических миРНК.

1. Petukhov I.A. *et al.* Synthesis of polycationic lipids based on cholesterol and spermine // Russian Chemical Bulletin. Springer, 2010. V. 59, No. 1. P. 260–268.

2. Vysochinskaya V.V. *et al.* Cell-penetrating peptide and cationic liposomes mediated siRNA delivery to arrest growth of chronic myeloid leukemia cells *in vitro* // Biochimie, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.01.006>

## **Влияние мутаций в трансмембранном домене рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR) на активацию рецептора**

*Гавриленкова А. А.<sup>1,2</sup>, Деев И. Е.<sup>2</sup>, Бочаров Э. В.<sup>1,2</sup>, Серова О. В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия*

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

*alycat1008@gmail.com*

Рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR) – это рецепторная тирозинкиназа, которая играет ключевую роль в росте, дифференцировке и старении клеток. На данный момент точные механизмы активации и передачи внутриклеточного сигнала семейства рецепторов инсулина не известны. Предполагается, что в неактивном состоянии ТМ-домены рецептора инсулиноподобного фактора роста находятся в конформации, препятствующей взаимодействию цитоплазматических частей молекулы. При связывании лиганда, конформация рецептора меняется, в результате внутриклеточные тирозинкиназные домены сближаются и фосфорилируют друг друга, вызывая клеточный ответ [1].

Для того чтобы изучить роль трансмембранного домена в активации рецептора IGF-IR, нами были получены мутантные формы рецептора, содержащие двойные замены в трансмембранном домене. Клетки линии HEK293 трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими мутантные формы IGF-IR с заменами V941E-A942R; V948E-G949R; G949E-G950R. Затем клетки инкубировали в среде F-12, с добавлением инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-I), клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота. В результате эксперимента мы получили следующие данные. Мутантные формы IGF-IR V941E-A942R и V948E-G949R не экспрессировались в клеточной линии HEK293. Двойная замена G949E-G950R приводила к фосфорилированию рецептора в отсутствие лиганда в отличие от рецептора дикого типа, который фосфорилируется только в присутствии IGF-I. Мы предполагаем, что двойная замена G949E-G950R приводит к стабилизации димера рецептора в активной конформации, за счет образования солевых мостиков в трансмембранном домене, и к автофосфорилированию рецептора в отсутствие лиганда.

Исходя из полученных данных мы можем сделать вывод о том, что трансмембранный домен играет важную роль в активации IGF-IR, и даже

точечные замены в его аминокислотной последовательности, могут приводить к изменению характера активации рецептора.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 23-74-00024.*

1. Kuznetsov A.S. *et al.* Dimeric states of transmembrane domains of insulin and IGF-1R receptors: Structures and possible role in activation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2020. V. 1862. No. 11. P. 183417.

## **Противовирусная активность мРНК, кодирующей укороченные внутриклеточные антитела к нуклеопротеину вируса гриппа В, *in vitro***

Гаврилова Н. В.<sup>1,2</sup>, Высочинская В. В.<sup>1,2</sup>, Ложков А. А.<sup>1,2</sup>, Добровольская О. А.<sup>1</sup>,  
Циммерман Е. Л.<sup>1,2</sup>, Елпаева Е. А.<sup>1</sup>, Забродская Я. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

*daughtervgater@gmail.com*

В настоящее время грипп остается актуальной проблемой здравоохранения. Из-за достаточно высокого темпа мутаций вируса гриппа к уже существующим противовирусным препаратам быстро вырабатывается устойчивость. Разработка терапевтических антител является многообещающим решением для лечения гриппозной инфекции.

В качестве терапевтического препарата в ходе данной работы были созданы мРНК, кодирующие Fab-фрагмент специфических внутриклеточных антител к нуклеопротеину вируса гриппа В (мРНК-short 2/3). Для проверки противовирусного действия мРНК доставляли в клетки MDCK при помощи оригинальных липосом 2x3-DOPE 1:3 [1] в профилактической и в лечебной схемах введения. Противовирусную активность комплексов мРНК с липосомами определяли в отношении вирусов гриппа В двух эволюционных линий (В/Austria/1359417/2021 – викторианская линия и В/Phuket/3073/2013 – ямагатская линия) через 24 и 48 часов после заражения при помощи ИФА *In-cell* и РГА. В качестве препарата сравнения с доказанным противовирусным действием использовали Занамивир.

Согласно полученным данным мРНК-2/3-short обладают противовирусной активностью в отношении вируса гриппа В викторианской линии не только в профилактической, но и в лечебной схемах введения.

Таким образом, в результате данной работы была показана возможность использования мРНК, кодирующих специфические антитела, для ингибирования репликации вируса гриппа *in vitro*. В дальнейшем полученные мРНК-2/3-short могут быть исследованы в экспериментах *in vivo* на модели гриппозной инфекции у мышей.

*Работа поддержана Государственным заданием Минздрава России № TVKQ-2024-0006.*

1. Vysochinskaya V. *et al.* Influence of Lipid Composition of Cationic Liposomes 2X3-DOPE on mRNA Delivery into Eukaryotic Cells // *Pharmaceutics*. 2022. V. 15. P. 8.

## **Везикулы грейпфрута, нагруженные экзогенным HSP70, активируют противоопухолевый иммунитет *in vivo***

*Гараева Л. А.<sup>1</sup>, Комарова Е. Ю.<sup>2</sup>, Емельянова С. С.<sup>1</sup>, Никитина А. В.<sup>1</sup>,  
Гужова И. В.<sup>2</sup>, Маргулис Б. А.<sup>2</sup>, Коневега А. Л.<sup>1, 3, 4</sup>, Штам Т. А.<sup>1, 2, 3</sup>*

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

*garaeva\_la@nrci.nrci.ru*

Растительные везикулы рассматриваются в качестве альтернативных синтетическим наночастицам доставщиков терапевтических биомолекул [1, 2], в том числе для лечения опухолевых заболеваний. Одним из перспективных методов терапии злокачественных новообразований является активация противоопухолевого иммунитета на основе экзогенного белка HSP70, который при доставке в опухолевые клетки способен спровоцировать активацию цитотоксических лимфоцитов [3]. Эффективную же доставку HSP70 к опухолевым клеткам потенциально можно было бы осуществить при помощи растительных везикул.

Апробацию потенциала везикул грейпфрута для доставки терапевтического белка проводили на двух моделях опухолей, СТ-26 (аденокарцинома кишечника мыши) и В16 (меланома мыши). Поскольку прививаемые опухоли обладают различной локализацией использовали два способа введения белка HSP70 в составе GEVs. Так для формирования опухолевого узла, клетки СТ-26 прививали подкожно мышам BALB/c совместно с GEVs, предварительно нагруженными белком HSP70. Для формирования модели меланомы клетки В16 были привиты подкожно мышам BALB/c и спустя 5 дней после инъекции опухолевое новообразование наружно обрабатывали гидрогелем [4] с нагруженными белком HSP70 GEVs каждые 3 дня. Измерения размеров и веса опухолей проводили в обоих опытах по истечении 21 дня. Для целевой группы мышей с привитыми клетками СТ-26 было показано увеличение продолжительности жизни и уменьшение размера опухоли в 3 раза, а также снижение уровня факторов TGFB1, IL-10 в плазме крови. Для модели меланомы В16 было показано уменьшения массы опухолевого новообразования в 20 раз для данной группы животных относительно четырех групп сравнения.



На системе xCelligence как для опухолей СТ-26, так и В16 было продемонстрировано вовлеченность CD8+Т-лимфоцитов в наблюдаемые на животных моделях противоопухолевые эффекты.

На основе полученных данных можно заключить, что GEVS, нагруженные HSP70, способствуют активации противоопухолевого иммунитета *in vivo*.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-20146-п).*

1. Shah S., Dhawan V. *et. al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 154–155:102–122 (2020).
2. Lian M.Q., Chng W.H. *et. al.*, *J. Extracell. Vesicles*. 11:12283 (2022).
3. Guzhova I. *et. al.*, *Hum Vassin Immunother*. 2, 12(10): 2529–2535 (2016).
4. Abkin S., Ostroumova O. *et. al.*, *Cancer Immunol Immunother*. 65:83–92 (2016).

## Способ идентификации ингибиторов SrtA из *Staphylococcus aureus* по данным флуоресцентной спектрометрии

Гараева Н. С.<sup>1,2</sup>, Кучаев Е. С.<sup>2</sup>, Валидов Ш. З.<sup>2</sup>, Юсупов М. М.<sup>2,3</sup>, Усачев К. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

<sup>3</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch, France

*Staphylococcus aureus* – грамположительная условно-патогенная бактерия, относящаяся к числу наиболее известных причин внутрибольничных бактериальных инфекций. Наряду с бактериостатическим методом борьбы с подобными микроорганизмами, где антибиотики целенаправленно нарушают работу бактериальной рибосомы, используется бактерицидный, где гибель бактериальных клеток является следствием ингибирования жизненно важных процессов внутриклеточного метаболизма, таких как синтез нуклеиновых кислот, белков и компонент клеточной стенки. Второй подход включает в себя снижение вирулентности бактерии без подавления ее роста, тем самым не вызывая развитие устойчивости к антибиотикам. Бактериальный фермент сортаза А (SrtA) закрепляет большинство белков, связанных с вирулентностью, на клеточной стенке бактерий и является перспективной мишенью для разработки антивирулентных препаратов [1, 2].

Сортаза А (SrtA) – это мембраносвязанная цистеиновая транспептидаза, присутствующая в большинстве грамположительных бактерий. Она катализирует ковалентное прикрепление поверхностных белков к клеточной стенке бактерий, включая факторы вирулентности, такие как MSCRAMMs. Механизм действия сортазы А золотистого стафилококка основан на специфическом распознавании последовательности LPXTG (где X – любой аминокислотный остаток) на С-конце поверхностного белка, расщеплении данного участка между остатками треонина и глицина, последующего переноса N-концевого трансмембранного домена на аминогруппу пентаглицинового соединительного линкера и таким образом закрепления белков с данным мотивом на поверхности клеток [3].

Для изучения активности сортазы и тестирования ее потенциальных ингибиторов была разработана цельноклеточная тест-система, в основе которой лежит регистрация сигнала флуоресценции белка GFP с добавленным к его последовательности мотивом LRGTG, распознающимся сортазой А.

Детектируя уровень флуоресценции при инкубировании такого белка с культурой клеток *S. aureus*, можно оценить активность ингибиторов.

*Исследования выполнены за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.*

1. Sitah Alharthi et al. // Drug Discovery Today. 26, 2164 (2021).
2. Кудрявцев К. В. и др. // Химико-фармацевтический журнал. 55, 3 (2021).
3. Hendrickx A.P. // Nat. Rev. Microbiol. 9, 166 (2011).

## Структурные исследования пептидомиметика Kud146-RDA методами спектроскопии ЯМР

Гималетдинова А. Э.<sup>1,2</sup>, Кучаев Е. С.<sup>2</sup>, Гараева Н. С.<sup>1,2</sup>, Рябов С. А.<sup>1,2</sup>,  
Глазырин М. С.<sup>1,2</sup>, Юсупов М. М.<sup>2,3</sup>, Усачев К. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр  
Российской академии наук», Казань, Россия

<sup>3</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg,  
Illkirch, France

[gimaletdinova\\_2001@mail.ru](mailto:gimaletdinova_2001@mail.ru)

Грамположительные бактерии, такие как *Staphylococcus aureus*, способны вызвать гнойно-воспалительные процессы во всех органах человеческого организма. Долгое время борьба с подобными бактериями была основана на подавлении или уничтожении патогенов. Однако подобный метод приводит к отрицательным последствиям для организма носителя вредоносной бактерии, а также развитию резистентности бактерии. Альтернативный подход основан на снижении вирулентности без подавления роста, что способствует развитию в организме механизмов сопротивления. Подобными антибактериальными средствами являются ингибиторы сортазы [1, 2].

Фермент сортазы способствует ковалентному прикреплению белков к клеточной стенке и сборке фимбрии у грамположительных бактерий. Ингибиторы также имеют облегченный доступ к сортазе, так как она локализуется поверхностно. Пептидомиметик (S)-4-(((S)-1-карбоксиэтил)амино)-3-((S)-2-((2R,3S,5S)-2-(4-фторфенил)-5-(метоксикарбонил)-1,5-диметилпирролидин-3-карбоксамидо)-5-гуанидинопентанамидо)-4-оксобутановая кислота (Kud146-RDA) был разработан на основе последовательности олигопептида LPDRA, для которого ранее была показана активность в отношении ингибирования сортазы А. Так как сортаза А не является важным компонентом роста бактерии, ее ингибирование не приводит к устойчивости патогена [2, 3].

Данная работа посвящена структурным исследованиям пептидомиметика Kud146-RDA методами спектроскопии ЯМР высокого разрешения. Отнесение сигналов в спектрах к соответствующим магнитным ядрам <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C и <sup>15</sup>N проводили на основе результатов двумерных гомоядерных <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H DQF-COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY и гетероядерных ЯМР <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBSC корреляционных экспериментов. Для получения ограничений по расстояниям была проведена серия двумерных ЯМР экспериментов <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY с

различным временем смешивания. Расчет структуры пептидомиметика Kud146-RDA осуществлялся методом молекулярной динамики в программе XPLOD-НН.

*Исследования выполнены за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.*

1. Cascioferro S. *et al.*, *Microb. Pathog.*, 105, 77 (2014).
2. Кудрявцев и др., *Химико-фармацевтический журнал*, 3–9, 55(8) (2021).
3. Jacobitz A.W. *et al.*, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, 223, 109 (2017).

## Клонирование метилтрансферазы RsmA из *Staphylococcus aureus*

Глазырин М. С.<sup>1,2</sup>, Гараева Н. С.<sup>1,2</sup>, Рябов С. А.<sup>1,2</sup>, Гималетдинова А. Э.<sup>1,2</sup>,  
Юсупов М. М.<sup>2,3</sup>, Усачев К. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр  
Российской академии наук», Казань, Россия

<sup>3</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg,  
Illkirch, France

glazyri16m@gmail.com

Проблема устойчивости патогенных микроорганизмов к антибиотикам на данный момент стоит достаточно остро [1]. К опасным и распространенным патогенам относится золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), некоторые штаммы которого обладают множественной устойчивостью к антибиотикам (MRSA, VRSA) [2]. Этот микроорганизм чаще всего является возбудителем целого ряда инфекций сердечно-сосудистой системы [3].

Воздействовать на устойчивую к антибиотикам бактерию можно, влияя на ее белоксинтезирующий аппарат, основой которого является рибосома [4]. Биогенез рибосомы представляет собой строго определенный по последовательности многоступенчатый процесс, регулируемый белковыми факторами сборки. Одним из таких факторов сборки является метилтрансфераза RsmA, которая катализирует метилирование N-концевого аденина в 16S рРНК. RsmA также является одним из факторов, задерживающих позиционирование спирали h44 на поверхности 30S-субъединицы. Делеция гена *rsmA* снижает функциональную активность рибосом в окислительных условиях и соответственно снижают вирулентность *S. aureus* [5–7]. Таким образом, белок RsmA выполняет регуляторную и структурную функции, отвечающие за формирование рибосомы и регулирование процесса трансляции. Дальнейшее изучение структуры RsmA и его комплекса с 30S субъединицей из *S. aureus* позволит разработку новых противомикробных агентов, приводящих к гибели бактерии.

В рамках данной работы нами были оптимизированы условия проведения ПЦР для амплификации гена *rsmA* из *S. aureus*, а также получена плаزمида со вставкой данного гена.

Исследования выполнены за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

1. Subramaniam G., *The Indian Journal of Pediatrics*. 87 (2020), 937.
2. Wilson D., *Nature Reviews Microbiology*. 12 (2014), 35.
3. Воробьева Л. Л., *Цифровая наука*. 2(2021), 4.
4. Спирин А. С., *Соросовский образовательный журнал*. 11(1998), 65.
5. Kuma T., *Biochimie*. 119 (2015), 8.
6. Yang Liu, *Structural Biology Communications*. 71 (2015), 3.
7. Schedlbauer A., *Science Advances*. 7 (2021), 16.

## Внедрение органических отходов в технологию биостабилизации почвы

Головкина Д. А.<sup>1,2</sup>, Журишкина Е. В.<sup>1,2</sup>, Лапина И. М.<sup>1,2</sup>, Кульминская А. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> «Курчатовский геномный центр – ПИЯФ», Гатчина, Россия

golovkina\_da@pnpi.nrcki.ru

В последние десятилетия заметно усилилась тенденция к использованию экологически чистых материалов и технологий в сфере гражданского строительства. Особый интерес вызывает использование технологии микробно-индуцированного осаждения карбоната кальция. Главным образом, его привлекательность обусловлена простотой и экологичностью [1]. В связи с ростом уровня благосостояния в промышленно развитых странах увеличивается объем органических отходов. Для увеличения оборота утилизации промышленного мусора представляется целесообразным его использование в технологии биостабилизации почвы. Так, армирование грунта натуральными волокнами имеет потенциал по сравнению с традиционными методами благодаря экологичности и экономической эффективности [2].

Целью данной работы была попытка внедрить органические отходы на нескольких этапах технологии уплотнения грунта с помощью бактерий. На первой стадии, для культивирования микроорганизмов, стандартные компоненты питательной среды (пептон и дрожжевой экстракт) заменили на экстракт из отработанных пивных дрожжей (среда ВУ). Концентрация биомассы бактериальных штаммов увеличилась в 1,5 раза по сравнению с контрольной средой LB. Уреазная активность штаммов *B. subtilis* K51 и *B. subtilis* 168 при росте на среде ВУ значительно увеличилась по сравнению с контрольной, в то время как у штаммов *B. cereus* 4b и *M. luteus* 6 показатели активности были сопоставимы на обеих средах.

На второй стадии эксперимента для дополнительного армирования почвы были добавлены целлюлозосодержащие отходы нескольких производств (измельченная макулатура, опилки и льняная костра). Добавление макулатуры в почву, обработанную с помощью бактерий, увеличило показатели прочности в 2 раза и содержания карбоната кальция в 1,5 раза по сравнению с образцом почвы без добавок.

*Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, соглашение № 075-15-2019-1663.*



1. Liu B., Xie Y.-H., Tang C.-S., Pan X.-H., Jiang N.-J., Singh D.N., Cheng Y.-J., Shi B. Bio-Mediated Method for Improving Surface Erosion Resistance of Clayey Soils. *Eng. Geol.* 2021, 293, 106295.
2. Srivastava R.K., Shetti N.P., Reddy K.R., Aminabhavi T.M. Sustainable Energy from Waste Organic Matters via Efficient Microbial Processes. *Sci. Total Environ.* 2020, 722, 137927.

## Ксеноприн – новый пропептидоподобный ингибитор металлопротеаз из *Xenorhabdus nematophila*

Гольдин И. В., Чухонцева К. Н., Бердышев И. М., Демидюк И. В.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
Москва, Россия

goldinasveta@yandex.ru

Протеализинподобные протеазы (ППП) являются группой цинковых металлопротеаз из семейства M4. Гены ППП в геномах бактерий колокализированы с генами эмпориноподобных ингибиторов (ЭПИ), регулирующих активность ППП [1]. Однако у представителей рода *Xenorhabdus*, имеющих гены ППП, гены ЭПИ отсутствуют. Их место занято генами гипотетических белков, гомологичных пропептидам ППП. Поскольку известно, что пропептиды протеаз могут выполнять функцию внутримолекулярных ингибиторов [2], мы предположили, что эти гипотетические белки, как и ЭПИ, являются ингибиторами ППП.

Для проверки предположения, ген гипотетического белка из *X. nematophila* был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli*. Рекомбинантный белок, названный нами ксеноприном (Xin), был выделен в электрофоретически гомогенном виде с помощью катионообменной и гельпроникающей хроматографии.

Ингибирующая активность Xin по отношению к протеализину и термолизину (ферменту, относящемуся к семейству M4, но не являющемуся ППП), была оценена с использованием флуорогенного субстрата с внутренним тушением флуоресценции [3, 4]. Было показано, что Xin является сильным неконкурентным ингибитором протеализина ( $K_i = 6 \pm 2$  нМ), однако не способен подавлять активность термолизина.

Олигомерная организация Xin была изучена с помощью гельпроникающей хроматографии, а стехиометрия взаимодействия с протеализином – с помощью титрования активных центров фермента ингибитором. Полученные данные указывают на то, что в растворе Xin находится в форме димера, который способен связываться только с одной молекулой фермента.

Таким образом, Xin – первый пропептидоподобный ингибитор металлопротеаз; ранее были опубликованы данные только о гомологичных пропептидам ингибиторах сериновых и цистеиновых протеаз. Xin является селективным ингибитором ППП, а произошедшая у бактерий рода *Xenorhabdus* замена гена ЭПИ на ген другого белкового ингибитора, по-видимому,

свидетельствует о том, что для реализации биологических функций ППП необходима ассоциация с ингибитором.

1. Chukhontseva K.N. *et al.*, Int. J. Biol. Macromol. 169 (2021).
2. Demidyuk I.V. *et al.*, Biomol. Concepts. 1, 3–4 (2010).
3. Karaseva M.A. *et al.*, Sci. Rep. 9, 1 (2019).
4. Berdyshev I.M., Karaseva M.A., Demidyuk I.V. Bio Protoc. 12, 19 (2022).

## Анализ химической структуры макролактина А из *Bacillus velezensis* методом спектроскопии ЯМР

Гонялин В. Е.<sup>1,2</sup>, Гараева Н. С.<sup>1,2</sup>, Егорова П. В.<sup>1,2</sup>, Васильченко А. С.<sup>3</sup>,  
Юсупов М. М.<sup>1,4</sup>, Усачев К. С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>3</sup> Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

<sup>4</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch, France

gonaylinslava@gmail.com

Антимикробные метаболиты бактерий рода *Bacillus* составляют действующую основу различных биопестицидов. Одним из видов бацилл, проявляющих антагонизм в отношении фитопатогенных микроорганизмов, является *B. velezensis* X-BIO-1, его геном содержит несколько кластеров биосинтеза различных антимикробных веществ [1]. Для исследования химического состава антибактериальной составляющей метаболитов, был проведен масс-спектрометрический анализ, который показал наличие в смеси макроциклических антибиотиков макролактинов А, J, I. Макролидный антибиотик макролактин А (МкА) известен своими антимикробными свойствами еще с конца 1980-х годов, однако механизм его антибактериального действия до сих пор неизвестен.

Для подтверждения данных масс-спектрометрии и исследования структуры МкА, образец был проанализирован методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

Для проведения экспериментов по ЯМР-спектроскопии лиофилизированный образец макролактина растворяли в 99,95 % MeOH-d<sub>4</sub>. Все 1D и 2D ЯМР-эксперименты проводились на спектрометре Bruker Avance III HD 700 МГц с криодатчиком QCI при 298 К. Отнесение сигналов в спектрах к соответствующим магнитным ядрам проводили на основе результатов одномерных <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C экспериментов и двумерных <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC и HMBSC экспериментов. Обработку спектров проводили с помощью программного обеспечения Bruker Topspin (v. 3.6.3) и анализировались в программе CcpNmr Analysis [2].

Значения химических сдвигов макролактина А в MeOH-d<sub>6</sub>, полученного из штамма *Bacillus velezensis* X-Bio-1, совпадали с предыдущими данными для

макролактина А из *Bacillus subtilis* DSM 16696 [3]. Таким образом данные спектроскопии ЯМР подтвердили, что метаболит из штамма *Bacillus velezensis* X-Bio-1 является макролактином А.

*Исследования выполнены за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.*

1. Kravchenko S.V. *et al.*, // Microbiology resource announcements 50, 9 (2020).
2. Vranken W.F. *et al.*, // Proteins 687, 59 (2005).
3. Romero-Tabarez M. *et al.* // Microbiology resource announcements 1701, 50 (2006).

## Антибиотик терморубин ингибирует элонгацию трансляции

Грачев А. А.<sup>1,2</sup>, Толичева О. А.<sup>1</sup>, Полесскова Е. В.<sup>1,2</sup>, Коневега А. Л.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва,  
Россия

grachev\_aa@pmpi.nrcki.ru

Трансляция, проходящая на рибосомах с вовлечением широкого спектра белков и различных молекул РНК, является сложным многостадийным процессом. Нарушение работы системы биосинтеза белка может оказаться фатальным для клеток, в том числе и бактериальных. Механизм действия половины антибактериальных соединений направлен на ингибирование одного или нескольких этапов синтеза полипептидов [1]. Широкое, зачастую бесконтрольное, применение антибактериальных препаратов, в том числе в качестве превентивной меры, стимулирует развитие и распространение резистентных и суперрезистентных штаммов бактерий. Поэтому поиск новых природных и синтетических антибиотиков, а также изучение механизмов их действия являются одной из наиболее актуальных задач науки о жизни.

Терморубин – низкомолекулярный ингибитор биосинтеза белка прокариот. Механизм действия данного антибиотика до конца не изучен, известно, что он нарушает биосинтез белка и грамположительных, и грамотрицательных бактерий. В данной работе показано влияние антибиотика на кинетику реакций цикла элонгации в реконструированной *in vitro* системе трансляции *E. coli*. Была показана разница в скорости А сайтового связывания тРНК с различными антикодонами и нуклеотидами в 37 положении в присутствии терморубина, что может говорить о кодон-специфичном действии данного антибиотика на бактериальную систему трансляции. Методом криоэлектронной микроскопии показаны изменения в структурной организации 23S рРНК в декодирующем сайте рибосомы. Это приводит к потере водородной связи между рРНК и 37 нуклеотидом тРНК. Данное положение молекул тРНК является гипервариабельным в отношении модификаций азотистых оснований и играет важную роль в кинетике и стабильности взаимодействия тРНК с А сайтом [2]. Также был показан эффект терморубина на стабильность связывания пептидил-тРНК с А сайтом элонгирующей рибосомы [3].

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00278).*

1. Arenz S., Wilson D.N. Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition // Cold spring harbor perspectives in medicine. – 2016. – V. 6. – No. 9. – P. a025361.
2. Konevega A.L. *et al.* Purine bases at position 37 of tRNA stabilize codon–anticodon interaction in the ribosomal A site by stacking and Mg<sup>2+</sup>-dependent interactions // Rna. – 2004. – V. 10. – No. 1. – P. 90–101.
3. Paranjpe M.N. *et al.* Insights into the molecular mechanism of translation inhibition by the ribosome-targeting antibiotic thermorubin // Nucleic acids research. – 2023. – V. 51. – No. 1. – P. 449–462.

## Геномный поиск биосинтетических кластеров линаридинов: первичная характеристика нового антибиотика ронаридина

Григорьева А. А.<sup>1,2</sup>, Андреева Ю. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

*anastasiia.grigoreva@skoltech.ru*

Поиск и разработка новых антибактериальных препаратов является актуальной мировой задачей из-за распространения бактериальной резистентности. Одним из перспективных классов соединений в этой области являются рибосомально синтезируемые и посттрансляционно модифицируемые пептиды (RiPP), в силу разнообразия их структур и видов биологической активности [1]. Линаридины – семейство линейных пептидов, содержащих дегидратированные аминокислоты, по своей структуре напоминающие лантипептиды, широко изученные и применяемые в промышленности антибиотики [2]. В данной работе был реализован пайплайн для проведения геномного поиска биосинтетических кластеров, кодирующих линаридины, оптимизированный для получения большего количества разнообразных кластеров линаридинов. Протокол использует биоинформатические алгоритмы PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST), RODEO (Rapid ORF Description & Evaluation Online) и сервис antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell) [3–5]. В результате были отобраны и описаны наиболее перспективные, ранее неизвестные кластеры, потенциально кодирующие линаридины, обнаруженные в геномах *Rothia dentocariosa* ATCC 17931 рода *Rothia*, *Streptomyces bikiniensis* и *Streptomyces xiamenensis* рода *Streptomyces*.

В ходе дальнейшего изучения кластера, закодированного в геноме *Rothia dentocariosa*, были подобраны оптимальные условия наработки, выделения и очистки пептидного продукта кластера, сочетающие методы катионообменной очистки и хроматографии на C18 колонке. Первичное структурное исследование методом тандемной масс-спектрометрии подтвердило линаридиновую природу производимого продукта, антимикробная активность которого была определена против панели лабораторных штаммов. Новый линаридин, обладающий антимикробной активностью, был назван ронаридином.

*Исследование выполнено за счет Российского научного фонда, грант № 22-24-00684.*

1. Arnison P.G., Bibb M.J. *et al.* Nat Prod Rep. 2013 Jan; 30(1):108–60.



2. Repka L.M., Chekan J.R. *et al.* Chem Rev. 2017 Apr 26; 117(8):5457–5520.
3. Altschul S.F., Madden T.L. *et al.* Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1; 25(17):3389–402.
4. Tietz J.I., Schwalen C.J. *et al.* Nat Chem Biol. 2017 May; 13(5):470–478.
5. Blin K., Shaw S. *et al.* Nucleic Acids Res. 2021 Jul 2; 49(W1):W29-W35.

## Влияние мутаций в гене РНК-связывающего белка Dm NXF1 на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*

Грудкова Д. М., Голубкова Е. В.

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

*dashka.gru@mail.ru*

Ген *Dm nxf1* (*nuclear export factor1*) – это наиболее древний эволюционно консервативный ген семейства *nxf*, который отвечает за транспорт всех типов мРНК из ядра в цитоплазму. Один из транскриптов гена в результате альтернативного сплайсинга сохраняет интрон, содержащий консервативные последовательности, что предполагает их адаптивное значение и функциональную значимость. Транскрипты с интроном в большей степени найдены в голове взрослых мух, кроме того, белок NXF1 присутствует в цитоплазме нервных клеток, сохраняет связь с определенными мРНК, что говорит о его органо-специфичности. Локальная трансляция белка в компартментах мозга свидетельствует о его участии в формировании внутренней структуры мозга и установлении их границ, в частности медуллы и эллипсоидного тела зрительной системы дрозофилы.

Белок NXF1 участвует в таких жизненно важных процессах как формирование цитоскелета в отростках нервных клеток и веретена деления в синцитиальных эмбрионах дрозофилы. Таким образом, ген *Dm nxf1*, экспрессируясь в нервных клетках, участвует в жизненно важных процессах. Мы предполагаем, что мутации в гене РНК-связывающего белка оказывают существенное влияние на продолжительность жизни особей и процессы старения.

Ген *Dm nxf1* локализован в X-хромосоме. Для него существует исторически сложившееся название – *sbr* – *small bristles*, т. к. ген изначально был открыт у мутантных дрозофил, имеющих маленькие щетинки. В данной работе используется именно это название, поскольку оно является синонимичным.

Анализ продолжительности жизни проводился на мухах различных генотипов с разными сочетаниями мутантных аллелей с учетом дозы гена: ♀*sbr*<sup>12</sup>/FM6, ♀*sbr*<sup>5</sup>/FM6, ♂*sbr*<sup>12</sup>/YDp+, ♀FM6 и ♂FM6, ♀*sbr*<sup>del</sup>/FM6 и аллелей дикого типа Oregon-R и Conton-S. Результаты показали, что среди линий, в которых рассмотрены и мужские и женские особи, продолжительность жизни самцов всегда превышает этот показатель у самок. У мух *sbr*<sup>5</sup>/FM6 и *sbr*<sup>del</sup>/FM6 (с делецией), наблюдается тенденция к снижению максимальной

продолжительности жизни. В гомозиготе мутации *sbr<sup>12</sup>* и *sbr<sup>5</sup>* летальны. Однако продолжительность жизни гетерозиготных самок близка к таковой у дикого типа. Мутации влияют на структуру белка (SBR<sup>12</sup> – делеция 10 аминокислот, SBR<sup>5</sup> – 57), повреждая NTF2-связывающий домен и укорачивая белок. Нарушаются белок-белковые взаимодействия. Мы наблюдаем частичное снижение продолжительности жизни самок *sbr<sup>12</sup>/FM6*, однако не столь значительное, как у *sbr<sup>5</sup>/FM6*. Скорее всего, эффект мутации *sbr<sup>5</sup>* вызван большей делецией, которая сильно изменяет структуру белка и ведет к потере или изменению его функций.

1. Mamon L.A., Kliver S.F., Prosovskaya A.O., Ginanova V.R., Golubkova Ye.V. The intron-containing transcript: an evolutionarily conserved characteristic of the genes orthologous to *nxf1* (nuclear export factor 1) // *Rus. J. Genet. Applied Research*. 2014. V.4. № 5. P.434–443.
2. Mamon L., Yakimova A., Kopytova D., Golubkova E. The RNA-Binding Protein SBR (Dm NXF1) Is Required for the Constitution of Medulla Boundaries in *Drosophila melanogaster* Optic Lobes // *Cells*. 2021. 10:1144. <https://doi.org/10.3390/cells10051144> WOS, SCOPUS, Q2, Impact Factor: 7.666.
3. Mamon L.A., Ginanova V.R., Kliver S.F., Yakimova A.O., Atsapkina A.A., Golubkova E.V. RNA-binding proteins of the NXF (nuclear export factor) family and their connection with the cytoskeleton // *Cytoskeleton*. 2017. V.74 (4). P.161–169. DOI: 10.1002/cm.21362.
4. Mamon L.A., Kliver S.F., Golubkova E.V. Evolutionarily conserved features of the retained intron in alternative transcripts of the *nxf1* (nuclear export factor) genes in different organisms // *Open Journal of Genetics*. 2013. V. 3, № 3. P.159–170. <http://dx.doi.org/10.4236/ojgen.2013.33018>

**Ассоциация экспрессии генов *SOCS1*, *IL2RA*, *FOXP3*, *PPARG* и *IL10*  
в жировой ткани у пациентов с ожирением и сахарным диабетом 2-го типа**

*Грунина М. Н.*<sup>1</sup>, *Драчева К. В.*<sup>1,2</sup>, *Сурцуклова М. А.*<sup>3</sup>, *Анисимова К. А.*<sup>2</sup>,  
*Хамид З. М.*<sup>2</sup>, *Баландов С. Г.*<sup>2</sup>, *Василевский Д. И.*<sup>2</sup>, *Пчелина С. Н.*<sup>1,2</sup>,  
*Мирошникова В. В.*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

by2306@mail.ru

**Введение.** Ожирение существенно увеличивает риск инсулинорезистентности и сахарного диабета 2 типа (СД2). При этом воспаление, возникающее в жировой ткани (ЖТ), может сопровождаться снижением активности регуляторных Т-лимфоцитов (Трег) [1, 2]. Разработка методов оценки активности Трег в ЖТ актуально для понимания регуляции воспалительных процессов при ожирении.

**Цель.** Сравнительный анализ уровня экспрессии генов *SOCS1*, *IL2RA* (*CD25*), *FOXP3*, *PPARG* и *IL10*, связанных с нормальным функционированием Трег, в подкожной и висцеральной жировой ткани (ПЖТ и ВЖТ) у пациентов с ожирением с/без СД2 и у лиц без ожирения.

**Материалы и методы.** В исследование включены 52 пациента (возраст  $44 \pm 11$ , ИМТ  $> 35$ ): с ожирением без СД2 ( $n = 27$ ) и с ожирением с СД2 ( $n = 25$ ) и 15 пациентов группы сравнения без ожирения (возраст  $48 \pm 12$ , ИМТ  $< 30$ ). Из биоптатов ПЖТ и ВЖТ выделяли тотальную РНК, с последующей обработкой ДНКазой для удаления примеси геномной ДНК. Относительный уровень мРНК выбранных генов оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Статистическая обработка выполнена с помощью непараметрических методов в программе SPSS 21. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Уровни мРНК генов *SOCS1* и *IL2RA* (*CD25*) повышены у пациентов с ожирением с/без СД2 по сравнению с контролем, как в ПЖТ ( $p < 0,04$ ), так и в ВЖТ ( $p < 0,04$ ). При том, в ВЖТ уровни мРНК генов *SOCS1* и *IL2RA* значительно выше, чем в ПЖТ ( $p < 0,01$ ). В ПЖТ выявлено: у пациентов с ожирением с СД2 повышение уровня гена *FOXP3* и понижение уровня мРНК гена *PPARG*, по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ); у пациентов без/с СД2 повышение

уровня мРНК гена *IL10* ( $p < 0,01$ ). У лиц без ожирения уровень мРНК гена *IL10* в ВЖТ был значительно выше по сравнению с ПЖТ; однако у пациентов с ожирением уровни мРНК гена *IL10* в ПЖТ и ВЖТ не различаются.

*Выводы.* Воспаление в ПЖТ и ВЖТ при ожирении и СД2 характеризуется изменением экспрессии генов *SOCS1*, *IL2RA* (*CD25*), *FOXP3*, *PPARG* и *IL10*.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 23-25-00207.*

1. Wang Q., Wu H. T Cells in Adipose Tissue: Critical Players in Immunometabolism. *Front Immunol.* 2018. V. 9. P. 2509.
2. Ding Y., Chen D., Tarcsafalvi A., Su R., Qin L., Bromberg J.S. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. *J Immunol.* 2003. V. 170(3). P. 1383–91.

**Влияние агрегации белков нуклеопоринов и других QN-богатых белков  
на ядерно-цитоплазматический транспорт  
в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae***

Данилов Л. Г.<sup>1</sup>, Рогоза Т. М.<sup>1,2</sup>, Лосева Н. В.<sup>1</sup>, Трубицина Н. П.<sup>1</sup>,  
Журавлева Г. А.<sup>1,3</sup>, Бондарев С. А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики  
и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия

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

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии  
амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

*lavrentydanilov@gmail.com*

Ядерный поровый комплекс – это сложная структура, которая состоит из более чем 30 различных белков. Центральная часть комплекса содержит белки из двух функциональных групп: структурные белки поры и белки, формирующие селективный фильтр в центре поры [1]. Ко второй группе относят нуклеопорины, которые содержат фенилаланин-глициновые (FG) повторы. Они играют ключевую роль в обмене молекулами между ядром и цитоплазмой. Для нуклеопоринов с FG-повторами описаны примеры формирования амилоидных агрегатов, среди них белок человека NUP58 [2] и дрожжевой белок Nup100 [3].

Ранее в нашей лаборатории в дрожжевой системе и в бактериальной системе C-DAG были показаны амилоидные свойства для ортологов нуклеопоринов *Saccharomyces cerevisiae*, а именно для белков Nup58 *Taeniopygia guttata*, Nup98 *Drosophila melanogaster* и Nup98 *Schizosaccharomyces pombe* [4]. В этом исследовании мы впервые оценили то, как агрегация нуклеопоринов может влиять на ядерно-цитоплазматический транспорт в дрожжах *S. cerevisiae*. Мы установили, что агрегация нуклеопоринов *S. cerevisiae* Nup145 и NSP1 снижает эффективность ядерно-цитоплазматического транспорта, так же как и ортологи нуклеопоринов из других видов. Для других QN-богатых белков человека (TDP-43, UBQLN1, UBQLN2) были показаны схожие эффекты снижения эффективности транспорта макромолекул в ядро.

Полученные результаты не позволяют с уверенностью утверждать, что именно агрегация нуклеопоринов специфически влияет на ядерный импорт, поскольку аналогичные эффекты мы видим и для других белков, способных к агрегации в клетках дрожжей. В дальнейшем планируется изучение состава агрегатов нуклеопоринов и QN-богатых белков для изучения механизма влияния на ядерный транспорт.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-24-00186 и Ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярно-клеточных технологий».

1. Ed H., Martin B. Towards understanding nuclear pore complex architecture and dynamics in the age of integrative structural analysis // *Current Opinion in Cell Biology*. 2015. V. 34. P. 31–38.
2. Danilov L.G. *et. al.* The human NUP58 nucleoporin can form amyloids *in vitro* and *in vivo* // *Biomedicines*. 2021. V. 9. P. 1451.
3. Halfmann R. *et. al.* Prion formation by a yeast GLFG nucleoporin // *Prion*. 2012. V. 4. P. 391–399.
4. Danilov L.G. *et. al.* Identification of New FG-Repeat Nucleoporins with Amyloid Properties // *Int. J. Mol. Sci.* 2023, V. 24. P. 8571.

**Оценка эффективности известных лекарственных препаратов –  
потенциальных фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы  
на первичной культуре макрофагов пациентов с болезнью Гоше  
и GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона**

Демидова Е. А.<sup>1</sup>, Копытова А. Э.<sup>1,2</sup>, Николаев М. А.<sup>1,2</sup>, Изюмченко А. Д.<sup>1,2</sup>,  
Журавлев А. С.<sup>1,2</sup>, Пчелина С. Н.<sup>1,2</sup>, Емельянов А. К.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербурге, Россия

evgene.ya@yandex.ru

Мутации в гене глюкоцереброзидазы (GBA) как в гомозиготном, так и в компаундном гетерозиготном состоянии приводят к снижению ферментативной активности глюкоцереброзидазы (GCase), повышению уровня ее субстрата гексозилсфингозина (HexSph) в клетках мозга и периферической крови и развитию наследственного заболевания – болезнь Гоше (БГ), а также являются фактором повышенного риска развития болезни Паркинсона (БП) [1]. Все больше обсуждается применение фармакологических шаперонов (ФШ) GCase в качестве потенциальной терапии GBA-ассоциированной БП (GBA-БП) и нейропатических форм БГ [2].

Целью исследования являлась оценка влияния лекарственных препаратов, ранее выбранных в экспериментах *in silico*, на активность GCase и концентрацию HexSph при добавлении их к первичной культуре макрофагов пациентов с GBA-БП, пациентов с БГ, а также лиц контрольной группы.

В исследование включены 3 пациента с БГ (31,0 ± 2,7 лет), 5 пациентов с GBA-БП (60,2 ± 15,4 лет) и 8 лиц контрольной группы (26,1 ± 3,6 лет). Культивирование макрофагов периферической крови проводилось в стандартных условиях (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) в присутствии пяти лекарственных препаратов (Benfotiamine (B), Almitrine(A), Glutathione (G), Rebamipide (R), Olopathadine (O)). Уровень активности GCase и концентрации HexSph оценивался методом ВЭЖХ-МС/МС.

Показано, что добавление соединений G, B и R (0,5–10 мкМ) к клеткам первичной культуры макрофагов отдельных индивидуумов исследуемых групп способствовало повышению активности GCase и снижению концентрации HexSph ( $p < 0,05$ ). При объединении представителей исследуемых групп из всех оцениваемых соединений была показана эффективность только для B(1 мкМ) и G(1 мкМ) в отношении активности GCase, а также B(1 мкМ) в отношении концентрации HexSph для лиц контрольной группы ( $p < 0,05$ ).



Проведенное исследование выявило потенциальную способность соединений G, B и R повышать активность GCase и снижать концентрацию HexSph при добавлении к клеткам первичной культуры макрофагов представителей исследуемых групп.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00721.*

1. Sidransky E., Lopez G., Lancet Neurol. 11 (2012).
2. Kopytova A.E. *et al.*, Int. J. Mol. Sci. 24 (2023).

## Структурно-динамические исследования трансмембранного домена рецептора RAGE дикого типа и мутантной формы

Долотова С. М.<sup>1,2</sup>, Бершацкий Я. В.<sup>1,2</sup>, Лушпа В. А.<sup>1,2</sup>, Плащинская Д. Д.<sup>1,2</sup>,  
Охрименко И. С.<sup>1</sup>, Бочаров Э. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия*

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

*Dolotova.SM@phystech.edu*

Рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE) – мембранный белок, состоящий из рецепторной внеклеточной части, одной трансмембранной (ТМ)  $\alpha$ -спирали и внутриклеточного неупорядоченного С-концевого фрагмента [1]. У здоровых людей рецептор экспрессируется только в нервной и легочной ткани, однако, его экспрессия повышается при возникновении воспалительных процессов и развитии таких болезней, как рак, диабет, болезней Альцгеймера и Паркинсона и многих других. На данный момент известны только структуры внеклеточного [1] и внутриклеточного [2] доменов RAGE. Механизм передачи сигнала внутрь клетки неизвестен, однако ТМ домен RAGE содержит консервативный мотив GxxxG, который отвечает за взаимодействие двух  $\alpha$ -спиральных ТМ доменов похожих белков [1]. Мутации в рамках этого мотива могут ослаблять это взаимодействие, мешая димеризации белка. Для исследования олигомеризации белков широко используются методы гетероядерной ЯМР-спектроскопии, которые являются чувствительными к нековалентным взаимодействиям и позволяют определять различные олигомерные состояния белка [3].

Целью данной работы является получение данных о структуре и димеризации ТМ домена RAGE дикого типа и его онкогенной мутантной формы G365R. Для достижения этой цели были получены генетические конструкции, состоящие из N-концевого 6xHis-tag и фрагмента, соответствующего аминокислотам 351-385 в белковой последовательности RAGE дикого типа и с мутацией G365R. Тотально <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N-изотопно-меченые белки были получены методом бесклеточной экспрессии, очищены и встроены в мицеллы додецилфосфохолина. Были накоплены гетероядерные спектры ЯМР для отнесения сигналов, расчета пространственной структуры и сравнения возможности димеризации двух форм белка. Полученные данные

свидетельствуют об ослаблении взаимодействия ТМ доменов RAGE при внесении мутации в рамках консервативного мотива GxxxG.

*ЯМР-исследования и биотехнологические работы были поддержаны Российским научным фондом (проект № 23-74-00024).*

1. Yatime L., Andersen G.R., FEBS J. 280, 24 (2013).
2. Rai V. *et al.*, J. Biol. Chem. 287, 7 (2012).
3. Mineev K.S., Lesovoy D.M. *et al.*, Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1838, 1 (2014).

## Исследование профиля экспрессии микроРНК жировой ткани при ожирении и сахарном диабете 2-го типа

Драчева К. В.<sup>1,2</sup>, Сапожникова А. П.<sup>1</sup>, Скорнякова В. К.<sup>1</sup>, Побожева И. А.<sup>1,2</sup>,  
Анисимова К. А.<sup>2</sup>, Хамид З. М.<sup>2</sup>, Баландов С. Г.<sup>2</sup>, Василевский Д. И.<sup>2</sup>,  
Пчелина С. Н.<sup>1,2</sup>, Мирошникова В. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

dracheva\_kv@pnpi.nrcki.ru

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) как правило развивается на фоне ожирения [1]. Развитие патологии связано с дисфункцией жировой ткани (ЖТ), которая может сопровождаться изменением профиля экспрессии микроРНК, регулирующих экспрессию генов в клетках ЖТ [2].

*Цель работы:* сравнительный анализ содержания микроРНК (miR-551b-3p, miR-302d-3p, miR-132-3p, miR-10a-5p, miR-145-5p, miR-210, miR-155-5p, miR-181a) в ЖТ у пациентов с ожирением с/без СД2 и лиц без ожирения.

*Материалы и методы.* Содержание микроРНК было оценено в подкожной (ПЖТ) и висцеральной (ВЖТ) ЖТ в следующих группах пациентов: 1) с ожирением без СД2 ( $N = 27$ , ИМТ  $> 35$ ); 2) с ожирением и СД2 ( $N = 26$ , ИМТ  $> 35$ ), 3) без ожирения ( $N = 15$ , ИМТ  $< 30$ ). Для выделения РНК использовали реагент Qiazol (Qiagen) с обработкой ДНКазой, для обратной транскрипции использовали набор MMLV RT kit (Евроген) и разработанные специфические праймеры. Для оценки уровня микроРНК использовался метод ПЦР в реальном времени с мастер миксом qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Для нормировки в качестве референсных были использованы miR-425-5p и малая РНК U6 [3].

*Результаты.* Уровень miR-132-3p в ПЖТ был снижен у пациентов с ожирением и СД2 по сравнению с пациентами с ожирением без СД2 ( $p = 0,026$ ) и лиц без ожирения ( $p = 0,049$ ). Также уровень данной микроРНК в ПЖТ отрицательно коррелировал с ИМТ ( $r = -0,329$ ,  $p = 0,031$ ); у пациентов с СД2 положительно коррелировал с уровнем глюкозы в (ПЖТ:  $r = 0,465$ ,  $p = 0,045$ ; ВЖТ:  $r = 0,563$ ,  $p = 0,006$ ) и гликированного гемоглобина в плазме крови (ВЖТ:  $r = 0,593$ ,  $p = 0,005$ ). У пациентов с ожирением уровень miR-551b-3p в ПЖТ отрицательно коррелировал с уровнем инсулина ( $r = -0,409$ ,  $p = 0,020$ ) и С-пептида ( $r = -0,360$ ,  $p = 0,043$ ) плазмы крови, индексом инсулинорезистентности НОМА-IR ( $r = -0,540$ ,  $p = 0,002$ ).

*Выводы.* Для СД2, развившегося на фоне ожирения, характерно снижение содержания miR-132-3p в ПЖТ. Развитие инсулинорезистентности при ожирении ассоциировано со снижением уровня miR-551b-3p в ПЖТ.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 23-25-00207.*

1. Golay A., Ybarra J. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 19(4), 649–663, (2005).
2. Ortega F.J., Moreno-Navarrete J.M. *et al.* PloS one, 5(2), e9022, (2010).
3. Bresciani *et al.* Int. J. Mol. Sci., 23(7), 3486 (2022).

**Обучение и забывание у *Drosophila melanogaster*  
при изменении экспрессии гена *limk1* в дофаминергических  
и серотонинергических нейронах**

Егозова Е. С.<sup>1</sup>, Заломаева Е. С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена,  
Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup> *Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

*ekaterina\_egozova@mail.ru*

В соответствии с представлениями о патогенезе нейродегенеративных заболеваний одним из факторов развития болезней, является нарушение синаптической пластичности. Прогрессирующее ухудшение когнитивных и двигательных функций сопряжено с изменениями в сигнальном каскаде ремоделирования актина. Ключевым ферментом каскада является LIM-киназа 1, кодируемая геном *limk1* [1]. При сравнительном анализе последовательностей *limk1* у человека и *Drosophila melanogaster* выявлен высокий уровень гомологии, что позволяет использовать дрозофилу в качестве модели изучения сигнальных путей.

Цель исследования – изучить процессы формирования и динамики изменения среднесрочной памяти (ССП) дрозофилы при подавлении и активации экспрессии *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах.

Для изменения экспрессии использовали систему скрещивания Gal4/UAS. Способность к обучению и формированию памяти определяли методом условно-рефлекторного подавления ухаживания. Для оценки обучения и анализа скорости забывания вычисляли индекс обучения (ИО) на временных интервалах, равных 1, 2, 3 и 24 часам. Статистический анализ проводили с использованием двустороннего теста рандомизации.

Исследование показало, что все гибриды оказались способны к формированию ССП, однако у всех групп наблюдается снижение ИО до отрицательных значений спустя 24 часа. ИО гибридов с подавлением гена спустя 3 часа после обучения достоверно отличается от ИО в контроле. Особи с активацией гена на том же интервале демонстрировали более высокие показатели ИО и достоверно отличались от гибридов с подавлением *limk1*. ИО особей с активацией экспрессии на протяжении 3 часов сохранялись на уровне, достигнутом спустя час после тренировки, в то время как у гибридов с подавлением экспрессии гена наблюдали снижение ИО.

Таким образом, исследуемые гибриды способны к формированию ССП в течение 3 часов, однако забывание более выражено у мух с подавлением *limk1*, что свидетельствует о вовлеченности данного гена в когнитивные процессы.

1. Медведева А. В., Реброва А. В., Заломаева Е. С. и др. Роль LIMK1 дофаминовых и серотониновых нейронов в стабильности генома, обучении и памяти у дрозофилы при стрессорной реакции на ослабление геомагнитного поля // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58, № 1. – С. 34–42.

## Оптимизация протокола экспрессии и очистки мышиной 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы 5-го типа

Егорова П. В.<sup>1,2</sup>, Биктимиров А. Д.<sup>1,2</sup>, Гонялин В. Е.<sup>1,2</sup>, Гараева Н. С.<sup>1,2</sup>,  
Юсупов М. М.<sup>1,3</sup>, Усачев К. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>3</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch, France

egorova-polina13@inbox.ru

Половые стероидные гормоны, такие как эстрогены и андрогены, участвуют в развитии и дифференцировке нескольких тканей и органов, включая кости, сердечно-сосудистую систему, мозг и гендерно-специфичные участки, такие как яички, простата, эндометрий и яичники. Активность и концентрация половых стероидов определяются их доступностью из кровообращения и местной конверсией. Это превращение в первую очередь опосредовано ароматазой, стероидсульфатазой и 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназой [1].

17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа (17 $\beta$ -ГСД) контролирует последний этап образования андрогенов и эстрогенов. Эту роль выполняют по меньшей мере пять изоферментов 17 $\beta$ -ГСД: 17 $\beta$ -ГСД1, 17 $\beta$ -ГСД2, 17 $\beta$ -ГСД3, 17 $\beta$ -ГСД4, 17 $\beta$ -ГСД5, обладающих индивидуальной клеточно-специфичной экспрессией, субстратной специфичностью, механизмами регуляции и восстановительной или окислительной каталитической активностью [1]. 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы 5-го типа представляет собой стероидный фермент, который катализирует обратимую конверсию андростендиона в тестостерон. Дефицит фермента в живом организме приводит к неправильному строению наружных половых органов мышей [2]. Исследование структуры данного фермента позволят разработать характерные ингибиторы, являющиеся потенциальными терапевтическими средствами для контроля гормонозависимых заболеваний.

В представленной работе были подобраны условия гетерологичной экспрессии мышиной 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы 5-го типа в *Escherichia coli*, а также оптимизированы буферные условия для очистки белка методами аффинной и эксклюзионной хроматографии.

*Исследования выполнены за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.*



1. Erik Hilborn *et al.* // *Oncotarget*. 30552, 8 (2017).
2. Молашенко Н. В. и др. // *Ожирение и метаболизм*. 73, 20 (2023).

**Анализ сезонных изменений содержания биологически активных веществ, антиоксидантных и антимикробных свойств бурых водорослей *Fucus vesiculosus* с побережья Баренцева моря**

Ермилов Ф. К.<sup>1,2</sup>, Лапина И. М.<sup>1,3</sup>, Журишкина Е. В.<sup>1,3</sup>, Кульминская А. А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> «Курчатовский геномный центр – ПИЯФ», Гатчина, Россия

*ermilov.filipp03@gmail.com*

В последние годы бурые водоросли вызывают все более возрастающий интерес в качестве источника разнообразных биологически активных веществ. Сульфатированные полисахариды (фукоиданы), альгинаты и полифенолы, содержащиеся в водорослях, обладают огромным потенциалом как для лечения, так и профилактики различных заболеваний человека [1]. На содержание этих веществ в водорослях могут оказывать существенное влияние сезонные условия и географическое расположение, а также многие другие факторы [2].

Целью данного исследования является исследование воздействия сезона сбора бурых водорослей *Fucus vesiculosus* в прибрежных зонах Баренцева моря на состав и свойства содержащихся в них биологически активных соединений.

В данной работе была экспериментально проанализирована возможность оптимизации методов экстракции исследуемых биологически активных веществ, а также были определены антиоксидантные (методом DPPH) и антимикробные свойства выделенных веществ на бактериях *St. aureus*, *B. cereus* и *E. coli*.

*Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, соглашение № 075-15-2019-1663.*

1. Pádua D. *et al.* Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer // *Phytochemistry Letters*. 2015. (14). P. 91–98.
2. Paiva L., Lima E., Neto A.I., Baptista J. Seasonal Variability of the Biochemical Composition and Antioxidant Properties of *Fucus spiralis* at Two Azorean Islands // *Mar. Drugs* 2018 (16). P. 1–21.

## Оптимизация метода проточной цитометрии для оценки жизнеспособности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Ефремова Е. П.<sup>1</sup>, Землянко О. М.<sup>1,2</sup>, Журавлева Г. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

efremova.bio@gmail.com

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются одним из самых удобных модельных объектов в области молекулярной генетики и молекулярной биологии клетки. У микроорганизмов для изучения механизмов действия генов и их влияния на физиологическое состояние клетки используют методы оценки жизнеспособности (методы чашечного подсчета, детекция клеток с помощью микроскопии и др.) [1]. В настоящее время одним из альтернативных и эффективных методов для изучения морфологии клеток, состояния их клеточной мембраны и анализа ДНК является проточная цитометрия (ПЦ). ПЦ позволяет охарактеризовать каждую клетку в суспензии, а затем разделить их на отдельные популяции по заранее определенным параметрам. Использование флуоресцентных красителей позволяет дифференцировать популяции живых и мертвых клеток. Однако, несмотря на широкое распространение ПЦ в иммунологических исследованиях и клинической диагностике, работ по применению данного метода для анализа дрожжей-сахаромицетов не так много.

В рамках данного исследования мы провели серию экспериментов для выбора флуоресцентного красителя, оптимизации условий пробоподготовки и настроек прибора для оценки жизнеспособности штаммов дикого типа и мутантов по генам факторов терминации трансляции *SUP35* и *SUP45* с помощью метода ПЦ. Мы обнаружили, что мутантные штаммы характеризуются повышенным уровнем автофлуоресценции. В связи с этим четкое разделение на популяции живых и мертвых клеток возможно: при использовании красителя с более длинноволновым спектром излучения, при компенсации «мешающего» сигнала автофлуоресценции или при одновременном использовании красителей на живые, мертвые и апоптотические клетки. Также мы выявили повышенную чувствительность к ультразвуковой обработке у мутантных штаммов.

На основании полученных нами данных мы планируем оценить жизнеспособность штаммов *S. cerevisiae*, несущих мутации в генах факторов терминации трансляции на различном генетическом фоне.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского  
научного фонда № 23-14-00063.*

1. Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. FEMS Yeast Research, 14, 7 (2014).

**Оценка мРНК сплайсинг вариантов гена белка  $\alpha$ -синуклеина  
в клетках периферической крови пациента с болезнью Паркинсона,  
обусловленной мутацией р.Е46К в гене *SNCA***

Журавлев А. С.<sup>1,2</sup>, Сенкевич К. А.<sup>2,3,4</sup>, Белецкая М. В.<sup>2</sup>, Тюрин А. А.<sup>2</sup>,  
Кулабухова Д. Г.<sup>1</sup>, Милюхина И. В.<sup>2,5</sup>, Тимофеева А. А.<sup>2</sup>, Емельянов А. К.<sup>1,2</sup>,  
Пчелина С. Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> The Neuro (Montreal Neurological Institute-Hospital), McGill University, Montréal, Québec,  
Canada

<sup>4</sup> Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montréal, Québec, Canada

<sup>5</sup> Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

rigold988@mail.ru

В настоящее время считается, что ключевым звеном в патогенезе болезни Паркинсона (БП) является олигомеризация  $\alpha$ -синуклеина (*SNCA*) в дофаминергических нейронах черной субстанции головного мозга. Известно, что четыре изоформы белка  $\alpha$ -синуклеина (*SNCA*-140, -112, -126, -98) обладают разной склонностью к агрегации [1]. На данный момент в мире описаны две семьи с БП, обусловленной мутацией р.Е46К в гене *SNCA* [2, 3]. Недавно нами была обнаружена третья такая семья российского происхождения.

Целью данной работы была оценка уровня мРНК сплайсинг вариантов гена *SNCA* (*SNCA*-140, -112, -126) и уровня  $\alpha$ -синуклеина в клетках периферической крови пациента с БП, носителя мутации р.Е46К в гене *SNCA*, группы пациентов с БП и лиц контрольной группы.

В исследование по оценке уровня мРНК сплайсинг вариантов гена *SNCA* вошли носитель мутации р.Е46К в гене *SNCA*, 34 пациента с БП (63,0  $\pm$  9,1 лет, 15 м.) и 35 лиц контрольной группы (64,5  $\pm$  6,6 лет, 18 м.), оценка уровня  $\alpha$ -синуклеина проводилась в отдельной группе из 5 пациентов с БП (47,8  $\pm$  5,5 лет, 5 м.) и 4 индивидуумов контрольной группы (45  $\pm$  2,7 лет, 4 м.). Оценка уровня мРНК сплайсинг вариантов гена *SNCA* в лимфоцитах периферической крови осуществлялась методом ПЦР в реальном времени. Оценка уровня  $\alpha$ -синуклеина в лизатах CD45+ клеток проводилась методом вестерн-блоттинга.

В результате работы было обнаружено статистически значимое повышение уровня мРНК *SNCA*-112 у носителя мутации р.Е46К в гене *SNCA* (6,618 (6,421÷13,070)) по сравнению с группой пациентов с БП и лицами

контрольной группы (0,518 (0,001÷6,455),  $p = 0,042$ ; 0,196 (0,001÷3,818),  $p = 0,036$ , соответственно). Статистически значимой разницы в уровне белка  $\alpha$ -синуклеина в CD45+ клетках при сравнении исследуемых групп не было обнаружено.

Таким образом, можно предположить, что мутация p.E46K в гене *SNCA* приводит к изменению уровня мРНК сплайсинг варианта *SNCA-112*, но не влияет на уровень белка в клетках периферической крови.

1. Beyer K., Domingo-Sàbat M. *et al.* Neurogenetics. 9 (2008).
2. Pimentel M.M.G., Rodrigues F.C. *et al.* Parkinsonism & Related Disorders. 21, 6 (2015).
3. Zarranz J., Alegre J. *et al.* Ann Neurol. 55, 2 (2004).

## Влияние вируса гриппа на состав секретлируемых клетками экзосом

Забродская Я. А.<sup>1,2</sup>, Плотникова М. А.<sup>1</sup>, Ложков А. А.<sup>1,2</sup>, Гаврилова Н. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

yana@zabrodskaya.net

Экзосомы – один из видов мембранных везикул – секретруются всеми типами клеток и являются средством межклеточной коммуникации, поскольку способны переносить между клетками различные типы РНК, белки и ДНК. Показано, что экзосомы также участвуют в жизненном цикле различных вирусов, помогая им ускользать от иммунного ответа. Целью данной работы было выявление возможных механизмов участия экзосом в жизненном цикле вируса гриппа.

Были получены экзосомы от зараженных и незараженных вирусом гриппа клеток, свободные от вирусных частиц [1], после чего было оценено влияние экзосом на экспрессию ряда генов в интактных клетках (*RIG1*, *IFIT1*, *MDA5*, *MxA*, *PKR*, *SOCS1*, *COX2*, *AnxA1*, *NFkB*, *IL6*, и *IL18*) и на способность вируса гриппа заражать клетки в присутствии экзосом обоих типов. Было показано, что введение экзосом, секретлируемых зараженными вирусом гриппа клетками (EV), специфически подавляло систему распознавания экзогенных вирусных РНК с одновременным подавлением проапоптотического сигнального каскада. При этом EV также способствовали усилению репликации вируса гриппа при заражении клеток MDCK, в то время как предварительная стимуляция клеток экзосомами, секретлируемыми незараженными клетками (E), наоборот, приводила к большей сопротивляемости клеток инфицированию вирусом гриппа [2].

Анализ состава секретлируемых клетками экзосом методом NGS выявил, что при заражении вирусом гриппа происходит изменение экспрессии ряда генов, а также изменение количества малых РНК [2]. Интересно, что наблюдавшиеся изменения в составе экзосом могли бы приводить как к усилению репликации вируса (например, увеличение *SLC3A2*, *SLC7A5*, *TRIB3*, miR-23a-5p, miR-548c-5p и снижение *MUC5AC* и miR-26a-5p), так и к ее подавлению (например, увеличение *RPL13A*, *MKNK2* и снижение miR-21-3p), однако в целом EV приводили к усилению репликации вируса гриппа.

Таким образом, было показано, что вирус гриппа может использовать экзосомы для регуляции и подавления иммунного ответа соседних незараженных клеток.

1. Забродская Я. А. и др. Способ хроматографической очистки экзосом и их разделения от вирионов вируса гриппа А на основе гидрофобного взаимодействия с сорбентом // Патент на изобретение RU 2803848 С1, 21.09.2023. Заявка № 2022131900 от 07.12.2022.
2. Zabrodskaya Y. *et al.* Exosomes Released by Influenza-Virus-Infected Cells Carry Factors Capable of Suppressing Immune Defense Genes in Naïve Cells // *Viruses*. 2022. V. 14. P. 2690.



**Вклад цитокинов и микробиоты кишечника  
в риск развития некротизирующего энтероколита  
у новорожденных с врожденными пороками сердца**

*Зайкова Е. К., Белозерцев Д. И., Каплина А. В., Петрова Н. А., Первунина Т. М.,  
Головкин А. С., Костарева А. А., Калинина О. В.*

*Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

*Catherine3452 @yandex.ru*

*Введение.* Доношенные новорожденные с врожденными пороками сердца (ВПС) относятся к группе риска развития некротизирующего энтероколита (НЭК) кишечника, триггерами которого могут быть циркуляторная гипоксия, аномальная колонизация микроорганизмами кишечника, аберрантные реакции иммунной системы [1–3]. Молекулярные механизмы патогенеза НЭК остаются малоизученными.

*Цель.* Изучить цитокиновый профиль плазмы крови и состав микробиоты кишечника доношенных новорожденных с ВПС.

*Материалы и методы.* Образцы плазмы крови и фекалий получены до и после кардиохирургической операции у 36 новорожденных с ВПС, у 8 из которых после операции развился НЭК. Уровень 47 цитокинов определяли с MILLIPLEX Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A. Состав микробиоты кишечника оценивали с NEXTflex 16S V4 Amplicon-Seq Kit 2.0 на платформе Illumina, анализ данных выполняли в пакете QIIME 2 и базой данных SILVA 2022.8.

*Результаты.* У детей на фоне НЭК наблюдалось статистически значимое изменение уровня TNF $\alpha$ , IL12p40, IP10, MDC, тогда как у детей без НЭК – 22 цитокинов. До операции между детьми с НЭК и без НЭК выявлено значимое отличие по уровням IL5 ( $p = 0,010$ ), IL18 ( $p = 0,046$ ), IL1RA ( $p = 0,030$ ) и MCP1 ( $p = 0,026$ ), после операции – только по уровню M-CSF ( $p = 0,010$ ). Обе группы пациентов имели разные корреляционные взаимодействия между цитокинами. Дети без НЭК имели умеренную множественную сеть цитокиновых взаимодействий до и после операции; дети с НЭК – сильные положительные корреляционные взаимодействия до операции, а на фоне НЭК их количество значительно сократилось.

Статистически значимых отличий в профиле микробиоты между двумя группами новорожденных выявлено не было, однако у новорожденных с НЭК преобладали Proteobacteria, тогда как у новорожденных без НЭК – Firmicutes.

*Выводы.* Установлена значительная гетерогенность функциональной активности иммунной системы новорожденных с ВПС, которая вносит вклад в риск развития НЭК, тогда как профиль микробиоты не играет центральной роли в риске развития НЭК.

1. Lindberg T.P., Caimano M.J., Hagadorn J.I. *et al.* Preterm infant gut microbial patterns related to the development of necrotizing enterocolitis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020; 33(3):349–358.
2. Wang Y., Hoenig J.D., Malin K.J. *et al.* 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME J.* 2009; 3(8):944–954.
3. Kashif H., Abuelgasim E., Hussain N. *et al.* Necrotizing enterocolitis and congenital heart disease. *Ann Pediatr Cardiol.* 2021; 14(4):507–515.

## **Анализ экспрессии гена *swiss cheese* в пищеварительной системе *Drosophila melanogaster***

Золотникова А. В., Рябова Е. В., Иванова Е. А., Саранцева С. В.

НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

*anna.zolotnikova2002@mail.ru*

В настоящее время процессам, протекающим в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), уделяется повышенное внимание, поскольку он выполняет важнейшие функции для организма – поглощение, хранение и использование энергетических ресурсов. Исследования пищеварительной системы *Drosophila melanogaster* выявили ее функции в поддержании энергетического гомеостаза всего организма [1]. Несмотря на то что кишечник насекомых устроен проще, чем ЖКТ млекопитающих, они схожи и на клеточном, и на молекулярном уровнях [2], что делает дрозофилу удобным объектом для исследования пищеварительной системы.

Кишечник дрозофилы представляет собой трубку, выстланную эпителиальной тканью, и покрытую висцеральными мышцами. Эпителиальный слой средней кишки содержит четыре основных типа клеток: кишечные стволовые клетки, энтероциты, секреторные энтероэндокринные клетки и энтеробласты. Основная функция энтероцитов – переваривание и всасывание поступающей пищи, также они запасают питательные вещества в виде липидных капель, и выполняют барьерную функцию [1].

Поскольку дрозофила питается различными видами разлагающегося растительного и грибкового материала, то она обладает набором различных пищеварительных ферментов, из которых преобладают пептидазы, а также амилазы и липазы. У дрозофилы фосфолипаза В, которая расщепляет фосфатидилхолин, является продуктом гена *swiss cheese* (*sws*), исследования экспрессии которого в организме дрозофилы, показали высокий уровень именно в среднем кишечнике [3]. В данной работе было показано, что ген *sws* экспрессируется в энтероцитах среднего кишечника, но не в других типах клеток.

*Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 1023031500037-7-1.6.8;1.6.1;1.6.2;1.6.3 Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения).*

1. Zhao X., Karpac J., Curr. Opin. Insect Sci., 41 (2020).

2. Harsh S. *et al.*, Biol. Open, 8, 7 (2019).
3. Melentev P.A. *et al.*, Insects, 13, 1 (2022).

**Агрегаты и мономеры NOS1AP вовлечены в образование белковых скоплений, содержащих белки стресс-гранул, при сверхпродукции в клетках HEK293T**

Зудилова А. А.<sup>1</sup>, Матиив А. Б.<sup>1</sup>, Данилов Л. Г.<sup>1</sup>, Рогоза Т. М.<sup>1, 2</sup>,  
Бондарев С. А.<sup>1, 3</sup>, Журавлева Г. А.<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологий, Санкт-Петербург, Россия

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

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

*aniuta.zudilova@gmail.com*

NOS1AP представляет собой адаптерный белок нейрональной синтазы оксида азота и участвует в клеточном сигналинге. Существует ряд работ, указывающих на участие NOS1AP в развитии заболеваний нервной системы и психических расстройств [1]. Например, у людей, страдающих шизофренией, наблюдается сверхпродукция этого белка [2]. В нашей лаборатории было показано, что NOS1AP способен агрегировать в условиях сверхпродукции [3], а также то, что агрегация NOS1AP ускоряет агрегацию взаимодействующего с ним альфа-синуклеина, ведущую к развитию болезни Паркинсона [4]. На основании этих данных мы предположили, что в агрегатах NOS1AP могут секвестрироваться функциональные партнеры этого белка, и для проверки этого предположения мы исследовали и сравнили интерактом мономерного и агрегированного NOS1AP.

В представленной работе мы отработали методику иммунопреципитации для выделения белковых скоплений из клеточных лизатов и с использованием антител к NOS1AP выделили из клеток линии HEK293T, трансфицированных соответствующими конструкциями, агрегированный NOS1AP и не способный к агрегации мономерный NOS1AP, конструкцию для которого получили путем сайт-направленного мутагенеза, основываясь на литературных данных об участках белка, ответственных за агрегацию [4]. Состав выделенных белковых скоплений мы проанализировали с помощью HPLC-MS-MS. Затем для каждого из полученных белковых наборов провели анализ обогащения терминами Gene Ontology и обнаружили, что все наборы обогащены терминами, связанными с процессом трансляции, компонентами рибосом и мРНК. Сравнив белковые наборы с компонентами стресс-гранул, описанными в литературе [5], мы

получили статистически значимое увеличение доли ряда белков стресс-гранул в каждом из наборов. Таким образом, как агрегаты, так и мономеры NOS1AP, вероятно, вовлечены в образование стресс-гранул в клетках линии HEK293T.

*В работе использовалось оборудование ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярно-клеточных технологий». Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-74-10042.*

1. Brzustowicz L.M., Simone J. *et al.*, American Journal of Human Genetics. 74(5), (2004).
2. Brzustowicz L.M. Current psychiatry reports, 10(2), (2008).
3. Matiiv A.B., Moskalenko S.E. *et al.*, International Journal of Molecular Sciences. 23(16), 9102 (2022).
4. Матиив А. Б. Санкт-Петербургский государственный университет (2023).
5. Jain S., Wheeler J.R. *et al.*, Cell, 164(3), (2016).

## **Мутация в гене *swiss cheese* приводит к нарушению процесса сперматогенеза в семенниках *Drosophila melanogaster***

*Иванова Е. А., Рябова Е. В., Латыпова Е. М., Саранцева С. В.*

*НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия*

*ivanova\_ea@pmpi.nrcki.ru*

Эволюционно-консервативный ген *swiss cheese* (*sws*) *Drosophila melanogaster* кодирует (лизо)фосфолипазу В, которая контролирует метаболизм одного из наиболее распространенных фосфолипидов в клетке, а именно (лизо)фосфатидилхолина. У дрозофилы дисфункция данного гена ведет к снижению интенсивности расщепления этого фосфолипида, что вызывает гибель нейронов и клеток субперинеуральной глии, составляющих основу гематоэнцефалического барьера [1, 2]. При дальнейшем изучении данного гена была обнаружена его высокая экспрессия в семенниках, а также наблюдалось снижение скорости движения сперматозоидов у мух, мутантных по данному гену [3].

Семенники дрозофилы содержат два типа клеток: зародышевые клетки, которые дают начало развитию гамет (сперматогенез), и соматические клетки цисты, окружающие и поддерживающие образование гамет. Такая защитная изоляция обеспечивается физическим барьером, образованным между соматическими клетками (гематотестикулярным барьером). Правильное функционирование процессов репродуктивной системы самцов обеспечивается работой большого количества генов, в число которых может входить и ген *sws*.

В данной работе были проанализированы все этапы сперматогенеза у самцов, мутантных по гену *sws* (*sws*<sup>1</sup>), и в результате были выявлены нарушения в заключительных стадиях процесса.

*Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 1023031500037-7-1.6.8;1.6.1;1.6.2;1.6.3 Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения).*

1. Ryabova E.V. *et al.*, Cells, 10, 3 (2021).
2. Melentev P.A. *et al.*, Int. J. Mol. Sci., 22, 15 (2021).
3. Melentev P.A. *et al.*, Insects, 13, 1 (2022).

**Применение методов машинного обучения  
и молекулярной динамики для разработки пептидной вакцины  
против вируса африканской чумы свиней**

*Ивановский А. С.<sup>1,2</sup>, Тимофеев В. И.<sup>1</sup>, Кордонская Ю. В.<sup>1</sup>, Марченкова М. А.<sup>1</sup>,  
Калач А. В.<sup>2</sup>, Писаревский Ю. В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия*

<sup>2</sup> *МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия*

*a.1wanowskiy@gmail.com*

Предложен алгоритм разработки пептидной вакцины на основе комбинаций ряда иммуноинформатических сервисов и пакета молекулярной динамики GROMACS (<https://www.gromacs.org/>) [1]. На основе известных подходов иммуноинформатики с помощью этого алгоритма были проведены расчеты вакцины против африканской чумы свиней (АЧС).

Вирус АЧС – высококонтагиозный и смертоносный вирус, приводящий к высоким уровням смертности в домашних популяциях свиней. По данным ВОЗ, за 2019 год от вируса африканской чумы свиней погибло порядка 5 млн животных, что несет существенный экономический ущерб.

В настоящей работе структура трансмембранного белка африканской чумы свиней CD2v была исследована на наличие надмембранных доменов с наибольшей концентрацией эпитопов для дальнейшего использования в виде вакцин-кандидатов [2]. На первом этапе были выделены два богатых антигенными эпитопами надмембранные домены. После чего на основе этих доменов с использованием системы искусственного интеллекта AlphaFold2 смоделированы пространственные структуры трех прототипов вакцины [3]. Проведены расчеты стабильности в водном растворе методом молекулярной динамики. Показано, что прототипы стабильны. С использованием систем искусственного интеллекта показано, что прототипы не токсичны и не вызывают аллергической реакции. С использованием программного пакета C-ImmSim (<https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM>), проведена симуляция клеточного ответа. Результаты иммуносимуляции показали, что данные прототипы вызывают клеточный ответ.

*Работа проведена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ № 1360) в части структурного анализа, предсказания эпитопов и иммуносимуляции и в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» в части анализа молекулярной динамики.*



1. Rakitina T.V., Smirnova E.V., Podshivalov D.D., Timofeev V.I., Komolov A.S., Vlaskina A.V., Gaeva T.N., Vasilov R.G., Dyakova Y.A., Kovalchuk M.V. An Algorithm for the Development of a Recombinant Antitherpetic Subunit Vaccine Combining the Crystal Structure Analysis, AlphaFold2-Based Modeling, and Immunoinformatics. *Crystals*. 2023, 13, 1416. <https://doi.org/10.3390/cryst13101416>
2. Колесников И. А., Тимофеев В. И., Ермаков А. В., Ивановский А. С., Дьякова Ю. А., Писаревский Ю. В., Ковальчук М. В. Поиск потенциальных эпитопов в оболочечном белке вируса африканской чумы свиней. *Кристаллография*. 2023. Т. 68. № 6. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0023476123600179>
3. Ивановский А. С., Колесников И. А., Кордонская Ю. В., Ермаков А. В., Марченкова М. А., Тимофеев В. И., Писаревский Ю. В., Дьякова Ю. А., Ковальчук М. В. Применение данных белковой кристаллографии и машинного обучения для разработки пептидной вакцины против африканской чумы свиней. *Кристаллография*. 2023. Т. 68. № 6. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0023476123600805>

## Таргетное секвенирование для дифференциальной диагностики наследственных нарушений обмена липопротеинов

*Изюмченко А. Д.<sup>1,2</sup>, Драчева К. В.<sup>1,2</sup>, Грунина М. Н.<sup>1,2</sup>,  
Музалевская М. В.<sup>3,4</sup>, Легостаева К. В.<sup>1</sup>, Куликов А. Н.<sup>1</sup>,  
Линькова С. В.<sup>5</sup>, Уразгильдеева С. А.<sup>3,4</sup>, Гуревич В. С.<sup>3,4</sup>,  
Пчелина С. Н.<sup>1,2</sup>, Мирошникова В. В.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup> *НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия*

<sup>3</sup> *Северо-Западный окружной научно-клинический центр им. Л. Г. Соколова ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>4</sup> *Научно-клинический и образовательный центр «Кардиология» Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>5</sup> *Детский городской многопрофильный клинический центр высоких медицинских технологий им. К. А. Раухфуса, Санкт-Петербург, Россия*

*izyumchenko\_ad@pnpi.nrcki.ru*

**Введение:** дислипидемии – группа заболеваний, характеризующихся нарушениями обмена липопротеинов. Среди наследственных форм самой распространенной является семейная гиперхолестеринемия (СГХ) [1]. Для СГХ характерны повышение уровня холестерина липопротеинов низкой плотности и высокий риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Совершенствование алгоритмов молекулярно-генетической диагностики наследственных дислипидемий актуально как для раннего выявления лиц с СГХ, так и для дифференциации других более редких дислипидемий.

**Цель:** оценка эффективности новой таргетной NGS-панели для дифференциальной диагностики наследственных дислипидемий.

**Материалы и методы:** в исследование было включено 95 пациентов с нарушениями липидного обмена (возможная/вероятная/определенная СГХ; тяжелая гипертриглицеридемия; анамнез ранних сердечно-сосудистых катастроф в возрасте до 50 лет в сочетании с нарушением липидного спектра). Для подготовки NGS-библиотек использовали набор Prep&Seq (Parseq Lab Co, Россия). Для обогащения целевых регионов (кодирующие области 39 генов, в том числе *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *APOE*, *LIPA*, *LPL*) использовали разработанную панель [2, 3]. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США). Анализ fastq файлов проводили в программе Seq&Go (Parseq Lab Co, Россия).

**Результаты:** наиболее часто выявлялись патогенные и вероятно патогенные варианты в генах *LDLR* (21 случай: 1 делеция, 11 миссенс-, 4 нонсенс- и 5 сплайсинг-вариантов) и *APOB* (5 случаев: все носители р.(Arg3527Gln)). Также были выявлены 2 гетерозиготных носителя патогенного варианта *ABCG8* р.(Trp361Ter). Для одного из пациентов удалось провести дифференциальную диагностику ситостеролемии (компаундная гетерозигота *ABCG8* р.Leu572Pro/p.Gly512Arg, уровень общего холестерина 12,6 ммоль/л; ситостерола 28,3 мкмоль/л; кампестерола 12,4 мкмоль/л).

**Выводы:** предложенная NGS-панель может быть использована для дифференциальной диагностики наследственных дислипидемий.

1. Meshkov *et al.*, J Pers Med. 2021;11(6):464.
2. Miroshnikova V.V. *et al.*, Biomed Rep. 2021 Jan;14(1):15.
3. Miroshnikova V.V. *et al.*, J Pers Med. 2023 Oct 14;13(10):1492.

**Мутагенез антимикробных пептидов:  
повышение эффективности через изменение последовательности**

*Карпова Ю. С., Графская Е. Н., Манувера В. А., Боборовский П. А.,  
Харламбиева Д. Д., Серебренникова М. Ю., Лазарев В. Н.*

*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины  
им. акад. Ю. М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия*

*yuliakarpovabon@gmail.com*

Антимикробные пептиды (АМП) – компоненты врожденного иммунитета многих организмов, обладают цитотоксической активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов, а также участвуют в модуляции иммунного ответа. Ввиду глобальной проблемы антибиотикорезистентности и непрерывного распространения мультирезистентных патогенных штаммов АМП представляют собой эффективный и безопасный метод борьбы с инфекционными заболеваниями [1]. Разнообразие аминокислотной последовательности и пространственной структуры АМП затрудняют точный поиск этих веществ [2]. Кроме того, наряду с широким спектром антимикробного действия природные АМП проявляют высокий цитотоксический эффект. Таким образом, поиск новых малотоксичных антимикробных пептидов остается актуальной задачей.

В представленной работе мы применили контролируемый мутагенез для разработки новых антимикробных соединений. Для этого мы разработали две системы получения мутантных антимикробных пептидов в гетерологичных системах экспрессии грамположительных и грамотрицательных бактерий. Для этого были получены плазмидные вектора для экспрессии уже известных АМП (мелиттин, цефропин, апидаецин, Nm-AMP2 и Nm-AMP4) [3] на основе системы рЕТ для экспрессии пептидов в *E. coli* и системы рНТ43 для экспрессии в *B. subtilis*. Далее, был проведен мутагенез с использованием вырожденных праймеров и получена библиотека векторов, экспрессирующих мутантные варианты отобранных антимикробных пептидов.

Для отбора мутантных вариантов, экспрессирующих активные антимикробные пептиды была разработана методика негативной селекции, так как искомые АМП высоко токсичны по отношению к продуцирующим их клеткам. В результате были получены культуры бактерий-продуцентов АМП с низким уровнем экспрессии рекомбинантного гена в отсутствие индуктора и эффективно погибающие при индукции. Данный подход позволил выявить новые мутантные пептиды, обладающие антимикробными свойствами.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 23-15-00084).*

1. Hancock R.E., Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. FEMS Microbiol Lett. 2002 Jan 10; 206 (2): 143-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11000.x.
2. Grafskaja E.N., Pavlova E.R., Latsis I.A., Malakhova M.V., Ivchenkov D.V., Bashkirov P.V., Kot E.F., Mineev K.S., Arseniev A.S., Klinov D.V., Lazarev V.N. Non-toxic antimicrobial peptide Hm-AMP2 from leech metagenome proteins identified by the gradient-boosting approach. Materials & Design, 2022; 224, 111364. doi: 10.1016/j.matdes.2022.111364.
3. Sandiford S.K. An overview of lantibiotic biosynthetic machinery promiscuity and its impact on antimicrobial discovery. Expert Opin Drug Discov. 2020 Mar; 15 (3): 373–382. doi: 10.1080/17460441.2020.1699530.

## Подбор и характеристика наночастиц для доставки микроРНК в клетки печени

Козлов Д. С.<sup>1,2</sup>, Родимова С. А.<sup>1</sup>, Крылов Д. П.<sup>1,2</sup>, Гаврина А. И.<sup>1</sup>,  
Можегов А. М.<sup>1</sup>, Кузнецова Д. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*mail-kozlov2015@yandex.ru*

В настоящее время микроРНК рассматриваются как диагностический и терапевтический инструмент для большого спектра патологий. До сих пор остается нерешенным вопрос создания адресной системы доставки микроРНК [1]. В качестве систем доставки предполагается использование наночастиц. Актуальной задачей является поиск микроРНК, стимулирующих регенерацию печени.

Эксперименты проводили на *ex vivo* образцах срезов печени, полученных по протоколу Reagen M.A. с соавт. [2]. Тканевые эксплантаты инкубировали в течение 3, 24 и 48 часов в среде DMEM с добавлением НЧ в концентрации 50 и 100 мг/мл. Использовали НЧ золота, SiO<sub>2</sub>, PLA диаметром 100 нм, модифицированные Су5. Срезы печени окрашивали LysoTracker Yellow НСК-123 и Phalloidin FITC. С помощью мультифотонной микроскопии и рентгеновской микротомографии визуализировали структуру ткани срезов печени, клеточные ультраструктуры, оценивали распределение НЧ. Оценивали эффективность поглощения микроРНК тремя типами НЧ. Для выбора микроРНК и анализа их эффектов была составлена панель генов, экспрессия которых отражает ключевые эффекты микроРНК.

В результате исследования было выявлено, что наиболее активным накоплением в клетках печени обладают НЧ PLA. Накопления НЧ SiO<sub>2</sub> и золота практически не наблюдалось. Для НЧ SiO<sub>2</sub> и золота была характерна высокая цитотоксичность. Было показано, что НЧ PLA обладают низкой цитотоксичностью и их введение не провоцирует метаболических перестроек. Было показано, что модифицированные НЧ PLA хорошо поглощают и удерживают микроРНК. Подобранная панель генов отражает метаболические перестройки, связанные с ответом на клеточный стресс, пролиферацию клеток печени, изменения пластического и энергетического обмена. Был осуществлен подбор панели микроРНК, направленных на стимуляцию регенерации и лечение патологий печени.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-25-00100.*

1. Jin Y., Wang H., Yi K. *et al.*, Nano-Micro Lett., 13, No. 25, 1–36 (2021).
2. Pearen M.A., Lim H.K., Gratte F.D. *et al.*, JoVE, 157, e60992 (2020).

## Оценка метаболической гетерогенности колоректальных опухолей пациентов *ex vivo* методом флуоресцентной времяразрешенной микроскопии FLIM

Комарова А. Д.<sup>1,2</sup>, Синюшкина С. Д.<sup>1</sup>, Щечкин И. Д.<sup>1,2</sup>, Дружкова И. Н.<sup>1</sup>,  
Щеславский В. И.<sup>1</sup>, Ширманова М. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

komarova.anastasii@gmail.com

Опухолевая гетерогенность, в частности метаболическая, усложняет диагностику и терапию злокачественных новообразований и является негативным прогностическим фактором. В качестве перспективной технологии оценки метаболической гетерогенности рассматривается метод FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy).

Целью работы являлась визуализация и количественная оценка метаболической гетерогенности колоректального рака с использованием флуоресцентной визуализации времени жизни FLIM метаболического кофактора НАД(Ф)Н.

Исследование было проведено на клеточных линиях колоректального рака человека HT29 и HCT116, на соответствующих моделях опухолей *in vivo* и образцах *ex vivo* колоректального рака пациентов ( $n = 21$ ). Микроскопические исследования методом FLIM проводили на лазерном сканирующем микроскопе LSM 880 ( $\lambda_{ex} = 750$  нм,  $\lambda_{em} = 450\text{--}490$  нм). Параметры затухания флуоресценции оценивали в программе SPCImage. Для оценки метаболической гетерогенности на клеточном уровне применяли новый количественный критерий – индекс бимодальности  $Bla_1$  [1].

Было продемонстрировано, что в опухолях *in vivo* внутриопухолевая гетерогенность выше ( $Bla_1 \geq 1,1$ ), чем в монослойных культурах опухолевых клеток *in vitro*, что может быть связано с влиянием микроокружения на метаболизм. *Ex vivo* образцы опухолей пациентов имеют выраженную как меж-, так и внутриопухолевую гетерогенность: для большинства образцов (13 из 19) зарегистрированы значения  $Bla_1 \geq 1,1$ , что может быть обусловлено влиянием эпигенетических факторов. При сопоставлении полученных результатов с клиническими параметрами установлено, что высокие значения  $Bla_1$



наблюдались в опухолях поздних стадий (T3 и T4) и если присутствовали метастазы.

Методом FLIM с применением нового количественного критерия оценки гетерогенности опухолей продемонстрирована связь между внутриопухолевой метаболической гетерогенностью и клиническими параметрами.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-15-00294.*

1. Shirshin E.A., Shirmanova M.V. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 119, 9 (2022).

## Транскриптомный анализ мышечных биоптатов пациентов с диагнозом амиоплазия

Комиссаров А. Е.<sup>1</sup>, Ткачева И. В.<sup>1,2</sup>, Кучинская Я. А.<sup>1</sup>, Саранцева С. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

tem3650@yandex.ru

Артрогрипоз – это врожденное заболевание опорно-двигательной системы, характеризующееся формированием контрактур суставов и повреждением нейронов спинного мозга с первичной атрофией мышц. Амиоплазия – одна из трех форм артрогрипоза с характерными клиническими особенностями: плечи обычно повернуты и сведены внутрь, локти вытянуты, запястья согнуты и искривлены, пальцы жесткие, а большие пальцы расположены на ладони [1]. Бедренные суставы могут быть вывихнуты, колени вытянуты, стопы имеют тяжелые эквиноварусные контрактуры. Заболевание носит спорадический характер, наследственных случаев не наблюдалось [2].

Этиология амиоплазии плохо изучена, поэтому данное исследование направлено на выявление клеточных процессов, которые нарушены при данной патологии. Для этих целей была выделена тотальная РНК из 20 биоптатов от пациентов с диагнозом амиоплазия и условного контроля с последующей очисткой от рРНК. Для выявления дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) проводился транскриптомный анализ образцов РНК на платформе MGI.

В результате биоинформатической обработки данных нами были обнаружены 87 генов, экспрессия которых у образцов от пациентов с диагнозом амиоплазия статистически значимо уменьшалась относительно условного контроля.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00555).*

1. Hermansen M.V., Wekre L.L. *et al.*, The range of publications on arthrogryposis multiplex congenita from 1995 to 2022 – A scoping review. *American Journal of Medical Genetics Part A.* (2023).
2. Griffet J., Dieterich K. *et al.*, Amyoplasia and distal arthrogryposis. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research.* 107, 1 (2021).

## **Активные тельца включения как перспективная платформа для синтеза рекомбинантных белков в клетках *Escherichia coli***

Комолов А. С., Санникова Е. П., Губайдуллин И. И., Плохих К. С.,  
Николаева А. Ю., Козлов Д. Г.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
Москва, Россия

[askomolov@mail.ru](mailto:askomolov@mail.ru)

Одной из наиболее дорогостоящих стадий производства биологически активных рекомбинантных белков и пептидов в большинстве случаев является очистка целевых продуктов, в особенности включающая стадию их ренатурации. Снижения себестоимости позволяет достичь относительно новый подход, основанный на получении целевых белков в составе активных телец включения (АТВ). Данная технология предусматривает синтез целевых белков в биологически активной конформации в составе фьюжнов, содержащих самоассоциирующие пептиды (САП), которые в процессе синтеза *in vivo* обеспечивают их упорядоченную ассоциацию и формирование АТВ. В дальнейшем полученные АТВ отделяют от основной массы растворимых клеточных белков простым центрифугированием, а высвобождение целевых белков из состава АТВ проводят, исключая стадии денатурации и ренатурации [1, 2].

Ранее мы разработали оригинальную платформу для получения АТВ в клетках *E. coli*, включающую N-концевой САП L<sub>6</sub>KD, слитый с белком SUMO (Smt3) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, известным своей шаперонной активностью. Высокая эффективность платформы продемонстрирована на белках, обладающих разной молекулярной массой (от 2,5 до 36 кДа), четвертичной структурой, склонностью к корректной свертке и наличием дисульфидных связей [3].

Одним из скрытых недостатков разработанной платформы, снижавшим эффективность ее применения, была высокая чувствительность синтезированных АТВ к разрушению в процессе механической дезинтеграции клеток. В ходе текущей НИР мы показали, что в значительной степени данная проблема может быть решена путем увеличения гидрофобности САП (L<sub>8</sub>KD) или включения в его состав цистеинов (CCL<sub>6</sub>KD, CCCL<sub>6</sub>KD, CCCCL<sub>6</sub>KD). В присутствии указанных модификаций стабильность АТВ при УЗ разрушении

клеток была увеличена с 54 до 75 %, а при использовании экструзионного дезинтегратора – с 40 до 60 %.

1. Krauss U., Jäger V. D. *et al.*, J. Biotechnol. 258 (April), 136–147 (2017).
2. Lin Z., Zhao Q. *et al.*, Biotechnol. J. 10 (12), 1877–1886 (2015).
3. Komolov A.S., Sannikova E.P. *et al.*, Biotechnology and Bioengineering, 1–16 (2023).

## Криоэлектронная микроскопия экстраклеточных везикул плазмы крови при наследственных формах болезни Паркинсона

Копытова А. Э.<sup>1,2</sup>, Изюмченко А. Д.<sup>1,2</sup>, Кулабухова Д. Г.<sup>1,2</sup>, Гараева Л. А.<sup>1</sup>,  
Милюхина И. В.<sup>3</sup>, Пичкур Е. Б.<sup>1,4</sup>, Пчелина С. Н.<sup>1,2</sup>, Штам Т. А.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

*kopytovaalena@mail.ru*

Экстраклеточные везикулы (ЭВ) – это частицы с внешним липидным бислоем, секретлируемые клетками организма, и играющие важную роль в различных физиологических и патологических процессах. ЭВ могут быть вовлечены в патогенез болезни Паркинсона (БП), участвуя в переносе патогенных форм альфа-синуклеина. Наиболее распространенные наследственные формы БП: БП, ассоциированная с мутациями в гене *LRRK2* (LRRK2-БП) и в гене *GBA1* (GBA-БП) [1].

Цель работы – сравнительный анализ морфологии ЭВ плазмы крови пациентов с различными формами БП (GBA-БП, LRRK2-БП, спорадической БП (сБП)) и лиц контрольной группы.

ЭВ были получены ультрацентрифугированием пулированной плазмы крови пациентов с GBA-БП ( $N = 14$ ), LRRK2-БП ( $N = 5$ ), сБП ( $N = 5$ ) и контроля ( $N = 12$ ). Концентрация и размер частиц определялись методом анализа траектории наночастиц на анализаторе NTA NanoSight® LM10. Морфология и размеры ЭВ были определены с помощью криоэлектронной микроскопии с использованием микроскопа Titan Krios 60-300 TEM/STEM.

Среди ЭВ преобладали одиночные везикулы сферической формы (69,8 % для LRRK2-БП, 56,4 % для GBA-БП, 89,0 % для сБП и 66,7 % для контроля). ЭВ пациентов с GBA-БП характеризовались наибольшим размером (121,2 (50 – 491,3) нм) среди всех исследуемых групп ( $p < 0,05$ ). Диаметр ЭВ пациентов со сБП (87,7 (55,2 – 263,5) нм) был статистически значимо меньше по сравнению с ЭВ контроля (112,3 (35,0 – 264,6) нм) ( $p < 0,001$ ). ЭВ пациентов LRRK2-БП (101,3 (53,2 – 437,1) нм) не отличались по своему размеру от ЭВ контроля ( $p = 0,321$ ).

Впервые проведен сравнительный анализ морфологии ЭВ плазмы крови при наследственных формах БП методом криоэлектронной микроскопии. Для ЭВ

плазмы крови пациентов с GBA-БП характерны увеличенный размер частиц и более высокая представленность сложных форм в сравнении с ЭВ пациентов со сБП, LRRK2-БП, а также контролем. ЭВ плазмы крови пациентов с LRRK2-БП по размеру и морфологии не отличались от ЭВ контроля.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 19-74-20146-п.*

1. Emelyanov A.K., Usenko T.S., Tesson C. *et al.* Analysis of genetic variability in Parkinson's disease in Russia. *Neurobiology of aging*. 2018;.71: 267.e7–267.e10.

## Кристаллизация и рентгеноструктурный анализ $\alpha$ -L-фукозидазы из мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1

Корбан С. А.<sup>1,2</sup>, Иванова Д. Н.<sup>1</sup>, Бобров К. С.<sup>1,2</sup>, Поспелов В. А.<sup>3</sup>,  
Борщевский В. И.<sup>3</sup>, Кульминская А. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> «Курчатовский геномный центр – ПИЯФ», Гатчина, Россия

<sup>3</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

korban\_sa@pnpi.nrcki.ru, st076983@student.spbu.ru

Фукоиданы – сульфатированные гетерополисахариды, обнаруженные в составе клеточных стенок бурых водорослей и некоторых беспозвоночных. Фукоиданы обладают широким спектром биологических активностей, оказывая противоопухолевое, иммуномодулирующее, антикоагулянтное и противовоспалительное действие [1]. Биологическая активность фукоиданов определяется многими факторами, такими как тип связи между остатками фукозы в полисахаридной цепи, степень разветвления, состав и структура моносахаридов [2, 3]. Наиболее эффективным способом гидролиза, позволяющим получать сульфатированные полисахариды с низкой молекулярной массой, признано использование ферментов экзо- и эндо-действия.

$\alpha$ -L-фукозидазы – гликозидгидролазы, катализирующие реакции гидролиза фукозидных связей с образованием молекул L-фукозы, широко применяются при исследовании структурных и биологических свойств различных фукозилированных олиго- и полисахаридов.  $\alpha$ -L-фукозидаза - гликозидгидролаза экзо-действия семейства GH29, которая демонстрирует структурное сходство с эндо-фукоиданазами из семейства GH107. Получение экспериментальной структуры  $\alpha$ -L-фукозидазы позволит предсказать модификации, которые приведут к появлению у фермента эндо-фукоиданазной активности.

Ранее нами была создана система экспрессии рекомбинантной  $\alpha$ -L-фукозидазы из мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1 [4] на основе дрожжевых клеток *Pichia pastoris* GS115. Разработана схема выделения и очистки  $\alpha$ -L-фукозидазы. Рекомбинантный фермент был выделен и очищен до гомогенного состояния. Была проведена биохимическая характеристика и оценка физико-химических свойств белка.

Для направленного мутагенеза в целях изменения специфичности фермента необходимо знание нативной структуры белка. Для этого нами был

проведен скрининг условий кристаллизации и получены кристаллы  $\alpha$ -L-фукозидазы. Были получены дифракционные данные на синхротронном источнике SSRF и успешно решена структура фермента.

*Работы выполняются при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, соглашение № 075-15-2019-1663.*

1. Fitton J. *et al.*, Therapies from fucoidan: An update. *Marine drugs*. 2015. V. 13. No. 9. P. 5920–5946.
2. Andriy Synytsya *et al.*, *Carbohydrate Polymers* 81 (2010) 41–48.
3. Bo Li *et al.*, *Fucoidan: Structure and Bioactivity. Molecules* (2008), 13, 1671–1695.
4. Shvetsova S. *et al.*, *Journal of Basic Microbiology* 55, 471–479 (2015).



## Разнообразие и антибактериальная активность термофильных бактерий из горячих источников острова Кунашир

Корнеева К. О.<sup>1</sup>, Григорьева А. А.<sup>1,2</sup>, Трофимова А. Б.<sup>1,2</sup>, Колесник М. В.<sup>1</sup>,  
Северинов К. В.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт микробиологии Ваксмана, Нью-Джерси, США

karinakorneeva21@gmail.com

Необоснованное и чрезмерное использование антибиотиков приводит к формированию устойчивости у различных патогенов и к необходимости поиска новых классов препаратов. Бактерии, обитающие в экстремальных условиях, могут быть потенциальным источником новых противомикробных соединений [1].

В ходе экспедиции на остров Кунашир, проведенной в рамках проекта «Атлас микробных сообществ России», были собраны пробы воды из горячих источников с температурой выше 60 °С. Было изолировано 50 штаммов термофильных бактерий, которые были проверены на способность ингибировать рост лабораторных штаммов *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter sp.*, *Staphylococcus aureus* и *Thermus thermophilus*. Антибактериальная активность была обнаружена у 19 штаммов. Геномы этих штаммов были секвенированы на платформе Oxford Nanopore. Кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов были определены с помощью сервиса antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell) [2].

Самую высокую антибактериальную активность продемонстрировал изолированный штамм *Anoxybacillus flavithermus* JD\_18492, в геноме которого закодированы два кластера синтеза сактипептидов. Структурно сактипептиды схожи с широко применяемыми в промышленности пептидными антибиотиками, такими как лантипептиды, но их особенности менее изучены [3].

Таким образом, полученные результаты открывают перспективы для дальнейшего исследования метаболитов термофильных бактерий и изучения потенциально новых механизмов антибактериальной активности.

*Работы проведены при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-114 от 11.10.2021).*

1. Kalibulla S.I., Madhavankutty A. *et al.*, Recent Advances and Future Perspectives of Microbial Metabolites, chapter 9, 249–267, Academic Press (2023).
2. Blin K., Shaw S. *et al.* Nucleic Acids Res., 2; 49(W1):W29–W35. (2021).

3. Chen Y., Wang J. *et al.* Front Chem., 9:595991. (2021).

## Влияние химически созданного аналога кисспептина на уровень фолликулостимулирующего гормона у рыб *Danio rerio*

Костина М. И.<sup>1</sup>, Нужнова А. А.<sup>1</sup>, Блаженко А. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

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

koctena@list.ru

Кисспептин – это нейропептид, вырабатываемый в гипоталамусе. Он воздействует на центральную нервную систему, способствуя высвобождению гонадолиберина, который управляет функцией половых желез [1]. Кисспептин воздействует на рецептор KISS1R в гипоталамических нейронах, активируя гипоталамический гонадотропин-рилизинг-гормон, который, стимулирует выделение гонадотропов – лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) [2]. Актуально исследовать более короткие синтетические аналоги кисспептина, с меньшим количеством аминокислот. В исследовании использовались особи *Danio rerio*, известные своей генетической близостью с человеком. Общее количество рыб в исследовании – 96. Животные содержались в аквариумах при температуре 23–25 °С и световом режиме 12/12 часов. Все эксперименты проводились с соблюдением этических стандартов. Для подготовки рыб к эксперименту использовалась анестезия лидокаином [3], после чего им был введен исследуемый препарат в двух дозировках и бусерелин в качестве отрицательного контроля, затем проводилась гонадэктомия. Для измерения концентрации ФСГ использовался метод иммуоферментного анализа. Контрольная группа (КГ) отличалась от группы, исследованной спустя 1 час после введения с дозой 4 мкг/мл, среднее значение концентрации по сравнению с КГ увеличилось. Аналогично было с КГ и группой, исследованной через 4 часа после введения 4 мкг/мл, и группой, которой вводили бусерелин. Группа с меньшей дозой, исследуемой через 1 час, характеризуется меньшим значением концентрации. Группы с одинаковой дозировкой (1 мкг/мл), но исследованные в разное время также отличаются. Среднее значение у группы, исследуемой спустя 4 часа, выше. Таким образом, исследуемый препарат показывает увеличение уровня ФСГ, что характерно для природного кисспептина. Что касается бусерелина, то увеличение его среднего значения на малых временах после введения препарата обусловлено его механизмом действия [4].

1. Messenger S., Chatzidaki E.E., Ma D., Hendrick A.G., Zahn D., Dixon J., Thresher R.R., Malinge I., Lomet D., Carlton M.B., Colledge W.H., Caraty A., Aparicio S. A. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5(102) (2005) 1761–1766.
2. Pinilla L., Aguilar E., Dieguez C., Millar R.P., Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological reviews*, 3 (92) (2012) 1235–1316.
3. Блаженко А. А., Хохлов П. П., Лебедев А. А., Шабанов П. Д. Применение лидокаина для анестезии модельного организма *Danio rerio* в экспериментальных условиях Пат. 2 766 689 Российская Федерация, МПК51 А01К 61/95, А61Р 23/00.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»). № 2020144338; заявл. 30.12.20; опубл. 15.03.2022.
4. Рапопорт Л. М., Демидко Ю. Л. Применение Бусерелина-депо – агониста гонадотропин-рилизинг-гормонов в лечении рака простаты // Андрология и генитальная хирургия. 2014. № 3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/primenenie-buserelina-depo-agonista-gonadotropin-rilizing-gormonov-v-lechenii-raka-prostaty> (дата обращения: 01.01.2024).

## **Исследование случая муковисцидоза у пациента с двумя комплексными аллелями гена *CFTR***

*Краснова М. Г., Ефремова А. С., Мокроусова Д. О., Гольдштейн Д. В.*

*Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва, Россия*

*krasnova.m.g.0605@gmail.com*

Муковисцидоз (МВ) – аутосомно-рецессивное заболевание, возникающее при наличии патогенных нуклеотидных вариантов в гене *CFTR*, приводящих к утрате функционального белка *CFTR*. С момента обнаружения гена было идентифицировано более 2 000 его вариантов, включая патогенные. Самый распространенный в РФ вариант – F508del, его аллельная частота составляет 51,55 % [1].

Для терапии МВ были разработаны *CFTR*-модуляторы: потенциатор VX-770 и корректоры VX-809, VX-661 и VX-445. На эффективность терапии могут влиять комплексные аллели (КА). КА – это аллель гена, несущий дополнительные варианты в цис-положении. Самый распространенный в РФ КА – [L467F;F508del], встречающийся с частотой 8,02 % среди гомозигот F508del, его общая частота составляет 0,74 %. Вторым по распространенности КА является [S466X;R1070Q], его частота составляет 0,51 % среди пациентов с МВ [1]. Для гомозигот F508del эффективными таргетными препаратами являются все зарегистрированные комбинации *CFTR*-модуляторов, но дополнительный вариант L467F снижает их модулирующий эффект. В случае КА [S466X;R1070Q] терапия неэффективна [2].

Цель работы – исследовать остаточную функциональную активность канала *CFTR* у пациента с уникальным генотипом [L467F;F508del]/[S466X;R1070Q] и оценить эффективность таргетной терапии при помощи форсколинового теста на кишечных органоидах. На кишечных органоидах пациента не наблюдается ответа на форсколин, что свидетельствует о полной утрате функционального белка *CFTR*. При воздействии на органоиды комбинированными таргетными препаратами VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 также не наблюдается положительного *CFTR*-ответа. При воздействии VX-770+VX-661+VX-445 наблюдается незначительный ответ (9,2 %), что обусловлено наличием в генотипе варианта [L467F;F508del]. При полученных значениях терапия *CFTR*-модуляторами не может быть рекомендована. Результаты исследования демонстрируют важность персонализированной терапии для пациентов с КА гена *CFTR*.

*Выражаем благодарность Кондратьевой Е. И., Мельяновской Ю. Л., Булатенко Н. В., Бухаровой Т. Б. за участие и внесенный вклад в работу.*

1. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2021 год. / Под редакцией С. А. Красовского, М. А. Стариновой, А. Ю. Воронковой, Е. Л. Амелиной, Н. Ю. Каширской, Е. И. Кондратьевой, Л. П. Назаренко. СПб.: Благотворительный фонд «Острова», 2023, 81 с.
2. Краснова М. Г., Мельяновская Ю. Л., Красовский С. А., Булатенко Н. В., Ефремова А. С., Бухарова Т. Б., Гольдштейн Д. В. Описание клинической картины и оценка функциональной активности канала CFTR у пациента с комплексным аллелем [S466X;R1070Q]. Пульмонология. 2023; 33 (2): 233–242. DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-233-242.

## Использование методов липидомики для поиска маркеров сердечно-сосудистых заболеваний

*Кривошеина М. И., Кессених Е. Д., Мурашко Е. А.*

*Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

*Krivosheina\_Maria@mail.ru*

Липидомика – одна из омиксных технологий, направленная на изучение липидома биологической системы [1]. Технология реализуется такими физико-химическими методами как масс-спектрометрия, хроматомасс-спектрометрия и спектроскопия ЯМР [2]. Благодаря накопленным данным о влиянии липидов на возникновение и течение различных заболеваний данная область активно развивается.

Цель исследования – количественное определение церамидов и свободных жирных кислот (СЖК) плазмы крови разной степени насыщенности с длиной углеродной цепи C8-C22 как маркеров повторного возникновения коронарных событий.

Церамиды из биологических образцов экстрагировали методом Фолча [3] Анализ церамидов осуществлялся методом ВЭЖХ-МС/МС.

Пробоподготовка плазмы для анализа СЖК: 1) экстракция гексаном метиловых эфиров связанных жирных кислот после переэтерификации 0,4 М гидроксидом калия в метаноле; 2) метилирование СЖК 2,5 % раствором соляной кислоты в метаноле с последующей экстракцией их метиловых эфиров гексаном. Полученный экстракт СЖК анализировали методом ГХ-МС.

Диапазоны результатов определения липидов. Церамиды: Cer16:0 – 139,75 -  $33,75 \times 10^3$  нг/мл; Cer18:0 – 30,15 -  $16,00 \times 10^3$  нг/мл, Cer24:1 – 462,91 -  $45,00 \times 10^3$  нг/мл; Cer24:0 –  $1,16 \times 10^3$  -  $104,76 \times 10^3$  нг/мл.

СЖК: C10:0 – 1,20 - 3,89 нг/мл; C12:0 – 0,07 - 1,49 нг/мл, C16:1 – 0,36 - 21,85 нг/мл, C16:0 – 4,04 - 105,43 нг/мл, C18:2 – 1,60 - 23,03 нг/мл, C18:1 – 2,94 - 153,91 нг/мл, C18:0 – 0,78 - 30,14 нг/мл, C20:4 – 4,61 - 82,06 нг/мл, C22:6 – 7,29 - 132,79 нг/мл, C22:0 – 0,16 - 0,25 нг/мл.

Внедрение методов липидомики в лабораторную практику даст возможность расширить базу диагностических анализов, в первую очередь для заболеваний сердечно-сосудистой системы [4]. Так, в данном исследовании определение концентраций церамидов и СЖК было интегрировано с данными клинического обследования больных с ОКС.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).*

1. Yan Min, Guowang Xu., Current and future perspectives of functional metabolomics in disease studies—A review. *Analytica chimica acta*. 1037 (2018): 41–54.
2. Гончаров Н. В., Уколов А. И. с соавт., Метаболомика: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики. *Успехи современной биологии*. 135,1 (2015): 3–17.
3. Eggers L.F., Schwudke D., Liquid Extraction: Folch. *In: Wenk, M. (eds) Encyclopedia of Lipidomics*. Springer, Dordrecht (2016).
4. Xu Tianrun, Chunxiu Hu. *et al.*, Recent advances in analytical strategies for mass spectrometry-based lipidomics. *Analytica Chimica Acta*. 1137 (2020): 156–169.



## FLIM в оценке цитотоксичности и биораспределения наночастиц в ткани печени

Крылов Д. П.<sup>1,2</sup>, Родимова С. А.<sup>1</sup>, Козлов Д. С.<sup>1,2</sup>, Гаврина А. И.<sup>1</sup>,  
Елагин В. В.<sup>1</sup>, Кузнецова Д. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*dmitr.krilow2013@yandex.ru*

В настоящее время проводится большое количество исследований в области стимуляции регенерации печени с помощью малых биоактивных молекул. Существует проблема отсутствия эффективного метода их доставки с контролируемым периодом высвобождения, накопления и выведения [1]. Для решения этой проблемы разрабатывают комплексы наночастиц с биоактивными веществами. Перспективным методом оценки цитотоксичности и биораспределения наночастиц в ткани печени представляется FLIM-микроскопия с временным разрешением. Этот метод не инвазивный и позволяет проводить прижизненный мониторинг на клеточном уровне.

Работу проводили на *ex vivo* модели тканевых срезов печени, которая позволяет осуществлять скрининг нескольких типов наночастиц. Срезы печени получали на вибрационном микротоме. Срезы помещали в отдельные лунки 12-луночного планшета со стандартной культуральной средой DMEM. Далее, срезы культивировали в среде с добавлением наночастиц в концентрации 50 и 100 мг/мл, инкубацию проводили в течение 3, 24 и 48 часов. Было протестировано три типа наночастиц, модифицированных флуоресцентной меткой Cy5: золотые (Au), кремниевые (SiO<sub>2</sub>), полилактидные (PLA). Срезы ткани окрашивали LysoTracker Yellow HCK-123 и Phalloidin FITC. Используя FLIM, проанализировали метаболическое состояние гепатоцитов на основе оценки времен жизни флуоресценции свободной и связанной форм НАД(Ф)Н и их вкладов.

Наночастицы SiO<sub>2</sub> практически не накапливались в гепатоцитах и проявляли низкую цитотоксичность. Наночастицы Au показали эффективное накопление в гепатоцитах, однако, оказали сильное цитотоксическое действие. Наконец, наночастицы PLA наиболее эффективно накапливались в гепатоцитах, преимущественно в цитоплазме, и имели низкую цитотоксичность, так как относительные вклады времени жизни флуоресценции разных форм НАД(Ф)Н

существенно не отличались от контрольных значений. Таким образом, PLA наночастицы были выбраны для дальнейших *in vivo* исследований.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-15-00421.*

1. Liu Z., Li Y., Li W. *et al. Advanced Materials*, 30(24), 1703393 (2018).

## **Изменение укладки хроматина в ядрах клеток линии аденокарциномы Эрлиха с радиорезистентным фенотипом**

*Бурдаков В. С.<sup>1</sup>, Верлов Н. А.<sup>1</sup>, Кулаков И. А.<sup>1</sup>, Горшкова Ю. Е.<sup>2</sup>, Иванова Л. А.<sup>1</sup>,  
Копица Г. П.<sup>1</sup>, Лебедев Д. В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

*kulakov\_ia@pnp.i.nrcki.ru*

Лучевая терапия (ЛТ) является одним из основных подходов лечения злокачественных новообразований (ЗНО), примерно 50 % всех онкологических больных получают ЛТ, уровень излечения составляет около 40 % [1]. Радиорезистентность, изменение чувствительности опухолевых клеток к действию ИИ, является основным препятствием на пути к успешной ЛТ ЗНО [2]. Одним из путей возникновения радиорезистентности является изменение укладки хроматина в ядрах опухолевых клеток. Меньшая плотность упаковки хроматина приводит к большей доступности генетического материала для репарации и изменению профиля экспрессии. Исследование механизмов, лежащих в основе появления радиорезистентного фенотипа, является перспективным для увеличения эффективности ЛТ. Целью настоящего исследования была оценка степени компактизации хроматина в ядрах клеток линии аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) дикого типа и с радиорезистентным фенотипом.

Эксперимент проводился на самках беспородных аутбредных мышей ICR (CD-1), которым проводили интраперитонеальную трансплантацию клеток АКЭ. Облучение клеток АКЭ проводили на гамма-установке РХ-у-30 (источник <sup>60</sup>Co). Диапазон доз облучения составил от 0 до 40 Гр с шагом в 10 Гр. Ядра клеток, сохранивших жизнеспособность после облучения и перевивки, выделяли по стандартному протоколу и исследовали методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР).

В серии последовательных облучений были получены клетки линии АКЭ с меньшей чувствительностью к гамма-излучению, чем исходная популяция. Результаты МУРР ядер опухолевых клеток АКЭ показали скачкообразное изменение фрактальной размерности для субпопуляции клеток, сохранивших способность к перевивке после облучения в дозе 40 Гр. Данные МУРР указывают не только на количественные, но и на качественные изменения в упаковке хроматина ассоциированные с радиорезистентным фенотипом.

1. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global Cancer Statistics. *CA: Cancer J Clin* (2011) 61:69–90. doi: 10.3322/caac.20107.
2. Chandra R.A., Keane F.K., Voncken F.E.M., Thomas C.R. Jr. Contemporary radiotherapy: present and future. *Lancet*. 2021;398(10295):171–84.

## **Влияние миграции микроисточников йода-125 после низкодозной брахитерапии рака предстательной железы на дозовое распределение**

*Куус Е. А.<sup>1,2</sup>, Горелов В. П.<sup>1</sup>, Власова О. Л.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Северо-Западный окружной научно-клинический центр им. Л. Г. Соколова  
ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

*kuus.e@yandex.ru*

*Цель работы:* улучшить результаты низкодозной брахитерапии (НДБТ) рака предстательной железы (РПЖ) за счет коррекции тактики лечения в зависимости от миграции микроисточников и изменения суммарного дозового распределения в постимплантационном периоде.

*Материалы и методы исследований:* с 2007 по 2024 год в ФГБУ СЗОНКЦ им. Л. Г. Соколова ФМБА России было выполнено 2 880 процедур НДБТ РПЖ микроисточниками йод-125. Проведен сравнительный анализ результатов компьютерной томографии 168 пациентов, выполненной сразу после имплантации микроисточников и через 4–6 недель после [1]. Томография выполнялась на компьютерном томографе Siemens «SOMATOM Sensation 40». Расчет дозового распределения производился с помощью программного обеспечения PSID 4.1.

*Результаты исследований:* из 168 пациентов через 4–6 недель после НБТ у 14 (8,3 %) отмечена миграция источников относительно их расположения в день имплантации. Дозиметрическая оценка показала снижение дозового покрытия в среднем на 55 % для D90 и на 21 % для V100. Нагрузка на прямую кишку и мочевого пузыря изменялась от 4 до 138 %. Всем пациентам была выполнена дополнительная имплантация микроисточников.

*Заключение:* Дозиметрический контроль после НДБТ позволяет рассчитать изменение дозового распределения в органе-мишени и скорректировать тактику дальнейшего лечения. Миграция микроисточников является сравнительно редким осложнением (8,3 %), при этом дозовое покрытие в среднем уменьшается на 21 % (для V100). Нагрузка на критические органы в рассмотренных случаях преимущественно снижалась (в 12 случаях из 14), что, вероятно, связано с направлением миграции источников от критических органов, однако требует дальнейших исследований. Определение участков сниженного дозового покрытия при миграции

источников позволяет имплантировать дополнительные микроисточники для получения необходимого дозового покрытия мишени.

1. Nag S., Beyer D., Friedland J., Grimm P., Nath R. // American Brachytherapy Society (ABS) recommendations for transperineal permanent brachytherapy of prostate cancer. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 44, No. 4, pp. 789–799, 1999.

## Сравнение ГТФазной активности факторов терминации трансляции eRF3a и eRF3b человека

Лапина М. А.<sup>1</sup>, Трубицина Н. П.<sup>1</sup>, Москаленко С. Е.<sup>1,2</sup>, Журавлева Г. А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия

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

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

st111363@student.spbu.ru

Конечным этапом биосинтеза белка является терминация трансляции, успешному протеканию которой способствуют специфические белковые факторы. Известно, что факторы терминации трансляции у эукариот представлены двумя белками – eRF1, а также стимулирующей его активность ГТФазой eRF3 [1]. У млекопитающих были идентифицированы две формы eRF3 – eRF3a и eRF3b, кодируемые генами *GSPT1* и *GSPT2* соответственно [2]. Данные изоформы на 87 % идентичны по аминокислотному составу, причем большинство различий между ними обнаруживается в переменных N-концевых доменах [3]. Кроме того, было показано, что у мышей ген *GSPT1* экспрессируется повсеместно, и концентрация eRF3a коррелирует с внутриклеточным количеством eRF1, в то время как экспрессия *GSPT2* ограничена в основном тканями мозга и варьируется в ходе развития [4].

Исследования по оценке ГТФазной активности факторов терминации трансляции eRF3a и eRF3b человека, сверхпродуцированных в *E. coli*, показали, что оба фактора осуществляют гидролиз ГТФ со схожей эффективностью [1]. Однако статистическая обработка полученных данных проведена не была. Нельзя также не учесть тот факт, что полученные рекомбинантные белки могли отличаться от нативных в связи с отсутствием необходимых посттрансляционных модификаций и различным предпочтением кодонов в бактериальных и эукариотических клетках. Несомненный интерес представляет сравнение ГТФазной активности факторов eRF3a и eRF3b человека, наработанных в эукариотической системе экспрессии, что стало целью нашей работы.

Для наработки белков eRF3a и eRF3b человека мы использовали бакуловирусную систему экспрессии. Клетки насекомых линии Sf21 трансфецировали с использованием вектора на основе бакуловируса AcMNPV,

несущего гены белков интереса. Функциональная активность полученных белков оценивалась в системе *in vitro*. Было обнаружено, что ГТФазная активность фактора eRF3a человека в 1,5 раза превышает способность eRF3b к гидролизу ГТФ.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (23-14-00063).*

1. Kisselev L., Ehrenberg M. *et al.*, J. The EMBO. 22(2), 175–182 (2003).
2. Jakobsen C.G., Sogaard T.M. *et al.*, J. Molecular biology. 35, 575–583 (2001).
3. Zhouravleva G., Frolova L. *et al.*, J. The EMBO. 14(16), 4065–4072 (1995).
4. Chauvin C., Salhi S. *et al.*, Molecular and Cellular Biology. 25(14), 5801–5811 (2005).



## Kaiso привлекает скаффолдный белок TRIM28 к хроматину

Лобанова Я. В.<sup>1,2</sup>, Старшин А. С.<sup>1</sup>, Мазур А. М.<sup>1,2</sup>, Женило С. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

yaraloban@yandex.ru

Метил-СpG-связывающие белки с цинковыми пальцами играют ключевую роль в регуляции экспрессии множества генов. Связываясь с метилированной ДНК, они привлекают дополнительные факторы, вносящие различные эпигенетические модификации. Одним из таких белков является Kaiso, способный не только выступать в качестве интерпретатора метилирования ДНК, но также влиять на уровень метилирования соответствующих участков. Kaiso вовлечен в регуляцию множества процессов от регуляции клеточного цикла и иммунного ответа, развития воспаления и ряда злокачественных новообразований, до обучения и формирования памяти. Тем не менее механизм, который обуславливает вовлеченность Kaiso в эти процессы, требует уточнения.

Ранее было показано взаимодействие Kaiso с TRIM28 [1], ключевым фактором, обеспечивающим поддержание геномного импринтинга и замалчивание повторяющихся элементов. Тем не менее неясно, происходит ли образование комплекса Kaiso-TRIM28 на хроматине и является ли Kaiso фактором, способным привлекать TRIM28 к ДНК, аналогично KRAB-белкам с цинковыми пальцами.

В качестве модельной системы были использованы клетки светлоклеточного рака почки человека (*Saki1*) дикого типа (WT), с нокаутом по гену *zbtb33*, кодирующему белок Kaiso (KKO), а также клетки с нокаутом по гену *trim28* (TKO), полученные с помощью CRISPR/Cas9 геномного редактирования.

На основании анализа клеточных фракций, полученных из клеток *Saki1* WT и *Saki1* KKO, было показано снижение количества связанного с хроматином TRIM28 по сравнению с клетками дикого типа.

Хроматин-иммунопреципитация из клеток *Saki1* WT, *Saki1* KKO и *Saki1* TKO с дальнейшим секвенированием показала, что удаление *Kaiso* приводит к сокращению количества участков ДНК, где был детектирован TRIM28.

Таким образом, Kaiso способствует привлечению TRIM28 к хроматину, что уточняет механизм его действия в качестве регулятора уровня метилирования его участков связывания с ДНК, а также позволяет предположить, что Kaiso вовлечен в регуляцию моноаллельной экспрессии.

1. Lobanova Y. *et al.*, Biochimie, 206, 73–80 (2023).

## Роль VlhA антигенов бактерии *Mycoplasma gallisepticum* в регуляции ответа на стресс

Макарикова О. Л., Матюшкина Д. С., Бутенко И. О.,  
Васильева Е. А., Говорун В. М.

Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины  
Роспотребнадзора, Москва, Россия

makarikovaolga82@gmail.com

Микоплазмы – это самовоспроизводящиеся бактерии с редуцированным геномом. Однако механизмы адаптации этих бактерий к стрессу неясны. Особую роль в этом могут играть поверхностные вариабельные липопротеины и гемагглютинины (VlhA). В качестве модельного объекта мы использовали бактерию *Mycoplasma gallisepticum* в связи с простотой ее культивации и безопасностью для человека.

Для VlhA характерна антигенная изменчивость, позволяющая бактериям избегать иммунной системы хозяина. У *M. gallisepticum* она возникает за счет мутаций в промоторе генов [1]. В работах по изучению *Staphylococcus aureus* была показана зависимость изменения состояния ацилирования антигенов с изменением внешних условий [2]. Ранее наши коллеги показали, что во время стресса *M. gallisepticum* S6 теряет часть VlhA, что может быть адаптивным и универсальным ответом «минимальной» клетки на стресс. Но механизм такого сброса антигенов остается неизученным. Целью данной работы было изучить характеристики VlhA *M. gallisepticum* S6, которые могут обуславливать данный механизм.

По доменной архитектуре все аннотированные в геноме *M. gallisepticum* S6 VlhA можно разделить на две группы: полноразмерные белки, которые имеют (1) сигнальный пептид типа II, (2) неструктурированный регион, (3) два FIVAR-домена и (4) домен, свойственный гемагглютинином микоплазм; фрагменты, которые не имеют функционального сигнального пептида на N-конце. По-видимому, полноразмерные VlhA *M. gallisepticum* S6 экспортируются системой секреции Sec и разрезаются сигнальной пептидазой II. Состояние ацилирования планируется выяснить с помощью масс-спектрометрии.

На протеомном уровне показано, что определенные VlhA меняют свою представленность в стрессовых условиях. Охарактеризованы изменения представленности пептидаз, белков, ассоциированных с секрецией и процессингом VlhA. Выделены кандидаты среди пептидаз, которые могут приводить к выщеплению антигенов из мембраны.

Работа выполнена при поддержке государственного задания № 1022040800170-3-1.6.23 службы Роспотребнадзора «Создание искусственных клеточных систем».

1. Glew, Michelle D. *et al.* Expression of the pMGA genes of *Mycoplasma gallisepticum* is controlled by variation in the GAA trinucleotide repeat lengths within the 5' noncoding regions. *Infection and immunity* 66.12 (1998): 5833–5841.
2. Kurokawa K. *et al.* Environment-mediated accumulation of diacyl lipoproteins over their triacyl counterparts in *Staphylococcus aureus* // *Journal of bacteriology*. 2012. V. 194. No. 13. P. 3299–3306.

## **Анализ ассоциированных с шизофренией различий в липидном составе мозга на примере четырех структур**

Маклак А. Н.<sup>1</sup>, Сенько Д. А.<sup>2</sup>, Стекольников Е. А.<sup>2</sup>, Хайтович Ф. Е.<sup>2</sup>,  
Осетрова М. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия*

<sup>2</sup> *Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия*

*lesya.maklak.98@mail.ru*

Липиды составляют существенную долю сухого вещества мозга [1] и являются его необходимыми структурными и функциональными элементами. Изменения в липидном составе влияют на работу мозга и могут служить маркером заболеваний. В нашей работе мы исследовали особенности липидного состава мозга, характерные для шизофрении.

Мы провели сравнительный анализ постмортального липидома 12 здоровых доноров и 12 больных шизофренией в регионах серого и белого вещества мозга: полей 9 и 22 по Бродману, а также передней и задней частей мозолистого тела. Посредством двухфазной экстракции с дальнейшим применением масс-спектрометрического анализа были выделены и идентифицированы более четырехсот липидов, представляющих 26 липидных классов.

Метод главных компонент показал различие в распределении липидов у больных шизофренией и здоровых доноров. Выявлено значимое преобладание глицерофосфолипидов, свободных жирных кислот и N-ацил-этанолламинов среди классов, имеющих разный уровень хотя в одном из регионов мозга между группами здоровых доноров и больных шизофренией.

Дополнительно показана разница в липидном составе мозга между двумя полами в группе здоровых доноров, подтвержденная корреляцией с ранее опубликованными данными для мышей [2]. Интересно, что в группе больных шизофренией величина разницы между полами снижена.

Результаты нашего исследования позволили выявить тренд на изменение определенных липидных классов при шизофрении и обозначить потенциальную ассоциацию этих изменений с фактором пола.

*Работа поддержана грантом Российского научного фонда 22-15-00474.*

1. Hussain G., Anwar H., Rasul A., Imran A., Qasim M., Zafar S., Imran M., Kamran S.K.S., Aziz N., Razzaq A., Ahmad W., Shabbir A., Iqbal J., Baig S.M., Ali M., Gonzalez de Aguilar J.L., Sun T., Muhammad A., Muhammad Umair A. Lipids as biomarkers of brain disorders. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020;60(3):351–374. doi: 10.1080/10408398.2018.1529653. Epub 2019 Jan 7. PMID: 30614244.
2. Ding J., Ji J., Rabow Z., Shen T., Folz J., Brydges C.R., Fan S., Lu X., Mehta S., Showalter M.R., Zhang Y., Araiza R., Bower L.R., Lloyd K.C.K., Fiehn O. A metabolome atlas of the aging mouse brain. *Nat Commun.* 2021 Oct 15;12(1):6021. doi: 10.1038/s41467-021-26310-y. PMID: 34654818; PMCID: PMC8519999.

## Разработка систем экспрессии рекомбинантных белков в *Escherichia coli* и *Pichia pastoris* для переработки биоразлагаемых отходов

Маковеев К. А., Бобров К. С., Кульминская А. А., Сизова И. А.

«Курчатовский геномный центр – ПИЯФ», Гатчина, Россия

*ljeFsk@yandex.ru*

Целью нашей работы является создание штаммов метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* и микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, продуцирующих кутиназы – ферменты, деградирующие биоразлагаемый пластик.

Общим приемом, используемым при создании штаммов-продуцентов, является экспрессия генов целевых белков, в известных экспрессионных системах. Бактериальные системы, основанные на клетках *E. coli*, неприхотливы в работе, но не позволяют получать функционально активные эукариотические белки, т. к. бактериальные клетки не всегда обеспечивают правильные пострансляционные модификации и белковый фолдинг [1]. У дрожжей *P. pastoris* пострансляционные модификации разнообразнее, что позволяет широко использовать их для экспрессии эукариотических белков, однако и они не решают всех задач. Новым перспективным организмом для экспрессии эукариотических белков является микроводоросль хламидомонада, сочетающая в себе простоту бактериальных систем и возможности эукариотических. Однако у хламидомонады экспрессия интегрированных в геном чужеродных генов часто подавляется на уровне транскрипции вследствие позиционного эффекта и генного сайленсинга. Одним из способов преодоления сайленсинга является направленное встраивание генов в геном с использованием системы CRISPR/Cas9 [2].

Наши задачи: 1) приготовление продуцента и наработка эндонуклеазы Cas9 для конструирования продуцента кутиназ на основе *Chlamydomonas*; 2) клонирование и экспрессия генов, кодирующих потенциальные кутиназы, в клетках дрожжей *P. pastoris* и выбор последовательностей, кодирующих секретлируемые белки с высокой биоразлагающей активностью, для конструирования штаммов – продуцентов кутиназ.

На основе штамма *E. coli* Rosetta2 были сконструированы клетки, синтезирующие эндонуклеазу Cas9, наработан белок Cas9 и показана его сайт-специфическая эндонуклеазная активность *in vitro*. Ранее было обнаружено, что штамм гриба *Aureobasidium pullulans* ВКМ 1116 из коллекции НИЦ «Курчатовский институт» деградирует биоразлагаемый полимер поликапролактон. Мы провели

анализ баз данных GENBank и MycoCosm, содержащих геномные последовательности гриба *A. pullulans* и выявил 6 последовательностей на 50–67 % гомологичных генам кутиназ. Далее мы амплифицировали указанные гены с использованием в качестве матрицы хромосомную ДНК штамма *A. pullulans* ВКМ 1116. Секвенирование ПЦР-продуктов с последующим выравниванием нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с помощью алгоритма Blast показало, что выявленные гены высокогомологичны генам потенциальных кутиназ гриба *A. pullulans* var. *namibae*, содержат многочисленные молчащие однонуклеотидные замены и 2–3 % аминокислотных замен. Далее на основе вектора *P. pastoris* мы получили генетическую конструкцию pPICZ $\alpha$ : Cut537, содержащую кодирующую последовательность гена Cut537 *A. namibae*, и трансформировали ее в клетки штамма *P. pastoris* GS115. Получен штамм *P. pastoris*, секретирующий, белок Cut537 в культуральную жидкость, ферментативная активность и специфичность которого анализируются в настоящее время.

1. A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production / A. Schütz, F. Bernhard, N. Berrow [et al.]. — DOI 10.1016/j.xpro.2023.102572. — Text: electronic // STAR Protocols. — 2023. — V. 4, iss. 4. — P. 53.
2. Site-specific gene knock-in and bacterial phytase gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* via Cas9 RNP-mediated HDR / H.S. Zadabbas, A. Akbarzadeh, H. Ofoghi, S. Kadkhodaei. — DOI 10.3389/fpls.2023.1150436. — Text: electronic // Frontiers in Plant Science. — 2023. — V. 14.



## **Влияние копияности системы рестрикции-модификации CfrBI на защиту клеток *Escherichia coli* от вирусной инфекции фага λ**

Малинникова Л. Н., Морозова Н. Е., Ходорковский М. А.

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

lybalyba02@mail.ru

Множественная устойчивость бактерий к антибиотикам является одной из серьезнейших проблем современности. В наше время необходимо искать новые методы борьбы с бактериальными инфекциями.

Бактерии являются самыми распространенными живыми организмами в природе. Они часто подвергаются инфекции вирусами – бактериофагами. В ходе эволюции бактерии приобретают различные механизмы защиты от вирусов, а бактериофаги – методы преодоления данных систем защиты. Изучение этого явления имеет фундаментальное значение для науки, а также для промышленности и медицины.

Однако до сих пор эффективность фаготерапии остается мало изученной. Подробное изучение защитных систем бактерий может улучшить наше понимание данных механизмов защиты и помочь в создании антибактериальных фаговых препаратов [1].

Одной из широко распространенных системы защиты бактерий является система рестрикции-модификации. Системы рестрикции II типа состоят из двух ферментов, а именно метилтрансферазы (MT) и рестриктазы (P). MT модифицирует нативную ДНК хозяина, защищая от инфекции. В свою очередь P деградирует геном вируса, который не был подвергнут метилированию ферментом MT.

Система CfrBI найдена в *Citrobacter freundii*. Гены P и MT транскрибируются в противоположном направлении. Так как межгенная область содержит два перекрывающихся промотора, то экспрессироваться может только один из двух генов. Между этими генами находится сайт узнавания CfrBI, который может быть метилирован. В том случае, если он модифицирован, экспрессия гена P увеличивается, а MT ослабевает [2].

В настоящей работе было продемонстрировано, как копияность плазмиды с системой CfrBI в бактериях влияет на уровень защиты клеток от бактериофага λ, также показаны уровни MT и P в клетках на момент заражения вирусом.

1. Adhya S., Merrill C.R., Biswas B. Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Jan 1;4(1):a012518. doi: 10.1101/cshperspect.a012518.
2. Zakharova M. *et al.* Regulation of RNA polymerase promoter selectivity by covalent modification of DNA // *Journal of molecular biology.* 2004. V. 335. No. 1. P. 103–111.

## Изучение дифференциального взаимодействия шаперонов с амилоидными фибриллами в системе *in vitro*

Матвеевко А. Г., Цветков А. А., Михайличенко А. С., Барбитов Ю. А.,  
Журавлева Г. А.

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

[a.matveenko@spbu.ru](mailto:a.matveenko@spbu.ru)

Амилоиды – это белковые агрегаты, характеризующиеся высокоупорядоченной структурой. Переход белков в амилоидную форму часто сопряжен с развитием различных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона, однако, существуют и различные функциональные амилоиды [1]. Понимание механизмов распознавания белковых агрегатов может помочь в разработке новых методов терапии протеинопатий человека и млекопитающих.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются удобным модельным объектом для изучения амилоидов, так как в них были обнаружены амилоидные агрегаты некоторых белков, которые способны стабильно передавать свою конформацию в ряду клеточных поколений. Такие белки известны как дрожжевые прионы, наиболее изученными из них являются [*PSI<sup>+</sup>*] (сформирован белком Sup35), [*PIN<sup>+</sup>*] (Rnq1) и [*URE3*] (Ure2). Поддержание прионов у дрожжей зависит от баланса молекулярных шаперонов групп Hsp70 и Hsp40, а также молекулярной дезагрегазы Hsp104. Несмотря на общие известные механизмы поддержания прионов, изменение баланса шаперонов часто противоположным образом влияет на различные прионы дрожжей [2].

Мы предположили, что подобные эффекты могут зависеть от характера связывания различных шаперонов с агрегатами разных белков. Мы разработали систему, позволяющую количественно оценивать эффективность связывания шаперонов с амилоидными агрегатами *in vitro* [3]. С ее помощью мы показали, что шаперон Hsp40 Sis1 связывается с амилоидными агрегатами Sup35NM сильнее, чем с Rnq1. При этом отсутствие димеризационного домена Sis1 приводило к снижению эффективности его связывания с агрегатами, но достоверно не влияло на привлечение к агрегатам шаперона Hsp70 Ssa1. Полученные данные позволяют объяснить некоторые эффекты, которые шапероны оказывают на поддержание прионов *in vivo*. В дальнейшем мы планируем изучить также взаимодействие шаперонов с амилоидогенными белками человека.

*В работе использовалось оборудование РЦ РМиКТ НП СПбГУ; работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 23-74-01121.*

1. Matiiv A.B., Trubitsina N.P. *et al.*, *Biochemistry (Mosc)*. 85, 1011–1034 (2020).
2. Barbitoff Y.A., Matveenکو A.G., Zhouravleva G.A., *J Fungi (Basel)*. 8, 122 (2022).
3. Barbitoff Y.A., Matveenکو A.G. *et al.*, *FEMS Yeast Res.* 20, foaa025 (2020).

## **Использование дизоцилпина не приводит к изменению уровня экспрессии гена *NOS1AP* у крыс и в клетках линии SH-SY5Y**

*Матиив А. Б.<sup>1</sup>, Рогоза Т. М.<sup>1,2</sup>, Разговорова И. А.<sup>1</sup>, Марков А. Г.<sup>1</sup>,  
Журавлева Г. А.<sup>1,3</sup>, Бондарев С. А.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

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

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии  
амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

*antonmatiiv@yandex.ru*

Шизофрения – тяжелое психическое заболевание с широким спектром клинических и биологических проявлений [1]. До сих пор не выяснены молекулярные механизмы этой патологии [2]. Сейчас известно более 1 000 генов, предположительно связанных с развитием шизофрении [3]. Одним из них является *NOS1AP* [4]. Этот ген кодирует адаптерный белок синтазы оксида азота 1 (*NOS1AP*), продукция которого увеличена у пациентов с шизофренией. Он связывает нейрональную NO-синтазу и участвует в регуляции образования NO [5]. Согласно теории гипофункции глутаматергической системы при шизофрении [6] создавались модели с использованием антагонистов NMDA-рецепторов, таких как дизоцилпин (МК-801), способные вызывать нейрхимические и поведенческие изменения, сходные с теми, которые наблюдаются при шизофрении у людей [7].

В нашей работе мы исследовали, приводит ли применение МК-801 к сверхпродукции *NOS1A*, показанной у пациентов с шизофренией. Для этого были использованы крысы линии Wistar и клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y. Животные с симптомами шизофрении были получены с помощью инъекций МК-801 [8]. В качестве контроля использовали крыс, которым инъецировали физраствор. Из головного мозга крыс далее выделяли РНК для определения уровня экспрессии гена *NOS1AP*, а также белки с целью выявления разницы в продукции *NOS1AP*. Мы не обнаружили различий в уровне экспрессии гена *NOS1AP* и в уровне продукции *NOS1AP* у животных с симптомами шизофрении и контрольной группой. Аналогичным образом проводили работу с линией клеток SH-SY5Y, обработанных МК-801 или физраствором. В этом случае мы также не обнаружили разницы в уровне экспрессии гена *NOS1AP* и продукции белка *NOS1AP*.

Согласно полученным нами результатам экспрессия гена *NOS1AP* и продукция белка *NOS1AP* не меняются при использовании МК-801. Это может свидетельствовать о том, что применение этого вещества не приводит ко всем молекулярно-биологическим изменениям, возникающим при шизофрении.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-74-10042.*

1. Tomasik, Jakub *et al.*, Schizophrenia Research. 176, 1 (2016).
2. Price, Amanda J., Andrew E. Jaffe, and Daniel R. Weinberger, Molecular psychiatry. 26, 1 (2021).
3. Allen, Nicole C. *et al.*, Nature genetics. 40, 7 (2008).
4. Freudenberg, F., A. Alftoa, and Andreas Reif, Genes, Brain and Behavior. 14, 1 (2015).
5. Majmundar, Amar J. *et al.*, Science Advances. 7, 1 (2021).
6. Kruse, Andreas O., and Juan R. Bustillo, Translational Psychiatry. 12, 1 (2022).
7. Neill, Joanna C. *et al.*, Pharmacology & therapeutics. 128, 3 (2010).
8. Eyjolfsson, Elvar M. *et al.*, Neurochemistry international. 48, 6–7 (2006).

## Характеристика альтернативных и мутантных вариантов гена фактора транскрипции PAX4, приводящих к диабету типа MODY

Мельникова А. И.<sup>1</sup>, Краснова Т. С.<sup>2</sup>, Рубцов П. М.<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия*

<sup>2</sup> *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

*anyakuznetsova5@mail.ru*

PAX4 – это фактор транскрипции, участвующий в развитии инсулин-продуцирующих  $\beta$ -клеток поджелудочной железы на стадии эмбрионального развития. В настоящее время PAX4 рассматривается как один из ключевых факторов в разработке новых подходов к лечению сахарного диабета [1]. Известно несколько изоформ PAX4 дикого типа. При секвенировании гена PAX4 у больных с симптомами MODY обнаружен ряд новых мутаций – R19W, D126G, R183C, T199I, G235V, C282R и A330V. Цель данной работы – охарактеризовать изоформы PAX4 дикого типа, а также исследовать влияние мутаций на активность промотора инсулина человека и жизнеспособность клеток в условиях гипергликемического стресса.

В рамках работы получено 8 изоформ кДНК PAX4 дикого типа, отличающихся в участках, кодирующих N-конец, наличием или отсутствием первого экзона, а также наличием полного или усеченного гомеодомена. Установлено, что в клетках HEK293 изоформы PAX4, содержащие первый экзон, имеют значительно более высокую активность на промоторе гена инсулина человека по сравнению с соответствующими вариантами без него. Альтернативные изоформы PAX4 дикого типа имеют более низкую активность на инсулиновом и глюкагоновом промоторах человека по сравнению с канонической формой белка. Вариант PAX4 дикого типа с делецией одного экзона проявляет доминантно-негативное действие и нарушает транслокацию белка в клеточное ядро. Большинство исследуемых мутаций в гене PAX4 снижают его активность на промоторе гена инсулина по сравнению с диким типом в клетках HEK293. Мутанты R19W, R121W, R164W и R183C снижают активность инсулинового промотора сильнее, чем остальные, однако не проявляют сильного доминантно-негативного действия. Мутанты с заменами R121W, D126G, R164W, R183C, G235V сохраняют способность транслоцироваться в ядро. В клетках инсулиномы INS-1E сверхэкспрессия PAX4 дикого типа увеличивает жизнеспособность клеток при обработке их высокой

глюкозой (40 мМ), в то время как экспрессия мутантных вариантов R19W и R121W значительно ее снижает.

1. Lorenzo P. *et al.* Therapeutic potential of pancreatic PAX4-regulated pathways in treating diabetes mellitus // *Current Opinion in Pharmacology*. 2018. V. 43. P. 1–10.



## Получение новых мутаций, влияющих на собственный супрессорный эффект генов *TEF1* и *TEF2*

Михайличенко А. С., Матвеев А. Г., Цветков А. А., Журавлева Г. А.

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

*anast1221@gmail.com*

Гены *TEF1* и *TEF2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* имеют почти идентичные рамки считывания, и оба кодируют фактор элонгации трансляции eEF1A [1]. Ранее было показано, что некоторые доминантные мутации в данных генах влияют на нонсенс-супрессию [2]. Чтобы понять механизмы этого влияния, мы задались целью получить мутации генов *TEF1* и *TEF2*, изменяющие нонсенс-супрессорные свойства данных генов.

Для получения штаммов, у которых мутантная аллель *TEF2* кодирует единственную форму eEF1A, мы использовали штаммы с дизрупцией гена *TEF1*. С помощью системы CRISPR/Cas9 [3], мы встраивали мутантную копию *TEF2*, полученную при помощи неточной ПЦР, вместо *TEF2* дикого типа в данные штаммы. Для оценки нонсенс-супрессии в данных штаммах используется аллель *ade1-14* (UGA), которая приводит к накоплению красного пигмента-предшественника аденина. При повышении уровня нонсенс-супрессии путь биосинтеза восстанавливается, что фенотипически отражается в более светлой окраске колоний на среде со сниженным содержанием аденина.

Нам удалось отобрать 5 563 трансформанта, из которых 117 штаммов демонстрировали фенотип, соответствующий усилению их нонсенс-супрессорных свойств, и у 99 штаммов уровень нонсенс-супрессии, предположительно, был снижен. На данный момент фенотипы некоторых из данных штаммов были проанализированы, и при помощи секвенирования была установлена последовательность их гена *TEF2*.

В результате, нами впервые были обнаружены две мутации, приводящие к заменам аминокислот в С-терминальном домене белка eEF1A. Более того, ранее в ходе нашей работы была обнаружена аллель гена *TEF2*. На тот момент она была единственной аллелью данного гена, приводящей к снижению его супрессорных свойств. Однако мы уже обнаружили три штамма, несущие различные аллели гена *TEF2*, потенциально снижающие нонсенс-супрессорные свойства штаммов.

*В работе использовалось оборудование РЦ РМиКТ НП СПбГУ; работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 23-14-00063.*

1. Schirmaier F., Philippsen P., The EMBO journal. 3311–3315, 13 (1984).
2. Sandbaken M.G., Culbertson M.R., Genetics. 923–934, 4 (1988).
3. Matveenko A.G., Mikhailichenko A.S., Zhouravleva G.A., Microbiology (2024).

**Исследование рецеллюляризованных *in vivo* матриксов  
при имплантации в лабораторных мышей  
методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии**

Михуткин А. А.<sup>1</sup>, Копеева М. Ю.<sup>1</sup>, Рыбакова А. В.<sup>1</sup>, Шарикова Н. А.<sup>1</sup>,  
Антипова К. Г.<sup>1</sup>, Григорьев Т. Е.<sup>1</sup>, Васильев А. Л.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
Москва, Россия*

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

*Alex.Mikhutkin@gmail.com*

Искусственные внеклеточные матриксы из биополимерных материалов с необходимыми свойствами в настоящее время находят большое применение в тканевой инженерии [1]. Исследование процессов рецеллюляризации, зарастания клетками и тканью, образования естественного внеклеточного матрикса, биодegradации, деформации матриксов при их имплантации в живые организмы имеет при этом важнейшее значение в регенеративной медицине.

В работе изучались образцы рецеллюляризованных *in vivo* полилактидных матриксов двух типов с наполнением (модификацией) и без: неориентированные губчатые матриксы и волокнистые нетканые материалы с наполнителями коллаген и хитозан и без наполнителей, извлеченные из лабораторных мышей спустя 3 недели. В исследовании использовались аутбредные мыши самцы CD-1 в возрасте 2–3,5 месяцев. Имплантация образцов матриксов проводилась в подкожную клетчатку мышей в области холки, а их извлечение происходило на 21-е сутки после имплантации.

Исследование проводилось методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) [1, 2] на КЛСМ Olympus FV10i-W (Olympus Corporation, Japan). Образцы исследовались сначала без фиксации с двух сторон, далее образцы фиксировались в 4 % параформальдегиде (ПФА), резались лезвием поперек, и изучался поперечный срез зафиксированных в ПФА образцов. Изображения в КЛСМ получались с использованием четырех лазеров с длинами волн 405, 473, 559 и 635 нм, а также в режиме фазового контраста, и двух объективов: 10-кратного и 60-кратного водоиммерсионного объектива.

*Работа проведена при частичной поддержке НИЦ «Курчатовский институт».*

1. Mikhutkin A.A. *et al.*, BioNanoScience. 8, 511 (2018).

2. Tenchurin T.K. et al., Polymers. 14, 4352 (2022).

**Сравнение эффективности генной терапии *in vivo* и *ex vivo*  
на основе аденовирусных конструкций с геном *BMP2*  
для заживления костных дефектов**

Мокроусова В. О.<sup>1,2</sup>, Недорубова И. А.<sup>1</sup>, Меглей А. Ю.<sup>1,2</sup>, Басина В. П.<sup>1</sup>,  
Васильев А. В.<sup>2</sup>, Гольдштейн Д. В.<sup>1</sup>, Бухарова Т. Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва, Россия

victoria-mok@yandex.ru

В настоящее время генная терапия может являться эффективным инструментом для восстановления костной ткани. В генной терапии существуют два основных подхода: *in vivo* и *ex vivo*, которые обеспечивают пролонгированную продукцию целевого белка, вырабатываемого резидентными клетками. Для регенерации костной ткани перспективно использовать аденовирусные конструкции с геном *BMP2*.

Цель работы: сравнение эффективности репаративного остеогенеза при имплантации матриксов на основе коллагена, фибрина и полилактидных гранул, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2* (Ad-*BMP2*) или клетками, трансдуцированными Ad-*BMP2*, в зону критического дефекта теменных костей крыс.

Материалы и методы: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) получали из жировой ткани крысы. PLA гранулы инкубировали с Ad-*BMP2* или ММСК, трансдуцированными Ad-*BMP2*, затем смешивали с коллагеном и PRP, получая PLA/col/PRP-Ad-*BMP2* и PLA/col/PRP-ММСК(Ad-*BMP2*). Регенерацию костной ткани анализировали с помощью микроКТ через 8 недель после имплантации матриксов в зону дефекта свода черепа критических размеров (7 мм) у крыс [1].

Результаты: с помощью микроКТ показано, что имплантация всех исследуемых матриксов в область критического дефекта теменных костей крыс приводит к формированию новой костной ткани в основном со стороны исходной кости. Обнаружены значительные различия в стимуляции неоosteогенеза при имплантации ГАМ. Доля новообразованной костной ткани при имплантации PLA/col/PRP-Ad-*BMP2* составила  $25,8 \pm 4,5$  %, PLA/col/PRP-ММСК(Ad-*BMP2*) –  $57,2 \pm 17$  %, неактивированных PLA/col/PRP –  $12,9 \pm 5,9$  %, пустого дефекта  $4,3 \pm 3,2$  %.

В ходе сравнительного исследования было обнаружено, что PLA/col/PRP-MS(Ad-BMP2) обеспечивают более эффективную регенерацию по сравнению с матриксами PLA/col/PRP-Ad-BMP2. Таким образом, генная терапия *ex vivo* продемонстрировала большую эффективность по сравнению с подходом *in vivo*, что делает ее более перспективным методом для клинического использования при лечении дефектов кости.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-75-10147.*

1. Bukharova T.B. *et al.* Adenovirus-Based Gene Therapy for Bone Regeneration: A Comparative Analysis of *In Vivo* and *Ex Vivo* BMP2 Gene Delivery // Cells. 2023. V. 12. No. 13. P. 1762.

**Исследование влияния таргетных препаратов  
на восстановление функциональной активности CFTR-канала  
с патогенным вариантом N1303K**

Мокроусова Д. О., Ефремова А. С., Краснова М. Г., Булатенко Н. В.,  
Бухарова Т. Б., Гольдштейн Д. В.

*Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва, Россия*

*diana-mok2000@yandex.ru*

Муковисцидоз (МВ) – распространенное аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное патогенными вариантами в гене муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости *CFTR*. Ген *CFTR* кодирует ионный канал, через который осуществляется транспорт анионов хлора и бикарбоната на апикальной мембране эпителиальных клеток [1].

Патогенный вариант N1303K (с.3909C>G, р.(Asn1303Lys)) относится ко II классу вариантов гена *CFTR* и приводит к нарушению процессинга и транспорта белка к апикальной мембране клеток. По данным Регистра пациентов с муковисцидозом в РФ 2021 г. частота N1303K составляет 1,52 %, что соответствует 10 месту по распространенности в России [2]. В международной базе CFTR2 вариант N1303K с частотой 1,58 % занимает 4 место [3]. Несмотря на свою распространенность, этиотропное лечение при данном варианте аллеля *CFTR* плохо охарактеризовано. Показания к применению зарегистрированных таргетных препаратов для лечения МВ не включают вариант N1303K.

Оценка остаточной функциональной активности CFTR-канала и персонализированный подбор таргетных препаратов для пациентов с МВ проводятся с помощью форсколин-индуцированного набухания (FIS-теста) кишечных органоидов, полученных из ректальных биоптатов [4].

Для исследования влияния CFTR-модуляторов на активность канала с вариантом N1303K были получены стабильные культуры кишечных органоидов от двух пациентов с генотипом N1303K/I класс. CFTR-модуляторы могут оказывать положительное влияние на восстановление функционального CFTR при некоторых вариантах II класса, в отличие от вариантов I класса, при которых не образуется белок CFTR. С помощью FIS-теста на органоидах было продемонстрировано отсутствие остаточной функциональной активности белка CFTR и значительное восстановление работы дефектного канала после инкубации органоидов с таргетным препаратом, содержащим элексакафтор, тезакафтор и ивакафтор (Трикафта®). Таким образом, пациентам с вариантом

*CFTR* N1303K может быть рекомендована терапия комбинированным препаратом Трикафта®.

1. Liu F., Zhang Z., Csanády L., Gadsby D.C., Chen J. Molecular structure of the human CFTR ion channel. *Cell*, 169(1), 85–95 (2017).
2. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2021 год. / Под ред. С. А. Красовского, М. А. Стариновой, А. Ю. Воронковой, Е. Л. Амелиной, Н. Ю. Каширской, Е. И. Кондратьевой, Л. П. Назаренко. СПб.: Благотворительный фонд «Острова», 2023, 81 с.
3. The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) URL: <http://cftr2.org/> (дата обращения: 09.01.2023).
4. Dekkers J.F., van der Ent C.K., Beekman J.M. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. *Rare Diseases*, 1(1), 939-945 (2013).



## Поиск новых механизмов переноса аминокислот с разветвленным радикалом через цитоплазматическую мембрану *Escherichia coli* K-12

Молев С. В.<sup>1,2</sup>, Хозов А. А.<sup>1,2</sup>, Выборная Т. В.<sup>1</sup>, Степанова А. А.<sup>1</sup>,  
Бубнов Д. М.<sup>1</sup>, Мелькина О. Е.<sup>1</sup>, Привалова А. А.<sup>1,3</sup>,  
Нетрусов А. И.<sup>2</sup>, Синеокий С. П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Курчатовский геномный центр Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова МИРЭА – Российского технологического университета, Москва, Россия

Ms1762@yandex.ru

Транспорт метаболитов через мембрану играет центральную роль в поддержании гомеостаза бактериальной клетки и обеспечении адекватного ответа на изменение условий окружающей среды. Вместе с тем, процесс поиска мембранных переносчиков и описания их свойств все еще далек от завершения [1].

В ходе нашей работы мы обнаружили, что некоторые мутации, придающие клеткам *Escherichia coli* устойчивость к L-валину, локализуются в гене *yhjE*, продукт которого принадлежит к семейству H<sup>+</sup>-зависимых симпортеров. С использованием штаммов, неспособных к синтезу L-лейцина и L-изолейцина и лишенных известных транспортеров этих аминокислот, мы провели *in vivo* анализ и показали, что YhjE участвует в поглощении L-изолейцина, но не L-лейцина, что было подтверждено в ходе *in vitro* измерения его активности по отношению к этим аминокислотам. Также мы исследовали влияние избытка 19 аминокислот на активность YhjE. Среди них к значительному снижению приводило внесение в реакционную смесь L-валина, L-цистеина и L-тирозина, что может свидетельствовать о конкурентном ингибировании и, следовательно, о способности YhjE к транспорту этих аминокислот.

Для исследования регуляции экспрессии мы измерили активность промотора *yhjE* и активность транспорта L-изолейцина, опосредованную его продуктом. Культивирование клеток в присутствии L-изолейцина, L-метионина и L-лейцина приводило к снижению обеих величин. В результате инактивации Lrp, контролирующего системы синтеза и транспорта аминокислот, активность промотора значительно снижалась, что объясняет репрессию со стороны L-лейцина, внесенного в среду.

Исходя из полученных результатов, мы делаем вывод о том, что *yhjE* кодирует транспортер L-изолейцина, L-валина и, возможно, L-цистеина и L-тирозина, экспрессия которого контролируется *Lgr* и подавляется L-изолейцином, L-лейцином и L-метионином. Более детальное изучение *YhjE* требует очистки этого белка с последующим исследованием его свойств в составе протеолипосом, что является предметом нашей дальнейшей работы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» и частичной поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2019-1659.*

1. Karp P.D., Ong W.K., Paley S., Billington R., Caspi R., Fulcher C., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., Midford P.E., Subhraveti P., Gama-Castro S., Muñiz-Rascado L., Bonavides-Martinez C., Santos-Zavaleta A., Mackie A., Collado-Vides J., Keseler I.M., Paulsen I. (2018). The EcoCyc Database. *EcoSal Plus* 8. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2018.

**Ингибирование транскрипционного фактора FoxO1  
в модели рецидива колоректального рака *in vitro*  
как возможный подход борьбы с рецидивирующими опухолями**

Моршнева А. В., Гнедина О. О., Иготти М. В.

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

*1195alisa@gmail.com*

В ходе терапии рака часть покоящихся клеток, называемых также дормантными [1], выживает, составляя популяцию клеток, определяемую как минимальная остаточная болезнь (МОБ). Это является одной из наиболее острых проблем в противораковой терапии, поскольку впоследствии такие клетки могут дать начало новой более устойчивой опухоли и привести к рецидиву заболевания. Изучение дормантных клеток и поиск способов их устранения – актуальные, но трудные задачи, поскольку популяция МОБ крайне мала, и потому спектр доступных молекулярно-биологических методов при работе с единичными выжившими клетками существенно ограничен.

Нами была разработана модель опухолевого рецидива, которая является по своей сути моделью МОБ, однако значительно расширяет спектр доступных нам методов благодаря высокой доле выживших клеток. В данной модели в устойчивых к препаратам платины клетках колоректального рака [2] в течение 20–40 дней реализуется полный цикл опухолевого рецидива: частичная гибель клеток после химиотерапевтического воздействия, блок клеточного цикла, восстановление повреждений и возвращение к активной пролиферации.

Находясь в покоящемся состоянии после обработки препаратами платины, клетки слабо отвечают на повторное цитотоксическое воздействие. В этот момент клетки активно экспрессируют маркеры аутофагии, репарации ДНК и стволовости. Также многократно повышается экспрессия транскрипционных факторов FoxO, задействованных в регуляции всех этих процессов [3]. По нашим данным, селективный ингибитор FoxO1 вещество AS1842856 вызывает гибель клеток остаточной популяции и усиливает их ответ на цитотоксическое воздействие. Схожий эффект был получен при использовании ингибиторов аутофагии. Таким образом, ингибирование активности транскрипционных факторов FoxO, являющихся ключевым компонентом клеточного ответа на стресс, осложняет устранение повреждений и приводит к усилению гибели дормантных опухолевых клеток.

1. Phan T.G., Croucher P.I. Nature Reviews Cancer. 7, 20 (2020).
2. Morshneva A. *et al.*, Cell and Tissue Biology. 16 (2022).
3. Calnan D.R., Brunet A. *et al.*, Oncogene. 16, 27 (2008).

## Обнаружение и молекулярный анализ новых российских изолятов вирусов косточковых культур

Моцарь Е. В.<sup>1</sup>, Шевелева А. А.<sup>1</sup>, Шарко Ф. С.<sup>2</sup>, Митрофанова И. В.<sup>3</sup>,  
Чирков С. Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
биологический факультет, Москва, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва,  
Россия

<sup>3</sup> Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, Москва, Россия

[elena.motsar31@gmail.com](mailto:elena.motsar31@gmail.com)

Изучали вирусы косточковых культур (*Prunus* spp., семейство *Rosaceae*) в генофондовых коллекциях Никитского ботанического сада, г. Ялта. Вирусы в симптоматичных деревьях идентифицировали с помощью ИФА, ОТ-ПЦР и метатранскриптомного анализа. Полные вирусные геномы собирали из прочтений, полученных при высокопроизводительном секвенировании. Впервые в России обнаружен cherry virus A (род *Capillovirus*, семейство *Betaflexiviridae*) [1] в гибриде *P. cerasifera* Erch. x *P. armeniaca* s. Shlor Tsiran. Филогенетический анализ полных геномов показал, что российский изолят кластеризуется с не-вишневыми изолятами из различных регионов мира. Little cherry virus 1 (род *Velarivirus*, семейство *Closteroviridae*) [2] выявлен при анализе вирома бессимптомного тригибрида (*P. cerasifera* Erch. x *P. armeniaca* L.) x *P. brigantia* Vill. Полный геном состоял из 16 930 нуклеотидов, содержал восемь открытых рамок считывания (ОРС) и оказался наиболее близок (77,3 % идентичности) греческому изоляту G15\_3 из черешни. Иларвирусы prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) и prune dwarf virus (PDV) (род *Illavirus*, семейство *Bromoviridae*) являются одними из самых распространенных вирусов косточковых культур [3], но практически не исследованы в России. Изоляты PNRSV обнаружены при анализе деревьев *P. domestica* s. Cacanska beste и тригибрида (*P. cerasifera* Erch. x *P. armeniaca* L.) x *P. brigantia* Vill. Изолят PDV выявлен при анализе вирома сеянца сливы неизвестного сорта. Полные геномы российских изолятов состояли из трех РНК и были организованы в четыре ОРС. Филогенетические деревья, реконструированные по разным сегментам генома PDV и PNRSV, показывали различный порядок ветвления для ряда изолятов этих вирусов. Таким образом, полученные результаты расширяют представления о географическом распространении и генетическом разнообразии вирусов косточковых культур.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-16-00032.*

1. Marais A., Candresse T., Svanella-Dumas L., Jelkmann W. Cherry virus A. Chapter 29. *In* Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits; Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W., Eds.; APS Press: St Paul, MN, USA. 147–150 (2011).
2. Jelkmann W., Eastwell K.C. Little cherry virus-1 and -2. Chapter 31. *In* Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone Fruits; Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W., Eds. // APS Press: St Paul, MN, USA. 153–159 (2011).
3. Pallas V., Aparicio F., Herranz M.C., Sanchez-Navarro J.A., Scott S.W. The molecular biology of ilarviruses // *Adv. Vir. Res.* 87: 139–181 (2013).

## Оценка корреляции уровня $\alpha$ -синуклеина эритроцитов и активности глюкоцереброзидазы в периферической крови при болезни Паркинсона

*Мультатули Л. А.<sup>1</sup>, Журавлев А. С.<sup>1,2</sup>, Копытова А. Э.<sup>1,2</sup>, Лавринова А. О.<sup>1</sup>,  
Пидюрчина В. Н.<sup>1</sup>, Демидова Е. А.<sup>1</sup>, Милюхина И. В.<sup>1,2,3</sup>, Беркович О. А.<sup>2</sup>,  
Пчелина С. Н.<sup>1,2</sup>, Емельянов А. К.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup> Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

*linamultatuly@gmail.com*

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, связанное с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции мозга человека, сопровождающееся накоплением и агрегацией в них белка  $\alpha$ -синуклеина. Деградация  $\alpha$ -синуклеина в клетке происходит с участием лизосом. Дисфункция ферментов лизосом может способствовать накоплению  $\alpha$ -синуклеина, что вносит вклад в патогенез БП [1].

Целью работы являлась оценка уровня белка  $\alpha$ -синуклеина в эритроцитах периферической крови и оценка его корреляции с активностью лизосомного фермента глюкоцереброзидазы (GCase) в крови пациентов с БП и лиц контрольной группы.

В данное исследование вошла группа пациентов с БП, не принимающих Л-ДОФА-содержащих препаратов, ( $N = 17, 60,9 \pm 8,7, 7$  м.) и здоровых лиц контроля ( $N = 10, 62,7 \pm 6,4, 6$  м.). Эритроциты выделялись из 8 мл периферической крови путем центрифугирования в градиенте плотности раствора фиколла. Клеточный лизат был получен методом ультрацентрифугирования 250 мкл ранее собранных эритроцитов [2]. Определение уровней общего и олигомерного  $\alpha$ -синуклеина проводилось методом дот-блоттинга [3]. Оценка активности GCase в периферической крови проводилась методом ВЭЖХ-МС/МС.

В результате работы при сравнении групп пациентов с БП и контроля не обнаружено статистически значимой разницы как в случае общего, так и олигомерного  $\alpha$ -синуклеина эритроцитов периферической крови ( $p > 0,05$ ). Обнаружена обратная корреляция между активностью GCase и относительным уровнем олигомерного  $\alpha$ -синуклеина в эритроцитах лиц контрольной группы ( $p = 0,001$ ), но не в группе пациентов с БП.

Исходя из полученных данных можно предположить, что БП не сопровождается накоплением общего и олигомерного  $\alpha$ -синуклеина в эритроцитах периферической крови и характеризуется отсутствием взаимосвязи их уровня в данных клетках с активностью GCase в крови.

*Работа выполнена при финансовой поддержке фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-123-05.*

1. Velayati A., Yu W.H. *et al.*, Curr Neurol Neurosci Rep.10, 3 (2010).
2. Golomidov I.M., Latypova E.M. *et al.*, J. Neurogenet. 36, 1 (2022).
3. Oullier T., Prigent A. *et al.*, Free Neuropathol. 28, 1 (2020).



**Анализ клинических данных и анализ транскриптома пациентов с болезнью Кушинга выявили влияние мутации в *USP8* на АКТГ-секретирующие аденомы гипофиза**

Нерубенко Е. С., Цой У. А., Дмитриева Р. И.

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

*nerubenko.elena@bk.ru*

Целью исследования было изучить влияние мутации *USP8* на болезнь Кушинга.

35 пациентов (29 женщин, медиана 38 лет [31; 55], (18–67 возраст)) были включены в исследование. В 54 % (18/35) пациентов были найдены мутации в *USP8*.

Сравнили проценты микро-/макроаденом среди мутант-*USP8* ( $n = 18$ ) и WT-*USP8* ( $n = 17$ ) пациентов с БК, микроаденом среди мутант-*USP8* было больше,  $P = .04$ . Пациенты, несущие мутацию *USP8*, чаще сталкиваются с рецидивом роста аденомы после трансфеноидальной аденомэктомии  $P = .0015$ .

Анализ транскриптома показал 132 ДЭГа ( $\text{Log}_2\text{FC} > 1$  и  $\text{FDR} < .01$ ), из них 80 up и 52 down регулированы в мутант-*USP8*.

Выполнена K-means кластеризация сорегулируемых ДЭГов и было получено два кластера. Гены, принадлежащие полученным кластерам, были картированы на сигнальные пути, которые отфильтрованы по  $\text{FDR} < .1$ . В мутант-*USP8* up регулированы пути, связанные с пресинаптической деполяризацией и открытием кальциевых каналов (R-HSA-112308, *CACNA1A* и *CACNG4*), семейство сигнальных каскадов MAPK (R-HSA-5683057, *ERBB3*, *RASGRF1*, *MAPK4*, *ACTN2*). Down регулированы пути, связанные с регуляцией WNT сигнального пути (GO:0030111, *SFRP1* и *RSPO2*), с регуляцией эпителиальной клеточной пролиферации (GO:0050678, *SFRP1* и *LAMB1*).

Оценена экспрессия генов, участвующих в регуляции клеточного цикла. Наблюдаются значительные различия между аденомами мутант-*USP8* и WT-*USP8* в экспрессии *CDKN1B* ( $P = .049$ ,  $\text{Log}_2\text{FC} = -2$  в мутант-*USP8*).

Предположительно, что секретирующие АКТГ аденомы мутанты по *USP8*, могут влиять на онкогенные проявления за счет повышения регуляции *RASGRF1*, *MAPK4* и снижения регуляции опухолевого супрессора *CDKN1B* (p27) [1]. Активация эпителиальной пролиферации более типична для WT-*USP8* из-за повышения регуляции *SFRP1* и *LAMB1*, что согласуется с

полученными результатами по клиническим данным об отсутствии аденом мутант-*USP8* размером > 2 см по сравнению с *WT-USP8*.

1. Marinoni I., Pellegata N.S. p27kip1: A New Multiple Endocrine Neoplasia Gene? *Neuroendocrinology*. 93(1):19–28 (2011).

## Изучение взаимодействия ДНК в растворе с ионами железа (III) и катехином

*Никитин Д. А., Касьяненко Н. А.*

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

*St075754@student.spbu.ru*

Катехины относятся к растительным полифенолам, которые обладают высокой биологической активностью. В частности, отмечается противоопухолевая активность соединений этого класса [1]. Противоопухолевая активность катехинов была показана в ряде исследований [2]. В настоящее время ведется разработка терапевтических систем на основе катехинов, чтобы усилить их свойства. Ранее, например, отмечалась модификация действия катехинов в комплексах с ионами железа (III) [3].

Целью данной работы была проверка возможности образования комплексов ДНК с (+)-катехином в присутствии ионов железа (III) с использованием методов спектрофотометрии, вискозиметрии, динамического рассеяния света (ДРС) и атомно-силовой микроскопии. Было выявлено падение размеров клубка высокомолекулярной ДНК в растворах с ионами железа. Добавление катехинов в раствор ДНК с ионами железа приводит к еще большей компактизации ДНК. Также в растворах катехина с ионами железа было выявлено присутствие двух фракций наночастиц с размерами  $(40 \pm 10)$  нм и  $(200 \pm 50)$  нм.

Анализ данных, полученных методом вискозиметрии, показал, что более существенное падение приведенной вязкости растворов наблюдалось для системы «ДНК – ионы железа – катехин» по сравнению с растворами ДНК-катехин и ДНК-ионы железа, что согласуется с компактизацией ДНК, зафиксированной с помощью метода ДРС.

Спектральные свойства катехина в присутствии ионов железа не изменялись. По изменению спектров поглощения ДНК в растворе с ионами железа однозначно прослеживалось образование комплексов. Одновременное наличие катехинов и ионов железа в растворах ДНК приводило к дальнейшему изменению ее спектров поглощения, которое становилось более явным при увеличении отношения концентрации катехина к концентрации хлорида железа. Это свидетельствует об образовании комплексов ДНК с ионами железа и катехином.

Таким образом, нами была доказана возможность взаимодействия молекулы ДНК с (+)-катехином и ионами железа (III) одновременно с образованием комплексов «ДНК – ионы железа – катехин».

1. Cadoná F.C., Dantas R.F., de Mello G.H., Silva-Jr F.P. Natural products targeting into cancer hallmarks: An update on caffeine, theobromine, and (+)-catechin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–20 (2021).
2. Farhan M., Rizvi A., Ahmad A., Aatif M., Alam M.W., Hadi S.M. Structure of Some Green Tea Catechins and the Availability of Intracellular Copper Influence Their Ability to Cause Selective Oxidative DNA Damage in Malignant Cells. *Biomedicines*, 10, 664 (2022).
3. Manna M.S., Saha P., Ghoshal A. K. Iron complexation of pharmaceutical catechins through selective separation. *RSC Advances*, 4, 26247–26250 (2014).

## Биораспределение моноклональных антител к рецепторам VEGFR-1, CTLA-4 и Stabilin-1, меченных флюорофорами Cy5 и Cy7

Никитина А. В.<sup>1</sup>, Спицына А. С.<sup>1</sup>, Бурдаков В. С.<sup>1</sup>, Верлов Н. А.<sup>1,2</sup>,  
Кванчиани В. В.<sup>1</sup>, Штам Т. А.<sup>1,2</sup>, Коневега А. Л.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

*nikitina\_av@pnpi.nrcki.ru*

В современной литературе рецепторы VEGFR-1, CTLA-4 и Stabilin-1 описываются как перспективные мишени для противоопухолевой терапии [1]. Цель исследования – оценить биораспределение моноклональных антител к выбранным рецепторам *in vivo* и *ex vivo* в животных моделях с опухолями молочной железы (PMЖ) и кишечника (PK).

*In vivo* и *ex vivo* биораспределение антител к VEGFR-1, CTLA-4 и Stabilin-1 меченных флюоресцентным красителем Cy5 или Cy7, проводили на мышах породы Balb/DBA с перевитыми клетками PK мыши – CT26 или PMЖ – EMT-6-NanoLuc, а также на здоровых особях, и определяли с помощью системы визуализации флуоресценции LumoTrace FLUO.

В результате экспериментов *in vivo* было продемонстрировано накопление антител в областях перевитых опухолей PK и PMЖ, в то время как в здоровых мышах флуоресцентный сигнал антител регистрировался равномерно по площади тела мыши. Опыт *ex vivo* позволил определить степень накопления антител в различных органах: Антитела ко всем трем рецепторам преимущественно накапливались в опухолевых узлах, а затем в печени, почках и других органах, как у здоровых мышей. Также у здоровых мышей антитела обнаруживались в биологических жидкостях.

Моноклональные антитела к рецепторам VEGFR-1, CTLA-4 и Stabilin-1 активно накапливаются в опухолевых тканях различной этиологии (рак кишечника и рак молочной железы), в отличие от здоровых мышей, в организме которых можно наблюдать свободные антитела в венозной крови и их метаболизм в печени.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект 075-15-2021-1360).*

1. Ceci C. *et al.* Role of VEGFs/VEGFR-1 signaling and its inhibition in modulating tumor invasion: Experimental evidence in different metastatic cancer models // IJMS. 2020. V. 21. No. 4. P. 1388.

## Влияние мутаций в гене *GBA1* на биохимические характеристики первичной культуры макрофагов здоровых носителей и пациентов с болезнью Паркинсона

*Николаев М. А.<sup>1,2</sup>, Копытова А. Е.<sup>1,2</sup>, Изюмченко А. Д.<sup>1,2</sup>, Милюхина И. В.<sup>3</sup>,  
Байдакова Г. В.<sup>4</sup>, Захарова Е. Ю.<sup>4</sup>, Емельянов А. К.<sup>1,2</sup>, Пчелина С. Н.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва, Россия

*Nikolaev\_MA@pnpi.nrcki.ru*

Мутации в гене *GBA1*, кодирующем лизосомальный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), являются наиболее распространенной генетической причиной болезни Паркинсона (БП) (повышают риск развития БП в пять-семь раз и изменяют проявления БП, вызывая более ранний возраст начала, более тяжелую когнитивную дисфункцию и ускоренное прогрессирование нейродегенеративного процесса) [1]. Однако у большинства носителей мутаций в гене *GBA1* паркинсонизм никогда не развивается, поэтому очевидно, что играют роль другие факторы риска.

Цель: сравнить биохимические характеристики первичных макрофагов, полученных от пациентов с БП с мутациями в гене *GBA1* (GBA-БП), здоровых носителей мутаций гена *GBA1* (GBA-носители), пациентов со спорадическим БП (сБП) и контрольной группы.

В настоящем исследовании были оценены в первичных макрофагах исследуемых групп: активность GCase, концентрация субстрата, уровни белка GCase, альфа-синуклеина и катепсина D, транслокация GCase в лизосомы.

Мы показали снижение активности GCase и уменьшение транслокации GCase в лизосомы в макрофагах у гетерозиготных носителей мутаций гена *GBA1* (GBA-БП, GBA-носители) по сравнению с контролем. Уровень белка катепсина D был снижен в макрофагах гетерозиготных носителей мутаций гена *GBA1* по сравнению с контролем. Уровень белка GCase был снижен в макрофагах пациентов со сБП и GBA-носителей, но не у GBA-БП. Мы показали повышенную концентрацию субстрата GCase в макрофагах всех исследованных групп по сравнению с контролем. Пациенты с GBA-БП характеризуются повышенной концентрацией субстрата по сравнению с GBA-носителями.

Выявленные изменения биохимических параметров в макрофагах обусловлены наличием мутаций в гене GBA1 и не ассоциированы с развитием БП.

*Исследование поддержано грантом Российского научного фонда 24-25-00397.*

1. Do J., McKinney C., Sharma P., Sidransky E. Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Mol Neurodegener.* 2019 Aug 29; 14(1).



## Функциональный полиморфизм гена *FCGRT* макак-резус различного происхождения

Павлова Л. Е., Тимина М. Ф., Панченко А. В., Азумава А. А.

Курчатовский комплекс медицинской приматологии  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,  
Сочи, Россия

*pavlova\_laura@mail.ru*

VNTR полиморфизм гена  $\alpha$ -цепи неонатального Fc-рецептора к IgG (FCGRT) человека влияет на уровни экспрессии FCGRT и IgG. Функциональный полиморфизм гена *FCGRT* у обезьян может определять особенности фармакокинетики и фармакодинамики биофармацевтических препаратов. Ранее нами было проведено генотипирование и установлено, что в популяции макак-резус питомника ККМП VNTR полиморфизм гена *FCGRT* представлен 9 вариантами. Животные или их предки поступали в питомник в разное время из Индии, Вьетнама, Китая и других стран или питомников. В настоящее время нет данных о встречаемости VNTR полиморфизма гена *FCGRT* в популяциях различного происхождения, а по данным литературы она описана только у 75 макак-резус индийского происхождения [1]. Целью было изучение связи аллелей гена *FCGRT* макак-резус с происхождением обезьян.

В исследование включены 107 обезьян вида *Macaca Mulatta*. Для происхождения данные нормировали в диапазоне от 0 (отсутствие связи со страной импорта) до 1 (полное соответствие стране происхождения). Данные о генотипах и о происхождении обрабатывали в программе GraphPad Prism 8.0 методом ранговой корреляции Спирмена.

В изученной выборке 37 % макак-резус Индийского происхождения, 32 % – Вьетнамского и 31 % – прочего происхождения, в том числе из Китая. При этом менее 1 % – не являются результатом скрещивания между животными различного происхождения. Коэффициент корреляции Спирмена VNTR5 и «прочего» происхождения  $rs = 0,49$  ( $p < 0,0001$ ). Из 13 случаев с происхождением только из Индии или Вьетнама носители аллели VNTR5 отсутствуют. VNTR9, вероятно, не встречается у животных из Индии  $p < 0,01$ .

При планировании исследований биофармацевтических препаратов необходимо учитывать источник происхождения животных, который, вероятно, у обезьян может определять особенности фармакокинетики и фармакодинамики препаратов. VNTR5 не встречается у животных из Индии и Вьетнама. Отбор мутаций мог иметь адаптационное значение или являлся следствием пространственной изоляции.

1. Shubin Z., Tagaya Y. *et al.*, Immunogenetics. 70, 3 (2018).

**Влияние rs356219 (A/G), rs356168 (A/G) гена SNCA на уровень мРНК его сплайсинг вариантов в лимфоцитах периферической крови при синуклеинопатиях**

*Пидюрчина В. Н.<sup>1</sup>, Лавринова А. О.<sup>1</sup>, Журавлев А. С.<sup>1</sup>, Демидова Е. А.<sup>1</sup>, Милюхина И. В.<sup>1,2,3</sup>, Беркович О. А.<sup>2</sup>, Пчелина С. Н.<sup>1,2</sup>, Емельянов А. К.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

*pidyurchina.vn@gmail.com*

Синуклеинопатии (болезнь Паркинсона (БП), БП с деменцией (БПД), деменция с тельцами Леви (ДТЛ), мультисистемная атрофия (МСА)) характеризуются образованием агрегатов альфа-синуклеина (SNCA) в селективных популяциях нейронов и глии. Изоформы альфа-синуклеина (SNCA140, SNCA126, SNCA112, SNCA98) обладают различной способностью к агрегации [1]. Предполагается, что однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) гена SNCA могут влиять на уровень экспрессии данного гена [2, 3].

Цель исследования: оценка влияния ОНП rs356219, rs356168 гена SNCA на уровень мРНК его сплайсинг вариантов (SNCA140, SNCA126, SNCA112) в лимфоцитах периферической крови пациентов с синуклеинопатиями.

Исследование включало 651 пациента (80 МСА, 39 ДТЛ, 43 БПД и 489 БП), и 383 индивидуума контрольной группы. Уровень мРНК сплайсинг вариантов гена SNCA был оценен с помощью ПЦР в режиме реального времени (SYBR Green 1 (Bio-Rad, США)). Идентификацию ОНП проводилась методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом.

Выявлена ассоциация ОНП rs356219 и варианта rs356168\*GG с риском развития ДТЛ (OR = 2,02 [95%CI:1,27-3,23],  $p = 0,003$ ; OR = 2,44 [95%CI:1,23-4,82],  $p = 0,01$ ). Были подтверждены описанные нами ранее [4] ассоциации rs356219 и rs356168 с риском развития БП. Для пациентов с БП обнаружено увеличение уровня мРНК SNCA140 у носителей варианта rs356219\*AG по сравнению с носителями варианта rs356219\*AA ( $p = 0,046$ ), увеличение уровня мРНК SNCA112 у носителей варианта rs356168\*AG по сравнению с носителями варианта rs356168\*GG ( $p = 0,025$ ). Выявлено в контрольной группе увеличение уровня мРНК SNCA126 у носителей варианта rs356219\*GG, по сравнению с носителями варианта rs356219\*AG ( $p = 0,015$ ), увеличение уровня мРНК

SNCA112 у носителей варианта rs356168\*AG, по сравнению с носителями варианта rs356168\*AA ( $p = 0,025$ ).

Таким образом, показана ассоциация rs356219 и rs356168 гена SNCA с риском развития БП и ДТЛ, а также влияние аллеля риска G данных ОНП на экспрессию сплайсинг вариантов гена SNCA у пациентов с БП и контроля.

*Работа выполнена при финансовой поддержке «КГЦ – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, соглашение № 075-15-2019-1663.*

1. Murray I.V. *et al.* Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation *in vitro*. *Biochemistry*. 2003 Jul 22; 42(28):8530-40.
2. Schmitt I. *et al.* L-dopa increases  $\alpha$ -synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients *in vivo* and *in vitro*. *Mov Disord*. 2015 Nov; 30(13):1794-801.
3. McCarthy J.J. *et al.* The effect of SNCA 3' region on the levels of SNCA-112 splicing variant. *Neurogenetics*. 2011 Feb; 12(1):59–64.
4. Emelyanov A. *et al.* SNCA variants and alpha-synuclein level in CD45+ blood cells in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2018 Dec 15; 395:135–140.

## Блокирование VEGFR-1 моноклональными антителами как способ оценки ингибирования роста опухолей молочной железы и кишечника

Потысьева А. С.<sup>1,2</sup>, Гараева Л. А-А.<sup>1,2</sup>, Спицына А. С.<sup>1</sup>, Путевич Е. Д.<sup>1,2</sup>,  
Никитина А. В.<sup>1</sup>, Биджиева М. С.<sup>1,2</sup>, Емельянова С. С.<sup>1</sup>, Волницкий А. В.<sup>1</sup>,  
Соломина Л. А.<sup>1,2</sup>, Грачев А. А.<sup>1,2</sup>, Толичева О. А.<sup>1</sup>, Сидорова Ж. Ю.<sup>1</sup>,  
Трашков А. П.<sup>1,3</sup>, Бурдаков В. С.<sup>1</sup>, Верлов Н. А.<sup>1,3</sup>, Коневега А. Л.<sup>1,2,3</sup>,  
Штам Т. А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва,  
Россия

[alina.potyseva@yandex.ru](mailto:alina.potyseva@yandex.ru)

В современной литературе VEGFR-1 описывается как перспективная мишень для противоопухолевой терапии. Цель данного исследования – оценить перспективность использования моноклональных антител к VEGFR-1 на клеточных культурах рака молочной железы (PMЖ) и рака кишечника (PK) мыши и человека *in vitro*.

Экспрессию генов VEGF-A и VEGFR-1 определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Присутствие мембранного рецептора VEGFR-1 на поверхности или внутри клеток определяли методом проточной цитометрии, анализируя как иммортализованные TritonX-100 клетки, так и не обработанные клетки. Оценка эффективности ингибирования роста клеток при блокировании целевого рецептора моноклональными антителами производилась с помощью системы xCELLingence. Произведена оценка ингибирования роста клеток при конкурентном связывании препарата Avastin с VEGF-A в клеточной среде.

Моноклональные антитела к человеческому рекомбинантному VEGFR-1 были получены из асцитической жидкости мышей BALB/C, привитых гибридами. Очистка антител производилась с помощью аффинной хроматографии с последующим диализом. Проверка активности антител проводилась с помощью непрямого иммуноферментного анализа, по результатам которого были отобраны два наиболее аффинных клона антител. Полученные моноклональные антитела успешно связываются с антигеном VEGFR-1, уровень экспрессии которого по данным ОТ-ПЦР значителен в линиях PMЖ - MDA-MB-231 и MCF-7, а также в клетках линий PK – Hutu и Lovo. Однако

по результатам цитометрии мембранная форма рецептора VEGFR-1 присутствует на поверхности клеток MDA-MB-231, Hutu и Lovo, в то время для линии MCF-7 большая часть белка выявляется антителами внутри клеток. На всех клеточных линиях была протестирована *in vitro* схема лечения с использованием Авастина, связывающего VEGF-A, и отобранных моноклональных антител к рецептору VEGFR-1. Авастин не влиял на рост клеток SW-480, в которых уровень экспрессии к VEGFR-1 и VEGF-A регистрировался как минимальный среди всех линий; незначительно замедлял рост культур MDA-MB-231 и MCF-7 и значительно подавлял пролиферацию клеток линий Hutu, Lovo и CT26. Использование антител, связывающих рецептор VEGFR-1, незначительно влияло на пролиферацию клеток линий MCF-7 и SW-480 и значительно подавляло рост линии MDA-MB-231, EMT-6, Hutu, Lovo и CT26, что может быть связано с наличием антигена VEGFR-1 на поверхности этих клеток.

Таким образом, полученные моноклональные антитела имеют сродство к рецептору VEGFR-1 и эффективно ингибируют рост опухолевых клеток РМЖ или РК *in vitro* при связывании.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект 075-15-2021-1360).*

**Оценка влияния состава питательных сред на устойчивость  
к обезвоживанию различных штаммов винных дрожжей  
*Saccharomyces cerevisiae***

Провоторова Е. А.<sup>1,2</sup>, Колосова А. А.<sup>1</sup>, Федосов Д. Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Курчатовский геномный центр Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*ekaterina.provt@gmail.com*

Процесс производства активных сухих дрожжей, применяемых в виноделии, требует высокоустойчивых к обезвоживанию дрожжевых культур. Обезвоживание может приводить к значительным повреждениям клеток, вызванных окислительным и осмотическим стрессом. Устойчивые к обезвоживанию дрожжи сохраняют жизнеспособность, ферментативную активность и способность к делению. У разных штаммов чувствительность к обезвоживанию различна, что обусловлено способностью штаммов синтезировать ферменты антиоксидантной защиты и осмотически активные вещества, такие как трегалоза, глутатион, глицерин. Высокая каталазная активность предотвращает окислительный стресс, вызванный обезвоживанием [1, 2]. Также известно, что состав питательной среды влияет на устойчивость дрожжей к обезвоживанию [3].

В данном исследовании представлены результаты, полученные для 4 штаммов дрожжей. 2 из них были выделены из накопительных культур, полученных из проб ягод и листьев винограда виноградников Крыма и Кубани, 1 штамм получен из ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт», 1 штамм получен путем селекции в лаборатории молекулярной генетики дрожжей НИЦ «Курчатовский институт». Устойчивость к обезвоживанию для каждого штамма была исследована на питательных средах: YPD [4], YPGF [5], Molasses [5], YPGE [6], среде Ридер и полной среде [7]. Для всех четырех штаммов было показано, что культуры, полученные при росте на среде Ридер, показывают наилучшую устойчивость к обезвоживанию – увеличение жизнеспособности клеток от 0 % при росте на YPD до 28 % при росте на среде Ридер.

Таким образом, было показано, что состав питательных сред, которые используются для наращивания биомассы, влияет на устойчивость дрожжей к обезвоживанию, а также выявлена питательная среда, значительно увеличивающая устойчивость к обезвоживанию. Предположительно,

наращивание биомассы на питательной среде Ридер инициирует синтез ферментов антиоксидантной защиты и осмотически активных веществ.

*Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».*

1. Gamero-Sandemetrio E., Gómez-Pastor R., Matallana E. Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast. *Biotechnology journal*. 9(8):1055-64 (2014).
2. Глушакова А. М., Качалкин А. В., Желтикова Т. М., Чернов И. Ю. Устойчивость дрожжей разных экологических групп к длительному хранению в высушенном состоянии. *Микробиология*. 84(3):379–385 (2015).
3. Câmara Jr.A., Maréchal P.-A., Tourdot-Maréchal R. *et al.* Oxidative stress resistance during dehydration of three non-*Saccharomyces* wine yeast strains. *Food research international*. 123:364–372 (2019).
4. Jessica S. Dymond. *Saccharomyces cerevisiae* growth media. *Methods in enzymology*, 533:191–204 (2013).
5. Gamero-Sandemetrio E., Gómez-Pastor R., Matallana E. Zymogram profiling of superoxide dismutase and catalase activities allows *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* species differentiation and correlates to their fermentation performance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(10):4563-76 (2013).
6. Blanquet S., Garrait G., Beyssac E. *et al.* Effects of cryoprotectants on the viability and activity of freeze dried recombinant yeasts as novel oral drug delivery systems assessed by an artificial digestive system. 61(1-2):32-9 (2005).
7. Бурьян Н. И. Практическая микробиология виноделия. Симферополь: Таврида (2003).



## Экстраклеточные везикулы микроводорослей как доставщики экзогенного белка

Путевич Е. Д.<sup>1,2</sup>, Гараева Л. А.-А.<sup>1</sup>, Толстыко Е. А.<sup>1</sup>, Спицына А. С.<sup>1</sup>,  
Соломина Л. А.<sup>1,2</sup>, Сизова И. С.<sup>1</sup>, Емельянова С. С.<sup>1</sup>, Комарова Е. Ю.<sup>3</sup>,  
Коневега А. Л.<sup>1,2</sup>, Штам Т. А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

[putevich\\_ed@npi.nrcki.ru](mailto:putevich_ed@npi.nrcki.ru)

Экстраклеточные везикулы (ЭВ) – наноразмерные частицы, окруженные липидным бислоем, переносящие белки и нуклеиновые кислоты. ЭВ представляют собой перспективные системы доставки лекарственных веществ (ЛВ), поскольку могут целенаправленно доставлять молекулы без преждевременной деградации [1]. ЭВ продуцируются практически всеми типами клеток животных и растений. В частности, в данной работе мы исследовали ЭВ, выделенные из микроводорослей. Микроводоросли являются многообещающими продуцентами ЭВ растительного происхождения, поскольку им характерен быстрый рост и высокая плотность, а также условия их культивирования могут быть оптимизированы и стандартизированы [2].

В работе были подобраны условия культивирования микроводорослей, при которых выход секретлируемых ЭВ максимален. ЭВ были выделены из культуральной среды при помощи последовательного ультрацентрифугирования с последующей характеристикой везикул по размеру, концентрации и морфологии при помощи атомно-силовой и криоэлектронной микроскопии, анализа траектории наночастиц. Также было продемонстрировано отсутствие цитотоксического действия ЭВ микроводорослей на клетки человека *in vitro* при помощи системы xCELLingence.

Для доказательства перспективности ЭВ микроводорослей как доставщика ЛВ, везикулы были нагружены флуоресцентно меченным белком HSP70-BPY методом ультразвука, и была произведена сравнительная оценка доставки белка с помощью ЭВ к клеткам глиом (GI-Tr, A172), рака кишечника (Lovo, SW480), аденокарциномы легкого (A549) и эмбриональных почек человека (HEK293) *in vitro*. Эффективность доставки экзогенного белка ЭВ в клетки человека оценивали при помощи проточной цитометрии. Было показано, что белки, доставляемые с помощью ЭВ, более эффективно накапливались в

цитоплазме клеток, по сравнению со свободными белками. Результаты исследования показывают, что нативные ЭВ микроводорослей могут быть эффективными доставщиками экзогенных функциональных белков.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20146-п).*

1. Yong Cui, Jiayang Gao, Yilin He, Liwen Jiang. Plant extracellular vesicles. *Protoplasma*. 2020 J; 257(1):3–12.
2. Picciotto S. *et al.* Isolation of extracellular vesicles from microalgae: Towards the production of sustainable and natural nanocarriers of bioactive compounds // *Biomater. Sci.* 2021. V. 9, No. 8. P. 2917–2930.

**Функция малых открытых рамок считывания  
в 5'-нетранслируемой области гена *DUSP4* человека**

*Разумова Е. А.<sup>1</sup>, Лауров А. И.<sup>1,2</sup>, Джаятисса А.<sup>3</sup>, Шепелев Н. М.<sup>1,4</sup>,  
Донцова О. А.<sup>1,2,3,4</sup>, Рубцова М. П.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

<sup>2</sup> *Научно-исследовательский институт физико-химической биологии  
им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

<sup>3</sup> *Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия*

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

*elizaveta\_razumova@list.ru*

Развитие методов молекулярной биологии открывает новые уровни регуляции экспрессии генов. Ранее считалось, что в эукариотических клетках одна мРНК кодирует только один белок. Однако последние данные показывают, что помимо основной открытой рамки считывания (ОРС) мРНК может содержать дополнительные, кодирующие функциональные пептиды или выполняющие регуляторную роль ОРС [1].

Анализ общедоступных данных рибосомного профилирования свидетельствует о трансляции ОРС в 5'-НТО (нетранслируемой области) мРНК гена *DUSP4* человека. *DUSP4* – это щелочная фосфатаза двойной специфичности, связанная со множеством процессов в клетке, в том числе с процессом эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [2]. В 5'-НТО гена *DUSP4* человека были обнаружены 2 малые ОРС длиной 29 и 2 кодона (далее ОРС **a** и **b**).

Для исследования влияния малой ОРС **a** на процесс ЭМП были получены моноклональные линии клеток А549, содержащие сдвиг на 1 и 2 нуклеотида в ОРС **a**. В этих клетках снижена экспрессия маркера ЭМП виментина, а сами клетки данных линий обладают меньшей подвижностью в условиях индукции ЭМП TGF- $\beta$ 1, то есть имеют более эпителиальный фенотип.

Экзогенное тагирование малых ОРС подтвердило, что эти участки мРНК *DUSP4* могут транслироваться. Было показано, что ОРС **a** кодирует микропептид, суперэкспрессия которого приводит к увеличению экспрессии маркера ЭМП виментина в клетках А549. Исследование влияния ОРС **a** и **b** на трансляцию нижележащей рамки считывания с помощью двойных люциферазных репортеров показало небольшое увеличение трансляции

основной рамки считывания при замене старт-кодонов OPC **a** и **b** на неинициирующие кодоны. Такой же эффект был продемонстрирован в условиях индукции ЭМП.

Таким образом, наши данные показывают, что OPC **a** способствует процессу ЭМП. Механизм регуляции ЭМП малыми OPC **a** и **b** требует дальнейшего исследования.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-14-00058.*

1. Hong Zhang, Yirong Wang, Jian Lu, Trends Biochem. Sci. 44, 9 (2019).
2. Kang X. *et al.*, Oncotarget. 8, 55 (2017).

## Оптимизация протоколов выделения и очистки ДНК-гликозилаз семейства DML из *Staphylococcus aureus*

Рябов С. А.<sup>1,2</sup>, Гараева Н. С.<sup>1,2</sup>, Глазырин М. С.<sup>1,2</sup>, Гималетдинова А. Э.<sup>1,2</sup>, Юсупов М. М.<sup>2,3</sup>, Усачев К. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

<sup>3</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch, France

ryabovs888@gmail.com

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) – грамположительная бактерия шаровидной формы, являющаяся причиной большого количества внутри и внебольничных инфекций и обладающая высокой резистентностью к большинству антибиотиков и антисептиков [1]. Понимание принципов функционирования бактериальной ДНК позволит понять, каким образом происходит процесс адаптации патогена при изменении внешних условий.

Факторы внешней среды могут влиять как на структуру ДНК, так и на ее эпигенетические модификации. Эпигенетика изучает изменения экспрессии генов, которые происходят без изменений в структуре ДНК. Основной эпигенетической модификацией является метилирование ДНК. Метилирование ДНК заключается в присоединение метильной группы к цитозину в CpG-динуклеотидах с образованием 5-метилцитозина (5mC). Метилированные CpG-динуклеотиды являются химически стабильными, однако рисунок метилирования может меняться в течение жизни индивидуума [2, 3]. Обратный процесс – деметилирование ДНК – на некоторых этапах развития организма является запрограммированным процессом. Однако активное деметилирование может происходить и спонтанно в ответ на влияние факторов внешней среды, приводя к нарушениям в работе генома. Инициаторами процесса деметилирования ДНК выступают специальные ферменты - белки семейства DML, к которым относятся AtDML1, AtDML2, AtDML3 и AtDME. Решение структуры ДНК-гликозилаз семейства DML из *S. aureus* позволит понять роль данных ферментативных белков в процессе регуляции бактериального генома и их влияние на активацию или подавление отдельных участков ДНК.

В данной работе нами были разработаны и оптимизированы протоколы экспрессии и очистки белков семейства DML (AtDML1, AtDML2, AtDML3 и AtDME) для дальнейшего исследования их структур.

*Исследования выполнены за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.*

1. Campion J.J., McNamara P.J. *et al.*, Antimicrobial agents and chemotherapy. 4733, 12 (2004).
2. Edwards J.R., Yarychkivska O. *et al.*, Epigenetics Chromatin. 10:23 (2017).
3. Ortega-Galisteo A.P., Morales-Ruiz T. *et al.*, Plant Molecular Biology. 671, 6 (2008).

**Внеклеточные везикулы, продуцированные клетками ТНР-1  
в разных условиях, обладают разнонаправленными эффектами  
на экспрессию генов воспаления в органах *Danio rerio***

Самбур Д. Б.<sup>1</sup>, Калинина О. В.<sup>1</sup>, Акино А. Д.<sup>1</sup>, Тирикова П. В.<sup>1</sup>, Королева Е. Е.<sup>1</sup>,  
Трулев А. С.<sup>2</sup>, Рубинштейн А. А.<sup>1, 2</sup>, Кудрявцев И. В.<sup>1, 2</sup>, Головкин А. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

sambour-darina@mail.ru

**Введение.** Внеклеточные везикулы (ВВ), мембранные частицы, секретируемые практически всеми клетками организма, играют важную роль в межклеточной коммуникации и регуляции биологических процессов [1]. В зависимости от своего функционального состояния, клетки могут продуцировать ВВ, обладающие разными эффектами [2].

**Цель.** Изучить эффекты внеклеточных везикул, продуцированных активированными клетками ТНР-1, на уровень экспрессии генов воспаления в органах *Danio rerio*.

**Материалы и методы.** ВВ были получены от клеток ТНР-1 после активации фактором некроза опухоли (TNF) в концентрациях 10 и 20 нг/мл или 4-форбол-12-мирикат-13-ацетатом (PMA) в концентрациях 16 и 50 нг/мл. Методом количественной ПЦР оценивали уровень относительной экспрессии генов *il-1 $\beta$* , *il-6*, *il-10*, *tnf- $\alpha$* , *ifn- $\gamma$* , *mpeg-1.1*, *mpeg-1.2*, *trp* в тканях мозга, сердца и печени рыб *Danio rerio* после интрацеломической инъекции ВВ. В контрольной группе осуществляли инъекцию DPBS.

**Результаты.** Эффекты ВВ, полученных от клеток, активированных разными стимулами в разных дозах, в ряде случаев несли разнонаправленный характер. Инъекция ВВ, секретируемых клетками ТНР-1, активированными 20 нг/мл TNF, увеличивала экспрессию генов *il-1 $\beta$*  и *il-10* более чем в 10 раз по сравнению с ВВ, секретированными клетками ТНР-1 при активации 16 и 50 нг/мл PMA в тканях мозга, сердца и печени. В тканях сердца инъекция ВВ, секретируемых клетками ТНР-1, активированных 20 нг/мл TNF увеличивала экспрессию генов *il-1 $\beta$* , *il-6* и *il-10* по сравнению с контрольной группой. ВВ, полученные от клеток ТНР-1, активированных 10 нг/мл TNF, такого эффекта не оказывали. Инъекция ВВ, секретированных клетками ТНР-1, активированными 50 нг/мл PMA подавляла экспрессию гена *il-10* в сердце и гена *ifn- $\gamma$*  в печени

более чем в 5 раз по сравнению с ВВ, полученными от клеток ТНР-1 активированных 16 нг/мл РМА.

*Выводы.* В зависимости от вида и дозы использованных стимулов клетки ТНР-1 продуцируют ВВ, обладающие разнонаправленными эффектами на экспрессию генов цитокинов органах *Danio rerio* после интрацеломической инъекции.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-20076.*

1. Doyle L.M., Wang M.Z. (2019) Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>

2. Schindler V.E.M. *et al.* (2022) Side-directed release of differential extracellular vesicle-associated microRNA profiles from bronchial epithelial cells of healthy and asthmatic subjects. *Biomedicines*, 10(3), 622. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030622>



## Влияние точечных мутаций на термостабильность гликозил-гидролаз семейства 12

Селимзянова А. И.<sup>1,2</sup>, Рыков С. В.<sup>1</sup>, Березина О. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

selimz.alina99@mail.ru

Грибные эндоглюканазы из семейства 12 гликозил-гидролаз применяются в сельском хозяйстве в качестве кормовых добавок. Исследование термостабильных ферментов особенно актуально, так как подготовка кормов часто проходит при повышенной температуре. Изучение природы термостабильности позволит определить мишени для модификаций, направленных на улучшение свойств ферментов [1]. Объектами исследования были гликозил-гидролазы семейства 12: умеренно термостабильная ксилоглюканаза AsCeGH12 из *Aspergillus cervinus* и термостабильная эндоглюканаза ThTeGH12 из *Thermothielavioides terrestris* [2, 3].

С помощью программы DynaMut2 проведено *in silico* исследование влияния точечных мутаций на гидрофобные взаимодействия внутри белковой глобулы. Выявлено, что Val59 ThTeGH12 взаимодействует с другими гидрофобными аминокислотами на соседних бета-цепях, за счет чего стабилизируется третичная структура белка. Экспериментально показано, что при замене Val59Ser происходит снижение температурного максимума активности фермента с 70 до 60 °С. Это обусловлено уменьшением количества гидрофобных взаимодействий внутри белковой глобулы. В гомологичном положении AsCeGH12 вместо Val находится гидрофильный Tyr. При замене Tyr54Val температурный максимум активности AsCeGH12 повышается с 55 до 60 °С за счет образования дополнительных гидрофобных взаимодействий внутри белковой глобулы. Моделирование структуры AsCeGH12 с различными точечными мутациями показало, что замена Leu в положении 35 на более разветвленные гидрофобные аминокислоты может привести к увеличению количества гидрофобных взаимодействий и, как следствие, повышению термостабильности фермента. Проведено исследование свойств мутантных форм AsCeGH12 с соответствующими заменами.

Таким образом, с помощью пространственного моделирования предсказано, что наличие гидрофобных взаимодействий внутри белковой

глобулы ферментов семейства GH12 взаимосвязано с их термостабильностью. Ферменты с улучшенными свойствами могут быть получены методами белковой инженерии.

1. Damasio A.R.L., Ribeiro L.F.C. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1824 (2012).
2. Rykov S.V. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106 (2022).
3. Rykov S.V. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019).

**Разработка тест-системы *apn1Dhsm2D*  
на основе штамма 11D-LMG-3031 дрожжей  
для мониторинга генотоксичности широкого спектра соединений**

Скобелева И. И.<sup>1</sup>, Королев В. Г.<sup>1,2</sup>, Алексеева Е. А.<sup>1,2</sup>, Евстюхина Т. А.<sup>1,2</sup>,  
Федоров Д. В.<sup>1,2</sup>, Пешехонов В. Т.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> «Курчатовский геномный центр – ПИЯФ», Гатчина, Россия

*skobeleva\_ii@nrcpi.nrcki.ru*

Проблема изучения воздействия ДНК-тропных агентов на живые организмы, как никогда актуальна. В последние годы появился ряд статей, в которых авторы, изучая действие ДНК-тропных агентов, показывают, что ключевую роль в этих эффектах играет пострепликативная репарация [1]. Клетки в ответ на повреждения ДНК используют сеть сигнальных переносчиков, относящихся к прохождению клеточного цикла (чекпойнт) и к осуществлению репарации повреждений ДНК. Предметом нашего исследования является изучение молекулярных механизмов индуцированного мутагенеза у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Ошибки, появившиеся в процессе репарации, приводят к возникновению мутаций, генетической нестабильности, возникновению раковых заболеваний и клеточной гибели [2].

Ранее в нашей лаборатории впервые в мире с помощью прямого скрининга были выделены мутанты дрожжей, отличающихся повышенным индуцированным мутагенезом и практически не измененной чувствительностью к летальному действию мутагенов. Было показано, что причиной повышенного мутагенеза у этих мутантов является привлечение часто ошибающихся ДНК полимераз в ходе репаративного синтеза ДНК. На основании этих данных мы сделали вывод, что подобные мутанты могут с успехом использоваться для создания тест-систем для оценки генотоксичности различных веществ и обнаружения генотоксикантов в окружающей среде. Мутант *apn1D (MATa ade 2D -248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 apn1::URA3)* оказался одним из самых перспективных для данной цели. Мутации *apn1* блокируют репарацию азотистых оснований ДНК, которые являются наиболее массовым видом повреждений при действии химических агентов. Мутация *asf1* приводит к замене репарационных полимераз на ошибочные, при обходе повреждений в ходе репарации, тем самым увеличивает число фиксируемых повреждений ДНК.

Двойной мутант *apn1Dasf1D* перспективен для разработки тест-систем из-за возможности учета низких уровней повреждений азотистых оснований. На

базе *apn1D* был получен двойной мутант. Показана его высокая чувствительность к малым дозам мутагенов, что позволило подтвердить перспективность использования мутанта *apn1Dhsm2D* для создания, как тест-системы для оценки генотоксичности различных веществ.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» (соглашение № 0488), а также в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (тема № 1023031500033-1-1.6.7;1.6.4;1.6.8 «Функциональная и структурная организация сложных, мультикомпонентных биологических систем и их динамика».*

1. Alekseeva E.A., Evstyukhina T.A., Peshekhonov V.T., Korolev V.G. Participation of the HIM1 gene of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the error-free branch of post-replicative repair and role Pol $\eta$  in him1-dependent mutagenesis [Журнал] // Current Genetics. 2021. V. 67. P. 141–151.
2. Friedberg Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. V. 6. P. 943–953.

## Связь между функциональной активностью, электрофоретической подвижностью и плотностью упаковки гемоглобина в эритроцитах

Слатинская О. В., Максимов Г. В.

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

slatolya@mail.ru

Важной областью физиологии крови является изучение молекулярного механизма изменения конформации и олигомеризации молекул гемоглобина (Гб) в цитоплазме эритроцита. Гб играет ключевую роль в регуляции внутриклеточных процессов в эритроцитах и действует в комплексе с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 (БП3), обеспечивая фиксацию кислорода в клеточной мембране [1].

Методами колебательной спектроскопии выявлены изменения конформации гема и плотности упаковки глобина Гб при изменении поверхностного заряда ( $\zeta$ -потенциала) мембраны эритроцитов человека *in vitro*. Показано, что с увеличением температуры (с 20 до 38 °С) в цитоплазме эритроцита происходит снижение взаимодействия соседних молекул Гб и формирование более однородной среды, что подтверждается увеличением компактности глобина и снижением времени жизни флуоресценции триптофана (Trp) в результате его более тесного взаимодействия с микроокружением. При увеличении  $\zeta$ -потенциала (снижение  $[Ca^{2+}]_{out}$ , увеличение  $[Na^+]_{in}$ ), возрастает вероятность нахождения гема в куполообразной конформации с более выраженными симметричными колебаниями пирролов гема при снижении плотности упаковки глобина. Вероятно, при изменении  $\zeta$ -потенциала, меняется конформация комплекса «Гб–БП3» и его способность связывать Гб, что приводит к изменению распределения молекул Гб за счет их олигомеризации в цитоплазме. При этом, изменение плотности упаковки глобина происходит не равномерно по объему глобулы при увеличении  $[Na^+]_{in}$  [2, 3].

Таким образом, показано, что деполяризация плазматической мембраны вследствие увеличения  $\zeta$ -потенциала эритроцита может привести к изменению эффективности связывания комплексов «Гб–БП3», конформации гема и плотности упаковки Гб. Все вышеперечисленное оказывает влияние на способность эритроцитов переносить и связывать кислород.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-34-90073 и Российского научного фонда № 23-74-00006.

1. Atkins C.G. *et al.*, *Appl. Spectrosc.*, 71, 5 (2017).
2. Kang L.L., Huang Y.X. *et al.*, *Biopolymers*, 89, 11 (2008).
3. Luneva O.G., Sidorenko S.V. *et al.*, *Cell Physiol. Biochem.*, 39, 1 (2016).

## Изучение влияния сигнала удержания в цитоплазме на внутриклеточную локализацию белка YB-1

Согорина Е. М., Елисеева И. А., Лябин Д. Н.

*Институт белка РАН, Пущино, Россия*

*kategrigoreva@vega.protres.ru*

Y-бокс связывающий белок 1 (YB-1) – это ДНК- и РНК-связывающий белок, который в клетках млекопитающих участвует в процессах регуляции транскрипции, трансляции, сплайсинге и других ядерных и цитоплазматических процессах [1]. Его внутриклеточная локализация зависит от регуляторных последовательностей в С-концевом домене: сигнала ядерного импорта (NLS) и сигнала удержания в цитоплазме (CRS). NLS белка YB-1 хорошо изучен и охарактеризован [2, 3]. В то же время, о сигнале, ответственном за цитоплазматическую локализацию белка, практически ничего неизвестно. Считается, что в нормальных условиях CRS превалирует над NLS, что объясняет преимущественно цитоплазматическую локализацию белка YB-1.

В литературе описаны две неперекрывающиеся последовательности, которые могут быть ответственны за цитоплазматическую локализацию белка YB-1: это CRS-1 (247-267 а.о) и CRS-2 (270-296 а.о.) [4, 5]. Чтобы выяснить, какая из этих двух областей действительно является сигналом для удержания белка YB-1 в цитоплазме было изучено внутриклеточное распределение экзогенных белков HA-YB-1 с делециями областей CRS-1 и CRS-2 (по отдельности или обеих сразу). Методом иммунофлуоресцентной микроскопии препаратов нескольких клеточных линий было показано, что белок YB-1 изменяет свою внутриклеточную локализацию только при делеции области CRS-2 или обеих CRS, что говорит о роли CRS-2 как основного сигнала цитоплазматического удержания YB-1. В то же время, эксперименты с репортерным белком GFP, слитым с CRS YB-1, показали, что ни один из сигналов CRS не способствует перераспределению в цитоплазму белка GFP, который обычно имеет ядерно-цитоплазматическое распределение. Таким образом, CRS не является сам по себе сигналом, достаточным для удержания белка в цитоплазме. Он влияет на локализацию YB-1 только в составе целого белка, вероятно, за счет внутри- и/или межмолекулярного маскирования сигнала ядерной локализации.

*Работа поддержана грантом Российского научного фонда 23-74-01105.*

1. Елисеева И. А. и др. Y-бокс-связывающий белок 1 (yb-1) и его функции // Успехи биологической химии. 2011. Т. 51. С. 65–132.

2. Mordovkina D.A. *et al.* Transportin-1-dependent YB-1 nuclear import // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Elsevier Ltd, 2016. V. 480, No. 4. P. 629–634.
3. Van Roeyen C.R.C. *et al.* Cold shock Y-box protein-1 proteolysis autoregulates its transcriptional activities // *Cell Commun. Signal.* BioMed Central, 2013. V. 11, No. 1. P. 1–16.
4. Bader A.G., Vogt P.K. Inhibition of Protein Synthesis by Y Box-Binding Protein 1 Blocks Oncogenic Cell Transformation // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25, No. 6. P. 2095–2106.
5. Jurchott K. *et al.* YB-1 as a Cell Cycle-regulated Transcription Factor Facilitating Cyclin A and Cyclin B1 Gene Expression // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278, No. 30. P. 27988–27996.



## Конструирование гетероталличных штаммов дрожжей *Komagataella kurtzmanii* для биотехнологического использования

Соколова Д. Д.<sup>1</sup>, Акентьев Ф. И.<sup>1,2</sup>, Губайдуллин И. И.<sup>1,2</sup>, Козлов Д. Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Курчатовский геномный центр Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

*kalabanova\_dasha@mail.ru*

Недавно на базе природного штамма метилотрофных дрожжей *Komagataella kurtzmanii* ВКПМ Y-727 была разработана система экспрессии генов, превосходящая по эффективности известный прототип *K. phaffii* (*Pichia pastoris*) [1, 2]. Один из скрытых недостатков обеих систем связан с природной гомоталличностью немодифицированных штаммов *K. phaffii* и *K. kurtzmanii*, культуры которых обычно содержат смесь клеток **a** и **α** типов спаривания, что провоцирует их спонтанное скрещивание и мейоз [3], угрожающий стабильности конструируемых продуцентов [4]. В этой связи актуальной представлялась задача генетического редактирования и превращения штаммов *K. kurtzmanii* в гетероталличные, сохраняющие фиксированный тип спаривания. При этом требовалось решение, «сберегающее» гены селективных маркеров [5].

Для получения гетероталличных штаммов *K. kurtzmanii* был выбран подход, основанный на использовании эндонуклеазы I-SceI. Кассета, сконструированная для разрушения генов типа спаривания, содержала ген селективного маркера *HIS4* в окружении сайтов узнавания эндонуклеазы I-SceI и фрагменты ДНК, гомологичные участкам консервативных генов DIC1 и SLA2, окружающих локусы типа спаривания дрожжей. Интеграция кассеты в геном лабораторного штамма Y727 *his4arg4* позволила отобрать трансформанты № 2 и №9, сохранившие интактными только один из двух локусов спаривания, **α** или **a**, соответственно. Локализацию кассеты устанавливали с помощью ПЦР. На следующем этапе штаммы № 2 и № 9 трансформировали эписомной ARS-плазмидой, содержавшей ген эндонуклеазы I-SceI под контролем промотора FDH. В результате экспрессии гена эндонуклеазы I-SceI с эффективностью свыше 60 % в трансформированных клетках было произведено «вырезание» гена *HIS4* и репарация геномного повреждения с использованием механизма гомологичной рекомбинации, матрицей для которой служила хромосомная ДНК интактного локуса типа спаривания. В итоге после элиминации ARS-плазмиды были получены штаммы Y727 *a**his4arg4* и Y727 **α***his4arg4*, производные

трансформантов № 2 и № 9, клетки которых в обоих локусах содержали идентичный набор генов. Как показал анализ, полученные штаммы полностью утратили способность к спонтанной смене типа спаривания, сохранив способность к скрещиванию с другими штаммами. Мы показали, что генетическое редактирование штаммов не повлияло на эффективность секреции репортерной бета-галактозидазы.

Таким образом, в результате научно-исследовательской работы были получены стабильные гетероталлические штаммы дрожжей *K. kurtzmanii* Y727~~a~~*his4arg4* и Y727~~a~~*his4arg4*, характеризующиеся постоянным фиксированным типом спаривания, пригодные для конструирования продуцентов рекомбинантных белков.

1. Akentyev P., Sokolova D., Korzhenkov A., Gubaidullin I. and Kozlov, D. (2023) Expression level of SOR1 is a bottleneck for efficient sorbitol utilization by yeast *Komagataella kurtzmanii*. Yeast (Chichester, England).
2. Gorbunov A.A., Akentyev F.I., Gubaidullin I.I., Zhiganov N.I., Tereshchenkova V.F., Elpidina E.N., Kozlov D.G. Biosynthesis and Secretion of Serine Peptidase SerP38 from *Tenebrio molitor* in the Yeast *Komagataella kurtzmanii* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2021. V. 57, No. 9. P. 917–924.
3. Heistingering L., Gasser B., Mattanovich D. (2018) Creation of Stable Heterothallic Strains of *Komagataella phaffii* Enables Dissection of Mating Gene Regulation. Molecular and cellular biology, 38.
4. Zhu T., Guo M., Sun C., Qian J., Zhuang Y., Chu J., Zhang S. (2009) A systematical investigation on the genetic stability of multi-copy *Pichia pastoris* strains. Biotechnology letters, 31, 679–684.
5. Solis-Escalante D., Kuijpers N.G.A., van der Linden F.H., Pronk J.T., Daran J.-M., Daran-Lapujade P. (2014) Efficient simultaneous excision of multiple selectable marker cassettes using I-SceI-induced double-strand DNA breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 14, 741–754.

## **Влияние антибиотика стрептомицина на инициацию трансляции в *Escherichia coli***

*Виноградова Д. С.<sup>1</sup>, Спиридонова З. А.<sup>1,2</sup>, Федотов В. Р.<sup>1,3</sup>, Касацкий П. С.<sup>1</sup>,  
Полесскова Е. В.<sup>1,4</sup>, Коневега А. Л.<sup>1,4,5</sup>*

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

*zoayaspiridonova@list.ru*

Стрептомицин является одним из наиболее изученных антибиотиков, действующих на процесс трансляции. Однако до сих пор не весь механизм его действия до конца известен. Наибольший интерес данный антибиотик вызывает своим воздействием на точность трансляции [1]. В прошлом веке было показано, что стрептомицин вызывает диссоциацию инициаторного комплекса [2], что, вероятно, является ограничивающим фактором для детального изучения молекулярного механизма действия стрептомицина на этапе инициации трансляции. В рамках данной работы было смоделировано связывание малой 30S субъединицы прокариотической рибосомы, инициаторного фактора IF1 и мРНК в присутствии стрептомицина. Сайт связывания стрептомицина располагается близко с сайтом связывания IF1 и может перекрывать его, что может оказывать ингибирующее действие на образование инициаторного комплекса. Кроме того, антибиотик влияет на взаимодействие между IF1 и инициаторным фактором IF3, вызывая увеличение расстояния между N и C доменами IF3, в то время, как в канонической инициации IF1 вызывает их сближение. Данный эффект может влиять на стабилизацию мРНК, селекцию инициаторной тРНК, а также ассоциацию 30S и 50S субъединиц [3].

Биохимические данные, полученные в рамках данной работы демонстрируют влияние стрептомицина на аффинность мРНК к 30S субъединице рибосомы, а также на кинетику образования 30S инициаторного комплекса в зависимости от длины последовательности Шайна – Дальгарно, ее удаленности от стартового кодона, а также от наличия и положения вторичных структур на мРНК.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 23-74-10088.*

1. Demirci H., Murphy F. *et al.*, Nat Commun. 4, 1355 (2013).
2. Modolell J., Davis B., Proc Natl Acad Sci. 67, 3 (1970).
3. Chulluncuy R., Espiche C. Antibiotics (Basel). 5, 4 (2016).

## Исследования рНLIP-пептида в качестве агента тераностики

*Спицына А. С.<sup>1</sup>, Виноградова Д. С.<sup>1</sup>, Бурдаков В. С.<sup>1</sup>, Волницкий А. В.<sup>1</sup>,  
Марченко Я. Ю.<sup>1</sup>, Яковлева Л. Ю.<sup>1</sup>, Варфоломеева Е. Ю.<sup>1</sup>, Титов А. И.<sup>1</sup>,  
Гараева Л. А.<sup>1</sup>, Шабалин К. А.<sup>1</sup>, Швецов А. В.<sup>1,2</sup>, Коневега А. Л.<sup>1,2,3</sup>,  
Штам Т. А.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва,  
Россия

*anastasis.8@yandex.ru*

Микроокружение опухолевых тканей с более низкими значениями кислотности среды, по сравнению с нормальными тканями, является потенциальной основой таргетной доставки терапевтических и диагностических препаратов [1]. Среди таких соединений можно выделить рНLIP (pH low insertion peptide) – пептид, способный менять конформацию и образовывать альфа-спираль, встраиваемую в клеточную мембрану при низких значениях рН межклеточной среды [2].

Цель нашего исследования – изучить границы применимости рНLIP для целевой доставки в опухолевые клетки радиосенсибилизирующих наночастиц оксида железа [3], радиофарм препаратов [4] и возможности загрузки миРНК и siРНК в экзосомы, для доставки последних в раковые клетки [5].

Первостепенной задачей исследования стало изучение трансмембранного механизма встраивания рНLIP в клетки. Сначала мы оценивали конформационное поведение пептида с помощью методов нанодифференциальной сканирующей флуориметрии и молекулярной динамики в режиме свободной диффузии. Затем рНLIP, конъюгированный с флуоресцентной меткой BODIPY на N-конце, инкубировали с различными раковыми клеточными линиями. Далее образцы клеток исследовали методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии.

Результаты моделирования указывали на то, что центральная часть структуры пептида сохраняет форму альфа-спирали, а вот концы находятся в форме свободной петли, сохраняя, по-видимому, возможность локально образовывать в альфа-структуру. Данные нанодифференциальной сканирующей флуориметрии указывали на конформационные изменения пептида в кислых условиях. Трансмембранные исследования не отразили

принципиальную разницу между конформацией пептида в кислых и нормальных условиях: в обоих случаях флуорохром, расположенный на N-конце пептида, локализовался на мембране клеток, что не отменяет возможность использования pHLP в качестве доставщика, однако указывает на необходимость детального изучения влияния на конформацию пептида не только кислотности среды, но и мембранного состава клеток.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект 075-15-2021-1360)*

1. Tannock I.F. *et al.*, Cancer Res. 49, 16 (1989).
2. Reshetnyak Y.K. *et al.*, Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103, 17 (2006).
3. Alexandra G. Pershina. *et al.*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 23 (2020).
4. Zhang, Min & Xi *et al.*, Mol. Im. (2022).
5. Yunfeng Di *et al.*, European J. of Pharm. Sc. 190 (2023).

## Длина теломер в ДНК лейкоцитов у самцов макак-резус разных возрастных групп

Тимина М. Ф., Павлова Л. Е., Кургинцев Р. М., Агумава А. А.

*Курчатовский комплекс медицинской приматологии Национального  
исследовательского центра «Курчатовский институт», Сочи, Россия*

*free\_marshmallows@mail.ru*

Теломеры – концевые участки хромосом, обеспечивающие их стабильность. Удвоение ДНК при делении клетки связано с укорочением теломер вследствие феномена концевой недорепликации. По мере деления клеток укорочение длины теломер считается одной из важнейших причин старения клетки. Оценка длины теломер до настоящего времени остается предметом научных исследований в области геронтологии и не применяется в клинической практике. Чаще всего в качестве модельного объекта изучения процессов старения используют грызунов, однако нейроэндокринные механизмы, влияющие, в том числе, на регуляцию процесса старения отличаются у грызунов и человека. Наиболее близким в филогенетическом отношении к человеку модельным объектом являются обезьяны. Однако данные по изменению длины теломер у низших обезьян с возрастом крайне немногочисленны.

Мы изучили абсолютную среднюю длину теломер у 29 клинически здоровых самцов макак-резус возрастом от 4 до 24 лет. ДНК из лейкоцитов периферической крови выделяли модифицированным гуанидиновым методом с адсорбцией на положительно заряженных частицах оксида кремния, с последующей отмывкой и элюацией [1]. Длину теломер измеряли модифицированным методом количественной ПЦР [2]. В группе возраста 4–9 лет длина теломер составила  $37 \pm 16$  тысяч пар оснований (т.п.о.) на диплоидный набор, в группе 10–14 лет  $44 \pm 12$  т.п.о. на диплоидный набор, в возрасте 15–18 лет  $25 \pm 9$  т.п.о. на диплоидный набор и в группе 21–24 года  $52 \pm 12$  т.п.о. на диплоидный набор.

Полученные данные не соответствовали нормальному характеру распределения, а корреляционный анализ показал отсутствие значимой зависимости длины теломер от возраста животных ( $r_s = 0,27$ ,  $p > 0,05$ ). Таким образом, наше исследование не подтверждает зависимость изменения средней длины теломер лейкоцитов крови с возрастом. Понимание изменения длины теломер имеет ключевое значение как в изучении биологии старения, так и в отношении патогенеза возрастных заболеваний.

1. Agumava A.A., Chikobava M.G., Lapin B.A. J. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 25, 3 (2010).
2. O'Callaghan N.J., Fenech M.J. Biological Procedures Online. 13, 3 (2011).



## Создание модели для изучения патогенности генетического варианта гена *PLOD2*

Ткачева И. В.<sup>1,2</sup>, Комиссаров А. Е.<sup>1</sup>, Латыпова Е. М.<sup>1</sup>, Саранцева С. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

*Iritka4eva@gmail.com*

Синдром Брука (СБ) – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, сочетающее в себе черты несовершенного остеогенеза и врожденного множественного артрогрипоза. Симптомами СБ являются врожденные контрактуры, хрупкость и повторяющиеся переломы костей, деформации сгибательных суставов и конечностей, птеригии и низкий рост пациентов, кроме того заболевание может сопровождаться ограниченной подвижностью и нарушением функции легких [1]. СБ носит аутосомно-рецессивный тип наследования и известны два гена: *PLOD2* и *FKBP10*, мутации в которых ассоциированы с ним [2].

В данном исследовании у двух пациентов с СБ проводились генетические тесты, направленные на выявление наследственных факторов заболевания. Для амплификации экзонов и границ экзон-интрон гена *PLOD2*, в которых ранее найдены патогенные варианты, были подобраны пары праймеров. Затем осуществлялось секвенирование по Сэнгеру, в результате которого у пациентов была обнаружена мутация rs1378540661 в гомозиготном состоянии, приводящая к нуклеотидной замене A/G в позиции 1885 гена *PLOD2*, и как следствие замене аминокислоты Thr на Ala в позиции 629 белка. Данная мутация не числится в базах данных clinvar. В литературе [3] описан клинический случай пациента с СБ, когда нуклеотидная замена C/T находилась в позиции 1886 гена *PLOD2* (rs121434459) и приводила к аминокислотной замене Thr на Ile в позиции 629 белка. Данная мутация числится в базе данных clinvar как патогенная.

Для изучения патогенности варианта rs1378540661, обнаруженного нами у пациентов и сравнения его с описанным в литературе вариантом rs121434459 были синтезированы генетические конструкции для экспрессии мутантных аллелей гена *PLOD2* (Thr629Ala и Thr629Ile) и гена *PLOD2* дикого типа. Полученные генетические конструкции трансфицированы в клетки HEK293, что позволит определить локализацию белка и провести тесты на патогенность.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00555).*

1. Mokete L. *et al.* Bruck syndrome: congenital joint contractures with bone fragility // Journal of Orthopaedic Science. 2005. V. 10. No. 6. P. 641–646.
2. Puig-Hervás M.T. *et al.* Mutations in PLOD2 cause autosomal-recessive connective tissue disorders within the Bruck syndrome–osteogenesis imperfecta phenotypic spectrum // Human mutation. 2012. V. 33. No. 10. P. 1444–1449.
3. Van der Slot A.J. *et al.* Identification of PLOD2 as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis // Journal of Biological Chemistry. 2003. V. 278. No. 42. P. 40967–40972.

**Поиск новых ингибиторов биосинтеза белка  
с помощью бесклеточной системы трансляции *Staphylococcus aureus***

Усачев К. С.<sup>1</sup>, Бикмуллин А. Г.<sup>1,2</sup>, Клочкова Э. А.<sup>1,2</sup>, Валидов Ш. З.<sup>1</sup>,  
Юсупов М. М.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр  
Российской академии наук», Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>3</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg,  
Illkirch, France

k.usachev@knc.ru

Ежегодно синтезируется большое количество химических соединений с антимикробной активностью, однако одним из важнейших условий для перехода к созданию лекарственного препарата является установление его механизма действия на компоненты живой клетки. Бесклеточные системы трансляции патогенных микроорганизмов являются одним из наиболее перспективных подходов для скрининга новых химических соединений с антимикробной активностью, выявления их роли на процессы транскрипции и трансляции, и интерпретации молекулярных механизмов действия антибиотиков. Бесклеточная система синтеза белка представляет собой набор химических реакций, которые репрезентируют собой главные метаболические процессы клетки. Данные системы применяются для белковой инженерии, созданию тестов белковой активности, работ по мутагенезу белков, и прочих применений. Для скрининга потенциальных ингибиторов исследуемое вещество добавляется в реакцию, и по количеству сигнального белка, опосредованного через сигнал флюоресценции, оценивается уровень ингибирования синтеза белка. При этом, из-за открытости системы, возможно провести крупномасштабную проверку и оптимизацию, легко изменяя условия проведения экспериментов, например, концентрацию добавляемого вещества-ингибитора, в рамках одного эксперимента.

В рамках данной работы нами была разработана бесклеточная система трансляции бактерии *Staphylococcus aureus* для скрининга ингибиторов биосинтеза белка [1] и показано, что метаболит штамма *Bacillus velezensis* X-БИО-1 является ингибитором трансляции.

*Исследования выполнены за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.*

1. Голубев А. А., Александрова Н. М., Валидов Ш. З., Юсупов М. М., Усачев К. С., Патент на изобретение RU 2802080 С1, 22.08.2023. Заявка № 2022135452 от 30.12.2022.

## Влияние антибиотика аурапланина на конформацию декодирующего центра

Федотов В. Р.<sup>1,2</sup>, Пичкур Е. Б.<sup>1,3</sup>, Толочева О. А.<sup>1</sup>, Сергеев П. В.<sup>2,4</sup>,  
Полесскова Е. В.<sup>1,5</sup>, Коневега А. Л.<sup>1,3,5</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

<sup>3</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>5</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербурга, Россия

[vlad.fedotov20011@yandex.ru](mailto:vlad.fedotov20011@yandex.ru)

Показано, что культуральная жидкость штамма *Actinoplanes sp. 49252* содержит вещество, подавляющее синтез белка в бактериях [1]. Установлено, что оно влияет на точность синтеза белка [2]. Данный антибиотик, получивший название аурапланин, является новым, малоизученным соединением, из-за чего структурных данных рибосомы в комплексе с ним не имеется. В связи с этим актуальной задачей является определение структурных изменений, происходящих в бактериальной рибосоме под влиянием аурапланина.

Образец представляет собой рибосомный инициаторный комплекс, состоящий из большой и малой субъединиц, инициаторной fMet-tRNA<sup>fMet</sup> в Р-сайте рибосомы и мРНК в присутствии аурапланина. При помощи криогенной электронной микроскопии на установке Titan Krios 60-300 (FEI – США) были получены снимки. Для реконструкции использовалось программное обеспечение Relion и CryoSPARC. Атомная модель создана на основе структуры PDB: 8B0X [3] при помощи программы Coot. Модели визуализировались в UCSF Chimera. Для сравнительного анализа использовались структуры рибосом с закрытой, открытой и полузакрытой конформациями декодирующего центра (PDB: 4V6G [4], 8B0X [3] и 5UYL [5] соответственно) и содержащих *ram*-мутации G299A (PDB: 6BUW) и G347U (PDB: 6BZ6) [6].

Разрешение комплекса после реконструкции в районе малой и большой субъединиц составляет 2,36 и 2,16 Å соответственно. Определен сайт связывания антибиотика (в области A509, G27 и A28 16S рРНК) и его взаимодействие с окружением. Сравнение структуры изучаемого комплекса с рибосомами с разными конформациями декодирующего центра, а также модифицированными вариантами рибосом, демонстрирующими снижение

точности декодирования, показало, что аурапланин переводит декодирующий центр рибосомы в положение, наиболее соответствующее полузакрытому.

Была проведена реконструкция инициаторного комплекса в присутствии аурапланина и создана его атомная модель, найден сайт связывания антибиотика и установлены конформационные изменения декодирующего центра. Таким образом, аурапланин, связываясь на значительном расстоянии от декодирующего центра, переводит его в полузакрытое положение, тем самым влияя на точность синтеза белка. В дальнейшем планируется определить кинетические аспекты нарушения точности декодирования для выяснения деталей молекулярного механизма действия аурапланина.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-14-00278.*

1. Остерман И. А., Лукьянов Д. А., Лисевич И. М., Богданов А. А., Сергиев П. В., Вилсон Д., Донцова О. А. Направленный поиск новых антибиотиков, нарушающих синтез белка // III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. – 2021. – Т. 2. – С. 16–17.
2. Лисевич И. М., Сергиев П. В. Магистерская диссертация «Расшифровка механизма действия нового ингибитора бактериальной трансляции, продуцируемого штаммом *Actinoplanes sp. 49252*. – 2020.
3. Fromm S.A., O'Connor K.M., Purdy M., Bhatt P.R., Loughran G., Atkins J.F., Jomaa A., Mattei S. The translating bacterial ribosome at 1.55 Å resolution generated by cryo-EM imaging services // Nature communications. – 2023. – V. 14. – No. 1. – P. 1095.
4. Jenner L.B., Demeshkina N., Yusupova G., Yusupov M. Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. Nat Struct Mol Biol. 2010 May;17(5):555-60. doi: 10.1038/nsmb.1790. Epub 2010 Apr 18. PMID: 20400952.
5. Loveland A.B., Demo G., Grigorieff N., Korostelev A.A. Ensemble cryo-EM elucidates the mechanism of translation fidelity. Nature. 2017 Jun 1;546(7656):113-117. doi: 10.1038/nature22397. Epub 2017 May 24. PMID: 28538735; PMCID: PMC5657493.
6. Ying L., Fredrick K. Epistasis analysis of 16S rRNA ram mutations helps define the conformational dynamics of the ribosome that influence decoding // RNA. – 2016. – V. 22. – No. 4. – P. 499–505.

## Влияние катионов щелочных металлов на структуру бычьего сывороточного альбумина

Федотова Е. В., Пастон С. В.

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

*st077318@student.spbu.ru*

Ионы щелочных металлов играют важнейшую роль в жизненных процессах.  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  являются главными катионами электролитов в живых организмах. Многие биологические макромолекулы (например, нуклеиновые кислоты, ионные каналы, ферменты) избирательно связывают или транспортируют ионы. В большинстве случаев дифференциация типов ионов имеет решающее значение для функции молекулы. Различие между ионами щелочных металлов особенно интересно, учитывая их одинаковый заряд, сферическую форму и схожий размер. Считается, что небольшое различие в структуре гидратных оболочек этих катионов может играть решающую роль в их взаимодействии с биомолекулами [1].

В данной работе исследуется структура бычьего сывороточного альбумина (БСА) в растворах при варьировании концентрации хлоридов щелочных металлов  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  в диапазоне  $10^{-3}$ –3 М. Сывороточный альбумин – важнейший транспортный белок крови, участвующий в поддержании осмотического давления [2]. Изучение третичной структуры БСА проводилось методами спектроскопии поглощения и флуоресценции белка в УФ диапазоне. Существенные спектральные изменения наблюдаются при концентрации электролита выше физиологической (0,15 М): рост интенсивности поглощения и снижение интенсивности флуоресценции. Это может свидетельствовать о взаимодействии катионов с белком и нарушении третичной структуры БСА, что делает ароматические аминокислоты более доступными для растворителя и ионов и приводит к тушению флуоресценции. С ростом концентрации соли в растворе происходит снижение модуля отрицательного заряда белковых частиц. Заряд БСА достигает 0 при концентрациях  $[\text{Li}^+] = 10^{-2}$  М,  $[\text{K}^+] = [\text{Na}^+] = 10^{-1}$  М. Если расположить исследуемые катионы по возрастанию интенсивности их воздействия на структуру сывороточного альбумина, то получится ряд по убыванию размеров катионов:  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ .

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества».

1. Sigel A., Sigel A., Sigel R.K.O., The Alkali Metal Ions: Their Role for Life, 2016.
2. Peters T.Jr., All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, 1995.



## Характеризация состава и биологических эффектов опухолеассоциированной внеклеточной ДНК

Филатова А. А.<sup>1,2</sup>, Алексеева Л. А.<sup>1</sup>, Миронова Н. Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия

a.filatova2@g.nsu.ru

При развитии опухолевых заболеваний в жидкостях организма обнаруживается опухолеассоциированная внеклеточная ДНК (внДНК), источниками которой являются как опухолевые клетки, так и иммунные клетки, и клетки опухолевого микроокружения [1]. В данной работе опухолевая внДНК была получена из кондиционированной среды клеток меланомы мыши В16 (В16-внДНК), а также использовалась внДНК из кондиционированной среды фибробластов мыши L929 (L929-внДНК).

При инкубации клеток В16 в присутствии внДНК *in vitro* наблюдалось различное влияние на биологические эффекты, в зависимости от источника внДНК: в ответ на присутствие В16-внДНК снижалась миграция и пролиферация клеток меланомы В16, а также увеличивался уровень апоптоза клеток. L929-внДНК, наоборот, опосредовала увеличение пролиферации и миграции опухолевых клеток.

*In vivo* клетки В16 после инкубации с внДНК вводили подкожно для развития первичного опухолевого узла (модель I) или внутривенно мышам С57В1 для формирования метастазов в легких (модель II). Клетки В16, обработанные L929-внДНК, характеризовались более высокой скоростью роста опухолевого узла (модель I) и увеличением количества метастазов (модель II). Обработка клеток В16 В16-внДНК приводила к уменьшению опухолевого узла и количества метастазов в моделях I и II соответственно.

Обнаружено, что в составе В16-внДНК высоко представлены фрагменты мобильных генетических элементов (МГЭ) (*B1*, *L1*) и онкогенов (*Myc*, *Ras*). В составе L929-внДНК были обнаружены МГЭ, чья представленность была сравнимой в опухолевой внДНК, и онкогены, представленность которых отличалась. Количество копий *Myc* в составе L929-внДНК оказалась выше, чем в опухолевой В16-внДНК, в то время как копии *Ras* представлены в меньших количествах. Также был проведен анализ уровня метилирования внДНК с

помощью рестриктаз, специфичных к мотивам метилирования. Показано, что опухолевая В16-внДНК гипометилирована по сравнению с L929-внДНК.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00289.*

1. Kustanovich A. *et al.*, Cancer Biol Ther. 20, 8 (2019).

## Получение очищенного рекомбинантного белка МХ-А в клетках *Escherichia coli*

Циммерман Е. Л.<sup>1,2</sup>, Добровольская О. А.<sup>2</sup>, Елпаева Е. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*katerinacimmerman@gmail.com*

В медицине существует проблема в определении этиологии инфекционных заболеваний, что приводит к бесконтрольному применению противомикробных препаратов и повышению антибиотикорезистентности бактериальных штаммов. Муховirus resistance protein (MxA) – это белок устойчивости к вирусной инфекции с весом в 76 кДа, который специфически накапливается в цитоплазме и эндоплазматическом ретикулуме в ответ на проникновение вируса в клетки. MxA обладает противовирусной активностью за счет его способности к олигомеризации и образованию кольцевых структур вокруг нуклеокапсидов вирусов, препятствуя их дальнейшему размножению в организме. Применение анализа экспрессии человеческого белка MxA в качестве биомаркера вирусной инфекции может стать многообещающим методом при разработке мультиплексной диагностической платформы [1].

Целью данной работы являлось получение рекомбинантного белка MxA в клетках *Escherichia coli*, с последующей его очисткой.

На основе исходной референсной последовательности человеческого белка MxA P20591 из базы (Uniprot) нами была получена нуклеотидная последовательность, оптимизированная для экспрессии в клетках *E. coli*. Последовательность гена Mx1 была клонирована в экспрессионный вектор pET302 по сайтам рестрикции EcoRI и BamHI. Полученной плазмидной ДНК методом электропорации был создан высокопродуктивный штамм *E. coli* BL21(DE3)pET302-MxA – продуцент рекомбинантного белка MxA. Нами были подобраны оптимальные условия индукции 0,1 мМ ИПТГ для экспрессии гена Mx1, обеспечивающего высокий выход рекомбинантного белка. Также был получен препарат очищенного рекомбинантного белка с использованием метода иммобилизованной металлоаффинной хроматографии. Выход белка MxA из 1 литра жидкой культуры клеток *E. coli* штамма-продуцента составил 10 мг с концентрацией 05 мг/мл.

1. Zav'yalov V.P. *et al.* Interferon-inducible myxovirus resistance proteins: potential biomarkers for differentiating viral from bacterial infections // *Clinical Chemistry*. – 2019. – V. 65. – No. 6. – P. 739–750.

## Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа в лучевой терапии: потенциал улучшения радиочувствительности злокачественных глиом

Чан Н. Х.<sup>1,2</sup>, Рыжов В. А.<sup>1</sup>, Волницкий А. В.<sup>1</sup>, Амерканов Д. А.<sup>1,3</sup>, Пак Ф. А.<sup>1,3</sup>,  
Голубев А. М.<sup>1</sup>, Лебедев Д. В.<sup>1,3</sup>, Коневега А. Л.<sup>1,2,3</sup>, Штам Т. А.<sup>1,3</sup>,  
Марченко Я. Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

*nhanhau.tran92@gmail.com*

Глиома является наиболее распространенной злокачественной первичной опухолью головного мозга [1]. Лучевая терапия используется в послеоперационной терапии глиом. Эффективность дозы можно повысить с помощью радиосенсибилизаторов, таких как суперпарамагнитные наночастицы оксида железа [2].

Целью данной работы является изучение совместного действия наночастиц оксида железа и различных типов ионизирующего излучения на культивируемые клетки глиом.

В этом исследовании мы изучали радиосенсибилизирующий потенциал биосовместимых наночастиц оксида железа в декстрановой оболочке на линиях клеток глиом A172 и GI-Tr *in vitro*. Клетки, предварительно инкубированные с наночастицами в течение 24 ч, подвергали воздействию рентгеновского излучения с энергией 35 КэВ, гамма-излучения с энергией 1,2 МэВ или протонов (с энергией 200 МэВ) на пике Брэгга в диапазоне доз 0,5–6 Гр, а их жизнеспособность оценивали с помощью метода AlamarBlue и последующего окрашивания выживших клеток кристаллическим фиолетовым. Значительный эффект радиосенсибилизации наночастицами наблюдался в обеих линиях при воздействии на клетки рентгеновским излучением. В гамма диапазоне слабый радиосенсибилизирующий эффект был обнаружен только в линии GI-Tr, а при облучении протонами на пике Брэгга эффект отсутствовал. Совместная инкубация клеток с наночастицами приводила лишь к незначительному увеличению уровня активных форм кислорода (около 10 %) после рентгеновского облучения. При этом известно, что рентгеновское излучение в данном диапазоне энергий генерирует значительное количество вторичных электронов на Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ядре наночастиц за счет фотоэффекта. Таким образом,

результаты позволяют предположить, что радиосенсибилизирующий эффект, вызванный поглощенными опухолевыми клетками наночастицами, вероятно, связан не столько с активными формами кислорода, сколько со вторичными электронами, генерируемыми магнетитным ядром наночастиц при облучении.

*Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-25-00273, <https://rscf.ru/project/23-25-00273/>*

1. Weller M. *et al.* Glioma // Nature reviews Disease primers. 2015. V. 1(1). P. 1–18.
2. Russell E. *et al.* Impact of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on *in vitro* and *in vivo* radiosensitisation of cancer cells // Radiation Oncology. 2021. V. 16(1). P. 1–16.

## Взаимодействие птерина и кластеров золота: теоретическое исследование

Чеботаев П. П., Кононов А. И., Буглак А. А.

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

*st068500@student.spbu.ru*

Птерины являются биомаркерами различных патологических состояний, включая болезни сердечно-сосудистой системы [1], различные виды рака [2], а также COVID-19 [3]. В этой связи детекция птеринов в биологических жидкостях представляет значительный интерес для медицины.

Нанокластеры благородных металлов (НК) в последнее время привлекают внимание ученых из-за своих уникальных физико-химических свойств, делающих возможным использование НК в качестве сенсоров для детекции биомолекул [4]. В частности, представляет интерес исследование взаимодействий птерина с золотыми НК. Характеристиками золотых НК, выделяющими их среди НК других металлов, являются низкая токсичность и высокая химическая стабильность [5].

Мы провели расчет энергии взаимодействия для комплексов золотых НК, состоящих из различного числа атомов ( $n = 1-6$ ) с различным зарядом ( $q = 0, +1, +2$ ), взаимодействующих с нейтральным и депротонированным птерином. Мы использовали теорию функционала плотности и метод PBE-D3/def2-TZVP с континуальной моделью CPCM для учета влияния воды. Показано, что для нейтрального птерина атом N8 является наиболее предпочтительным сайтом взаимодействия с нейтральными и катионными НК. Обнаружено, что наибольшая энергия взаимодействия наблюдается для комплексов с кластером, имеющим  $n = 6$  и  $q = +2$ : 78,2 ккал/моль [6]. Определение птерина с помощью люминесцентного и колориметрического методов является наиболее эффективным при значениях pH ниже 8: в нейтральной среде комплекс птерина с кластером, содержащим пять атомов и имеющий заряд +1, обладает интенсивным  $S_0 \rightarrow S_1$  переходом. Также выявлено, что при значениях pH выше 8 использование НК является перспективным для обнаружения птеринов в водных растворах при помощи рамановской спектроскопии. Таким образом, нами проанализирована возможность обнаружения птерина с использованием малых НК золота при помощи спектральных методов.

*Работа была выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 20-73-10029.*

1. Pacileo M. *et al.* The role of Neopterin in cardiovascular disease. *Monaldi Archives for Chest Disease*, vol. 68, pp. 68–73 (2007).
2. Kośliński P. *et al.* The metabolic profiles of pterin compounds as potential biomarkers of bladder cancer—Integration of analytical-based approach with biostatistical methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 127, pp. 256–262 (2016).
3. Hailemichael W. *et al.* Neopterin: A Promising Candidate Biomarker for Severe COVID-19. *Journal of Inflammation Research*, vol. 14, pp. 245–251 (2021).
4. Bai Y. *et al.* Fluorescent Gold Nanoclusters for Biosensor and Bioimaging Application. *Crystals*, vol. 10, no. 5, p. 357 (2020).
5. González-Rosell A. *et al.* Structure and luminescence of DNA-templated silver clusters. *Nanoscale Advances*, vol. 3, no. 5, pp. 1230–1260 (2021).
6. Chebotaev, P.P., Plavskii, V.Y., Kononov, A.I., Buglak, A. A. Pterin interactions with gold clusters: A theoretical study. *Dyes and Pigments* 216, 111323 (2023).



## **Поведенческое фенотипирование: связь индивидуальных поведенческих паттернов с количеством вовлекаемых в научение нейронов неокортекса**

*Чистова Н. А.<sup>1</sup>, Булава А. И.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Государственный академический университет гуманитарных наук, Москва, Россия*

<sup>2</sup> *Лаборатория психофизиологии им. В. Б. Швыркова Института психологии РАН, Москва, Россия*

*chistova-natalia@mail.ru*

В настоящее время ведутся исследования процессов, опосредующих иммунные и нейроэндокринные взаимосвязи, которые оказываются нелинейными и трудно интерпретируемыми. Мы утверждаем, что мозговое обеспечение формируемого поведения, равно как и динамика научения, связаны с индивидуальными характеристиками, такими как уровни тревожности и исследовательской активности, что отражается в паттерне распределения нейронов, вовлекаемых в обеспечение поведения. Заключение о степени вовлечения мозговых структур делается на основе анализа распределения с-Fos-положительных нейронов, с помощью метода непрямого иммуногистохимии на криогенных срезах мозга [1]. Ключевыми факторами, опосредующими процесс научения, являются характеристики формируемого поведения, такие как тип задачи или способ обучения, а также исходные индивидуальные особенности организма, например такие как уровни тревожности и исследовательской активности. То есть состояние организма, предшествующее обучению, а также характер данного обучения обуславливают эффективность научения.

Чтобы выявить и оценить степень взаимосвязи между различными параметрами поведения, научения, и числом нейронов разных слоев неокортекса, вовлекаемых в обеспечение формируемого в эксперименте поведения, мы проанализировали поведенческую активность половозрелых крыс Long-Evans в модифицированных тестах «открытое поле» и «распознавание нового объекта», скорость научения (в днях) инструментальному пищедобывательному поведению [2] и распределение с-Fos-позитивных нейронов в слоях ретроспленальной коры мозга. Мы обнаружили значимое влияние уровней тревожности и исследовательской активности на скорость обучения, а также значимую взаимосвязь между этими индивидуальными характеристиками и избирательными изменениями количества вовлекаемых в научение нейронов глубоких и поверхностных слоев дисгранулярной зоны ретроспленальной коры [3].

*Работа ведется при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (№ 0138-2024-0013), Института психологии РАН.*

1. Svarnik O.E., Bulava A.I., Alexandrov Y.I.: Expression of c-Fos in the rat retrosplenial cortex during instrumental re-learning depends on the number of stages of previous training. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 78 (2013).
2. Bulava A.I., Alexandrov Y.I. Reconsolidation and Cognitive Novelty // *Advances in Intelligent Systems and Computing / Advances in Cognitive Research, Artificial Intelligence and Neuroinformatics*. Springer, Cham. 2021. V. 1358. P. 504–509. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-71637-0\\_58](https://doi.org/10.1007/978-3-030-71637-0_58)
3. Bulava A.I. *et al.*: The Influence of Anxiety and Exploratory Activity on Learning in Rats: Mismatch-Induced c-Fos Expression in Deep and Superficial Cortical Layers, *Advances in Neural Computation, Machine Learning, and Cognitive Research VII* (pp.323–333), (2023).

**«Эффект бабочки» в мире стрептограминов А:  
связывание мадумицина II в пептидилтрансферазном центре рибосомы  
дезорганизует механизм трансляции**

Шуленина О. В.<sup>1</sup>, Пичкур Е. Б.<sup>1,2</sup>, Толстыко Е. А.<sup>1</sup>, Касацкий П. С.<sup>1</sup>,  
Полесскова Е. В.<sup>1,3</sup>, Коневега А. Л.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

shuleniina\_ov@nrcpi.nrcki.ru

Может ли малая молекула антибиотика мадумицина II (Маду) привести к целому комплексу изменений в крупной и многокомпонентной системе биосинтеза белка? Наше исследование молекулярного механизма действия Маду с привлечением функциональных биохимических тестов и криоэлектронной микроскопии отвечает на этот вопрос «да».

Маду является представителем стрептограминов группы А – одного из важнейших классов ингибиторов бактериальной трансляции, которые используются в последней линии терапии человека [1, 2]. Подробное выяснение механизмов действия соединений данной группы поможет в будущем повысить их биодоступность и успешнее бороться с бактериальной антибиотикорезистентностью.

Предполагалось, что связывание стрептограминов А в пептидилтрансферазном центре рибосомы стерически препятствует корректному расположению акцепторных концов А- и Р-сайтовых тРНК, предотвращая пептидилтрансферазную реакцию [1]. Мы же показали, что в присутствии Маду наблюдается отгибание акцепторного конца только Р-сайтовой тРНК. Примечательно, что аффинность комплекса рибосома-Маду настолько высока, что антибиотик может связываться, смещая акцепторный конец не только деацилированной или аминоксил-тРНК, но и тРНК, несущей два и даже три аминокислотных остатка. При этом в случае А-сайтовой тРНК происходит нарушение множественных контактов тела молекулы с рРНК, приводящее к дестабилизации всей тРНК.

Описанные изменения приводят к дезорганизации процесса трансляции: тРНК доставляется на рибосому, после чего часть молекул диссоциирует из А сайта вследствие дестабилизации, оставшаяся часть молекул тРНК не может

корректно аккомодироваться и перевести пептидилтрансферазный центр в индуцированное состояние, облегчающее потенциальный перенос пептида. Отгибание акцепторного конца Р-сайтовой тРНК делает маловероятную в данной ситуации пептидилтрансферазную реакцию невозможной.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00278).*

1. Mast Y., Wohlleben W., Int J Med Microbiol, 304, 1 (2014).
2. Osterman I.A. *et al.*, Nucleic Acids Res, 45, 12 (2017).

## Разработка алгоритма анализа изображений молекулярного метаболического имиджинга на основе сверточных нейросетей

Щечкин И. Д.<sup>1,2</sup>, Родимова С. А.<sup>1</sup>, Бобров Н. В.<sup>3</sup>, Можеров А. М.<sup>1</sup>,  
Кузнецова Д. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России,  
Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет  
им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

<sup>3</sup> Приволжский окружной медицинский центр ФМБА России, Нижний Новгород,  
Россия

*liihasa1992@gmail.com*

Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия FLIM [1] – метод, позволяющий анализировать времена жизни флуоресценции внутриклеточных флуорофоров, в частности никотинамидадениндинуклеотида НАД(Ф)Н. Для описания времен жизни флуоресценции НАД(Ф)Н используется модель, где параметрам  $a_1$ ,  $a_2$  и  $a_3$  соответствуют вклады свободной, связанной и фосфорилированной форм НАД(Ф)Н в общее время жизни флуоресценции. Эти параметры связаны с анаэробным гликолизом, окислительным фосфорилированием и синтетической функцией ткани. При использовании метода накапливается большое количество изображений, требующих обработки, при этом существует высокий вклад человеческого фактора. В связи с этим существует потребность в автоматизации и унификации обработки изображений, что возможно с применением нейросетей (НС). Целью работы являлась разработка алгоритма автоматического анализа FLIM-изображений на основе сверточных НС.

Было получено 330 FLIM-изображений печени на разных этапах регенеративного процесса при развитии патологии печени. Для изображений в Fiji (ImageJ) были размечены границы клеток и ядер. Изображения были аугментированы, было накоплено 988 изображений. В качестве НС была выбрана архитектура Unet++ с использованием многокомпонентной функции потерь, включающей в себя: BCE, Focal и Dice функции потерь.

Набор изображений был использован для обучения НС для выделения границ клеток ( $F1 = 0,77$ ,  $AUC = 0,9$ ) и НС для определения ядер ( $F1 = 0,65$ ,  $AUC = 0,98$ ). Также были получены маски интенсивности. Предсказания использовались для проведения Instance сегментации. Полученные ROI

использовались для расчета затухания флуоресценции на основе экспоненциально модифицированной гауссовой функции клеточно. Было показано, что автоматическая обработка сопоставима с вариантом ручной обработки для анализа изменения паттернов, а разбросы результатов анализа меньше или равны.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00100).*

1. Becker W., Fluorescence lifetime imaging—techniques and applications. J Microsc 119–136, 247 (2012).

## **Влияние кратности введения наноконплексов на изменения оптических параметров опухоли лабораторных животных**

*Тучина Д. К.<sup>1, 2, 3</sup>, Лазарева Е. Н.<sup>1, 3</sup>, Анисимов Р. А.<sup>1</sup>, Ломова М. В.<sup>1</sup>,  
Доронкина А. А.<sup>1</sup>, Мыльников А. М.<sup>4</sup>, Наволокин Н. А.<sup>4</sup>, Кочубей В. И.<sup>1, 3</sup>,  
Янина И. Ю.<sup>1, 3</sup>*

<sup>1</sup> *Саратовский национальный исследовательский государственный университет  
им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, Россия*

<sup>2</sup> *Институт биохимии им. А. Н. Баха Федерального исследовательского  
центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

<sup>3</sup> *Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск,  
Россия*

<sup>4</sup> *Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского,  
Саратов, Россия*

*irina-yanina@yandex.ru*

Одним из перспективных материалов для развития методов фотодинамической терапии являются функционализированные апконверсионные наночастицы, которые позволяют не только повысить эффективность терапии, но и расширить диагностический инструментарий. Сшивка фотодинамического красителя с оболочкой наночастиц требует дополнительного покрытия их поверхности. Покрытия частиц сывороточным альбумином биосовместимы со многими типами клеток в широком диапазоне концентраций [1], легко усваиваются клетками [1, 2], неиммуногенны и имеют длительный период полураспада в кровотоке [3, 4]. Одним из этапов клинических исследований новых препаратов является, в частности, определение наиболее эффективной дозы, кратности введения [5].

Интерес представляет разработка методики получения наноконтейнеров, содержащих как фотосенсибилизатор, так и, например, апконверсионные наночастицы (АКНЧ) [6, 7]. Применение АКНЧ позволит расширить область применения фотосенсибилизатора, за счет увеличения глубины проникновения света в биологические ткани.

Данные об оптических параметрах тканей в сочетании с гистологическим анализом предоставляют информацию о структурных изменениях, происходящих с биотканями и их компонентами, что необходимо учитывать при выборе терапии, дозе облучения, кратности введения препарата.

В данном исследовании показано изменение оптических параметров, таких как коэффициент поглощения, коэффициент рассеяния, коэффициент

анизотропии, биологических тканей до и после введения наноконплекса, взятых из зоны развития опухоли в зависимости от кратности введения.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-72-10057, <https://rscf.ru/project/21-72-10057/>.*

1. Michaelis K., Hoffmann M.M. *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 317, 1246 (2006).
2. Irache J.M., Merodio M. *et al.*, Mini Rev. Med. Chem. 5, 293 (2005).
3. Loureiro A., Azoia N.G. *et al.*, Curr. Pharm. Des. 22, 1371 (2016).
4. An F.F., Zhang X.H., Theranostics. 7, 3667 (2017).
5. Качественная клиническая практика с основами доказательной медицины. Учебное пособие для системы послевузовского и дополнительного профессионального образования врачей / Под общей редакцией академика РАМН, профессора Р. Г. Оганова. М.: Силиция-Полиграф, 2011. 136 с.
6. Wang C., Cheng L., Liu Z., Theranostics. 3, 317 (2013).
7. Lee S.Y., Lee R. *et al.*, Front Bioeng Biotechnol. 8, 275 (2020).