

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА
Российской академии наук
УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ЦЕНТРАЦИОНАЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ИНИЦИАТИВЫ**

**ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ
ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

**МОСКОВСКИЙ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
(национальный исследовательский университет)
ФИЗТЕХ-ШКОЛА БИОЛОГИЧЕСКОЙ И МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ**

**XXXIII ЗИМНЯЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ МОЛОДЁЖНАЯ
НАУЧНАЯ ШКОЛА "ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ"**

Москва, 8-11 февраля 2021 г.



СБОРНИК ТЕЗИСОВ

**Под редакцией
д.х.н. Т.В. Овчинниковой, к.б.н. Е.А. Стукачевой**

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА
Российской академии наук
УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ЦЕНТРА НАЦИОНАЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ИНИЦИАТИВЫ**

**ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ
ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

**МОСКОВСКИЙ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
(национальный исследовательский университет)
ФИЗТЕХ-ШКОЛА БИОЛОГИЧЕСКОЙ И МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ**

**XXXIII ЗИМНЯЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ МОЛОДЁЖНАЯ
НАУЧНАЯ ШКОЛА "ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ"**

Москва, 8-11 февраля 2021 г.

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

**Сопредседатели Программного комитета:
академик А.Г. Габибов, академик В.Т. Иванов**

**Председатель Организационного комитета:
д.х.н. Т.В. Овчинникова**

Школа проводится при поддержке
компании “Хеликон”

Составитель: к.б.н. Стукачева Е.А.

Компьютерная верстка: Яковлева Т.И., Семина О.Б.

Отпечатано на полиграфическом участке ИБХ РАН
Печать офсетная. Печ. л. 14,4. Тираж 250 экз.

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 2021 г.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

СЕКЦИЯ 1

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ. БИОКАТАЛИЗ

1.1. ИНТЕРФЕЙС МЕЖДУ МОНОМЕРАМИ В ДИМЕРЕ ГИСТОНОПОДОБНОГО БЕЛКА HU КАК МИШЕНЬ ДЛЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНГИБИТОРОВ

Агапова Ю.К.¹, Алтухов Д.А.¹, Тимофеев В.И.^{1,2}, Ракитина Т.В.^{1,3}

¹Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий НИЦ
"Курчатовский институт", Москва

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ "Кристаллография
и фотоника" РАН, Москва

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, Москва
agapova.jk@gmail.com

Гистонopodobные HU-белки являются глобальными регуляторами топологии бактериального генома и участвуют в регуляции транскрипции. Они необходимы для выживания простейших микроорганизмов класса Mollicutes, ряда патогенных бактерий, включая *Mycobacterium tuberculosis* и *Streptococcus pneumoniae*, и являются перспективной мишенью для разработки новых антибиотиков. Однако конкурентное ингибирование ДНК-связывающей способности HU-белков малоэффективно из-за высокой подвижности и большого размера ДНК-связывающего сайта. Поэтому использован альтернативный подход, основанный на поиске молекул, взаимодействующих с границей между двумя мономерами. Пространственная структура HU-белка из *Spiroplasma melliferum* (HUSpm) использована в качестве мишени для виртуального скрининга химической библиотеки, а также для моделирования комплекса HUSpm с ингибиторами. Анализ молекулярно-динамической траектории, полученной для комплекса HUSpm-ингибитор, подтвердил, что связывание ингибитора на границе между мономерами приводит к нарушению конформационной динамики в области ДНК-связывающего домена. С помощью метода торможения в геле показано, что ингибиторы действительно нарушают ДНК-связывающие свойства белка, что указывает на перспективность использования предложенного подхода.

Экспериментальные работы велись при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-04-01001), вычислительные - при частичной финансовой поддержке НИЦ "Курчатовский институт" (приказ № 1363 от 25.06.2019).

1.2. НЕГИДРОЛИТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ A2 ИЗ ЯДА ПЧЕЛЫ НА ЖИДКОФАЗНЫЕ И ГЕЛЕВЫЕ ФОСФОЛИПИДНЫЕ БИСЛОИ

Алексеева А.С., Волынский П.Е., Водовозова Е.Л., Болдырев И.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
anna@lipids.ibch.ru

Фосфолипазы A2 (ФЛА2) способны отщеплять жирную кислоту из положения *sn*-2 фосфолипида. Важной особенностью ФЛА2 является наличие у фермента двух сайтов связывания: один отвечает за связывание фермента с липидной мембраной, а второй - за связывание с отдельной молекулой липида и ее гидролиз. Активность и селективность фермента определяется работой обоих сайтов. На сегодня, механизм взаимодействия ФЛА2 с липидной мембраной - самый сложный элемент в понимании биохимии фермента. Известно, что гидролиз ФЛА2 липидов из гелевой фазы замедлен и имеет более сложную кинетику по сравнению с гидролизом жидкофазного бислоя, однако причины этого явления не выяснены. Используя комбинацию экспериментальных и расчетных методов, мы исследовали молекулярные детали взаимодействия ФЛА2 из пчелиного яда с мембранами на основе пальмитоилтолеилфосфатидилхолина (жидкофазный бислой) и дипальмитоилфосфатидилхолина (гелевый бислой). На макроскопическом уровне применялась флуоресцентная спектроскопия с липидными зондами (для отслеживания изменений в мембране) и собственная флуоресценция ФЛА2 (для отслеживания изменений микроокружения белка при взаимодействии с бислоем). Последующие эксперименты включали анализ гидролиза липидов с помощью ТСХ, контроль изменения размеров липосом в присутствии белка методом DLS, а также оценку их морфологии с помощью ТЕМ. Для изучения липид-белковых взаимодействий на субмолекулярном уровне использовали молекулярную динамику в крупнозернистом и полноатомном разрешении. Было показано, что после первоначального контакта фермента с мембраной образуется сеть водородных связей. Это приводит к деформации бислоя и образованию вмятины в зоне контакта с белком. Реакция бислоя на деформацию зависела от его фазового состояния. Для гелевого бислоя сорбция белка приводила к локальному переходу липидов в разупорядоченное состояние и сильной деформации бислоя. В случае жидкофазного бислоя липиды вытеснялись из зоны контакта, в результате чего образовывалась большая гидрофобная область и деформация бислоя компенсировалась латеральной диффузией липидов. Мы предполагаем, что относительная способность бислоя адаптироваться к деформации за счет перераспределения липидов определяет скорость начальных стадий катализа.

Работа поддержана грантом РФФ 19-75-00101.

Литература:

1. Alekseeva et al. BBA-Biomembranes, 2021, 1863(1), 183481, 10.1016/j.bbamem.2020.183481.

1.3. ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ ЭМФОРИНА - НОВОГО БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ

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

Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва
igorqetu@mail.ru

Недавно в бактерии *Serratia proteamaculans* был обнаружен эмфорин (M4in) - прототип нового семейства белковых ингибиторов металлопротеаз. Было показано, что ген этого белка, а также гены его гомологов у других бактерий локализованы с генами протеалинподобных протеаз (ППП), которые, вероятно, вовлечены во взаимодействие бактерий с высшими организмами и патогенез. В настоящее время ППП нескольких бактерий достаточно хорошо охарактеризованы, однако об M4in и его гомологах нет практически никаких данных. В то же время характеристика ингибиторного действия этих белков и их взаимодействия с ППП может дать новую информацию, важную для понимания механизмов взаимодействия бактерий с высшими организмами.

Для характеристики ингибиторного действия M4in нами были получены препараты рекомбинантного M4in и протеализина (PLN) - ППП из *S. proteamaculans*, что позволило исследовать влияние M4in на кинетику катализируемого PLN гидролиза пептидного субстрата с внутренним тушением флуоресценции 2-аминобензоил-Arg-Ser-Val-Ile-Lys(2,4-динитрофенила). Ферментативная реакция была изучена при шести концентрациях M4in в диапазоне 0,5-3,5 нМ и концентрациях субстрата 30 и 90 мкМ. Характер полученных кинетических зависимостей показал, что M4in является медленно связывающимся обратимым ингибитором. Экспериментальные данные были аппроксимированы методом нелинейной регрессии, используя уравнение для медленно связывающихся ингибиторов:

$$[P]_t = v_s t + \frac{(v_0 - v_s)(1 - e^{-k_a t})}{k_a} + c$$

где $[P]_t$ - концентрация продукта реакции в момент времени t , М; k_a - кажущаяся константа скорости первого порядка, c^{-1} ; v_s - стационарная скорость, $M \cdot c^{-1}$; v_0 - начальная скорость, $M \cdot c^{-1}$ [1].

Для каждой пары концентраций ингибитор/субстрат были определены параметры k_a , v_0 и v_s и обнаружено, что v_0 не зависит от концентрации ингибитора, k_a зависит линейно, а v_s - гиперболически, что указывает на образование комплекса фермент-ингибитор в одну медленную стадию. На основе полученных данных были рассчитаны константы скоростей прямой и обратной реакции образования комплекса фермент-ингибитор ($k_{+3} = (9 \pm 2) \cdot 10^{-3} \text{ нМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$, $k_{-3} = (46 \pm 7) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$), а также константа ингибирования ($K_i = 52 \pm 14 \text{ пМ}$).

Таким образом, нами впервые показано, что M4in является сильным конкурентным медленно связывающимся и действующим по одностадийному механизму ингибитором.

Литература:

1. Morrison J.F. The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. // Trends in Biochemical Sciences, 1982, V. 7, № 3, P. 102-105.

1.4. МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ОСТАТКОВ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ (TCDH) ПРЕДОТВРАЩАЕТ ДВОЙНИКОВАНИЕ КРИСТАЛЛОВ ФЕРМЕНТА

Варфоломеева Л.А.¹, Поляков К.М.², Комолов А.С.³, Ракитина Т.В.^{1,4},
Бойко К.М.¹, Тихонова Т.В.¹, Попов В.О.^{1,3}

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

³НИЦ "Курчатовский институт", Москва

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва

larisaavarfolomeeva@gmail.com

Тиоцианатдегидрогеназа (TCDH) - медьсодержащий фермент, вовлеченный в метаболизм тиоцианата бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus*. TCDH катализирует реакцию окислительного разложения тиоцианата до цианата и элементарной серы. Три иона меди, выступающие в роли кофакторов, организованы в новый тип медного кластера в активном центре фермента. Пространственная структура TCDH была решена методом рентгеноструктурного анализа с наилучшим разрешением 1.45 Å, однако кристаллы фермента представляли собой двойники псевдо-мероэдрического типа, что затрудняло корректное описание координации ионов меди. Анализ кристаллических контактов в имеющихся пространственных структурах TCDH позволил выявить ряд аминокислотных остатков, потенциально влияющих на упаковку молекул белка в кристалле. Для предотвращения двойникового кристаллов TCDH были получены рекомбинантные формы фермента с точечными заменами в данных положениях, которые, как предполагалось, приведут к изменению упаковки молекул в кристалле и, как следствие, исчезновению двойникового кристалла. Две структуры TCDH с заменами T169A и K281A были установлены с разрешением 1.85 Å и 1.95 Å, соответственно. Кристаллическая модификация кристалла TCDH с заменой T169A соответствовала самой распространенной кристаллической модификации кристаллов-двойников нативного фермента, и кристаллическая упаковка белка не изменилась. Кристалл TCDH с заменой K281A принадлежал к кристаллической модификации, ранее не встречавшейся у кристаллов нативного фермента, в которой двойникование невозможно, при этом упаковка молекул белка в этой структуре изменилась. Таким образом, точечная замена K281A на поверхности TCDH позволила получить кристаллы без двойникового кристалла, перспективные для дальнейших структурных исследований активного центра белка.

1.5. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРИМЕМБРАННОГО И ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНОВ РЕЦЕПТОРА TrkA

Васильева Е.В., Гончарук С.А., Кот Э.Ф., Минеев К.С.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
anflez001@bk.ru

Нейротрофины являются ключевыми игроками в процессе развития нервной системы, поскольку являются факторами роста. Они принимают важное участие в процессах жизнедеятельности нейронов, таких как синаптическая пластичность, запрограммированная клеточная гибель, защита от апоптоза, миграция и дифференциация. Экспрессия нейротрофинов напрямую связана с проявлением различных фенотипических признаков. Сейчас известны два типа рецепторов, таких как: общий для всех нейротрофинов рецептор роста нейронов р75NTR и специфический для каждого типа нейротрофинов - Trk-рецепторы.

Одним из наиболее известных представителей специфических рецепторов является TrkA. Он имеет участок связывания для фактора роста нейронов (NGF). Однако хоть эти рецепторы и являются популярными объектами в научных исследованиях, TrkA на сегодняшний день не изучен достаточно хорошо, чтобы полностью понимать его работу.

Внеклеточная часть белка состоит из лейцин-богатого участка, обособленного двумя цистеин-богатыми доменами, и двумя иммуноглобулин-подобными доменами, которые связаны с трансмембранным доменом (ТМД) через небольшой линкер. ТМД представляет собой одиночную α -спираль. Внутриклеточная же часть белка содержит примембранный регион, который связывает ТМД и киназный домен, ответственный за запуск сигнального каскада внутри клетки. Ранее считалось, что взаимодействие с NGF приводит к димеризации рецептора и активации киназного домена. Однако более свежие работы показывают, что на поверхности мембраны TrkA может присутствовать и в виде неактивного димера. На сегодняшний день недостаточно данных, чтобы иметь полную картину о том, как сигнал передается к трансмембранному домену, поэтому мы одновременно изучаем структуру примембранного и трансмембранного доменов, с помощью ЯМР спектроскопии, чтобы установить принципы их работы и взаимосвязь между ними.

В данной работе мы приводим высокоэффективные протоколы продукции связки примембранного и трансмембранного доменов в системе бесклеточного синтеза, выходы составили порядка миллиграмма с миллилитра реакционной смеси. Кроме того, представлены протоколы очистки данного белка, включающие металл-хелатную аффинную хроматографию и гель-фильтрацию. Показано, что наиболее удобной средой, имитирующей мембранное окружение, являются биселлы DMPC/CHAPS. В данном окружении трансмембранный домен принимает форму альфа спирали, а примембранный регион находится в растворе. С использованием метода ЯМР были описаны структурные характеристики обеих частей исследуемого фрагмента рецептора TrkA. Для трансмембранного домена получены параметры альфаспиралей, а для примембранного региона - описаны его структурные элементы и их подвижность.

Работа поддерживается грантом РФФИ №20-04-00241.

1.6. СОДЕРЖАТ ЛИ ГЛИКОПРОТЕИНЫ ВИРУСА COVID-19 УЧАСТКИ С ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ?

Воропаев Г.С.¹, Данилкович А.В.^{1,2}

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

voropags@gmail.com

Известно, что вирусные частицы COVID-19 взаимодействуют с клеточным рецептором ангиотензин-конвертирующим ферментом 2 типа (ACE-2) путём комплементарного контакта S-белка вируса с рецептором. В первую очередь поражаются эпителиальные клетки носоглотки, лёгких и кишечника. Наблюдается широкая неопределённость в плане течения болезни среди людей. Степень тяжести симптомов весьма разнится, так у 20-30% болезнь (вернее период инфицирования) может протекать бессимптомно или с минимальными клиническими проявлениями. Внимания заслуживают факты повторного заражения ранее переболевших COVID-19 людей. Отмечена возможность резкого ухудшения самочувствия больного нетипичной пневмонией, вызванной COVID-19 за короткий период. Учитывая вышесказанное, мы решили проанализировать аминокислотные последовательности белков вирусной частицы COVID-19 на предмет наличия октапептидов с характерной композицией аминокислотных остатков, имеющих свойства, близкие к свойствам иммуномодулирующих октапептидов, установленных ранее: CSSVKVSC или CTGIRISC. Анализу подвергли аминокислотную последовательность /locus_tag="GU280_gp04"/ note="ORF4; E protein"/ protein_id="YP_009724392.1" оболочкового белка E.

Методы. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белка E COVID-19 и модельных октапептидов позволил определить участки с подобными свойствами в составе белка E. Термодинамические характеристики лигандов моделировали, размещая обнаруженные пептиды в составе тройного комплекса с белками Главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) и Т-клеточным рецептором (HLAII-PL-TCR). Свободную энергию полного комплекса и её изменение рассчитывали как $\Delta\Delta E_c = \Delta E_c - (\Delta E_{REC} + \Delta E_{PL} + \Delta E_{TCR})$. В качестве моделей использовали 3D-структуры аналогичных тройных комплексов, доступных из базы данных.

Результаты. Определили два потенциальных участка октапептидов в составе белка E COVID-19: 34-41 а.о. и 65-72 а.о. Моделирование тройного комплекса пептидных лигандов с белками ГКГ и Т-клеточным рецептором подтвердили возможность наличия биологических свойств, схожих с пептидами CSSVKVSC и CTGIRISC.

Вывод. Возможность присутствия в составе E-белка капсида вирусной частицы COVID-19 октапептидов с иммуномодулирующими свойствами может объяснить неоднородную картину развития иммунного ответа на COVID-19 у разных индивидов, что объясняется их различным генотипом по HLAII и TCR.

1.7. ПОЛУЧЕНИЕ ГЛАВНОЙ ПРОТЕАЗЫ SARS-CoV-2 В РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЕ

Голубева А.К.¹, Калиберда Е.Н.¹, Захарова М.Ю.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва
Golualu@mail.ru

На сегодняшний день пандемия COVID-19 приобрела значительные масштабы, нанеся ощутимый удар по сфере здравоохранения. Перспективной мишенью при исследовании данного вируса является главная протеаза SARS-CoV-2 Mpro - фермент, играющий ключевую роль в процессинге вирусного полипротеина, который синтезируется с вирусной РНК. Данная протеаза относится к семейству цистеиновых протеаз и расщепляет два вирусных полипротеина по нескольким сайтам с дальнейшим высвобождением большинства вирусных белков в индивидуальном виде. В том числе, протеаза имеет сайты расщепления, фланкирующие собственно аминокислотную последовательность самой протеазы, т.е. происходит авто-активация данного фермента. Ингибиторы данного фермента блокируют сборку вируса. Дизайн лекарственных средств на основе ингибитора Mpro выглядит очень перспективным в борьбе с COVID-19.

В настоящей работе была поставлена задача получить главную протеазу Mpro вируса SARS-CoV-2 в рекомбинантном виде для дальнейшего исследования механизма ее работы и поиска новых потенциальных ингибиторов.

Методы исследования.

1) Выделение плазмидной ДНК высокой степени очистки из культуры клеток *E. coli*. Такое выделение основано на применении микроцентрифужных колонок с сорбционными мембранами.

2) Проведение последующего рестрикционного картирования с целью верификации последовательности данной плазмиды.

3) Определение нуклеотидной последовательности гена Mpro.

3) Проведение трансформации и наработки в штамме *E.coli* для экспрессии B121DE3.

4) Определение количества протеазы в клетках с помощью денатурирующего белкового гель-электрофореза и последующего вестерн-блоттинга с использованием антител к 6HIS тегу, содержащемуся в молекулах рекомбинантной протеазы.

Результаты. Протеаза была наработана в клетках *E.coli* в количестве примерно 1 мг/л.

Выводы.

1) Была получена главная протеаза SARS-CoV-2 в рекомбинантной форме в клетках *E.coli*. После очистки белка протеаза Mpro может использоваться для дальнейших исследований механизма ее работы.

2) В перспективе для протеазы Mpro могут быть подобраны новые ингибиторы-потенциальные лекарства против COVID-19.

1.8. ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ ГИПОТЕТИЧЕСКОЙ M5C-PHK-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ NSUN7

Гусева Е.А.¹, Плетнев Ф.И.^{1,2}, Сергеев П.В.^{1,2}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
eguseva98@mail.ru

За последние годы накопились данные, свидетельствующие о значительном влиянии модификаций РНК на регуляцию экспрессии генов. Одним из примеров модификации РНК является метилирование цитозина по пятому положению азотистого основания. В клетках человека данную модификацию осуществляют белок DNMT2 и представители семейства NSUN. Последней метилтрансферазой с неизвестной функцией остаётся NSUN7.

Наша работа посвящена исследованию функциональной роли NSUN7 и его предполагаемого белка-партнера, а также изучению эволюции строения фиброзной оболочки.

В нашей лаборатории были получены 2 линии мышей-нокауты по гену *Nsun7*. На электронных микрофотографиях сперматозоидов таких мутантов наблюдается изменение расположения и количества продольных колонн фиброзной оболочки. Также был выявлен предполагаемый белок-партнер NSUN7 - C19ORF81. С помощью сервиса HHpred для него было предсказано наличие РНК-связывающего домена.

Мы проанализировали выборки ортологов NSUN7, C19ORF81 и AKAP4 (маркер фиброзной оболочки) на предмет совместного присутствия в геномах Metazoa. Данные о делециях и вставках изучаемых генов были соотнесены с характерными ультраструктурами сперматозоидов таксонов Metazoa. В результате анализа была установлена корреляция между ультраструктурой жгутиков и присутствием изучаемых ортологов в геноме.

Для того, чтобы достичь значимого обогащения фракций сперматоцитов, круглых и элонгированных сперматид нами была отработана методика разделения клеток тестикул на фракции, содержащие половые клетки на разных стадиях развития. При анализе фракций было установлено, что наибольшее содержание NSUN7 наблюдается во фракции, обогащенной элонгированными сперматидами, что согласуется с нашей гипотезой о его участии в формировании фиброзной оболочки жгутика сперматозоида.

Для выявления отличий в белковом составе половых клеток мышей дикого типа и двух линий нокауты, мы провели двумерный дифференциальный гель-электрофорез. Белки со значимым изменением уровня представленности были определены методом MALDI.

1.9. МИНОРНАЯ КОРОТКАЯ ИЗОФОРМА СЕКУРИНА (РТТГ1) РЕГУЛИРУЕТ КЛЕТОЧНЫЙ РОСТ И ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ

Демин Д.Э.^{1,2}, Шварц А.М.^{1,2}

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

²Московский физико-технический институт (национальный

исследовательский университет), Долгопрудный

denis.demin@phystech.edu

В процессе сплайсинга помимо основных изоформ мРНК образуются также изоформы с относительно низким уровнем экспрессии. Многие из них не оказывают значимого влияния на клеточные процессы, и поэтому могут быть отнесены к побочным продуктам сплайсинга. Однако, если низкоэкспрессируемая изоформа обладает уникальной активностью или ее уровень в некоторых условиях становится сопоставимым с уровнем основной изоформы, то такая минорная изоформа может быть функциональной.

Нами была обнаружена минорная короткая изоформа мРНК секурина (РТТГ1), в которой нет экзонов 3 и 4 [1]. Отсутствующие экзоны кодируют ДНК-связывающую область и основной сайт узнавания комплексом стимуляции анафазы, необходимый для быстрой дегградации РТТГ1 во время митоза.

Мы показали, что полная и короткая изоформы РТТГ1 влияют на экспрессию различных наборов генов [2]. В частности, минорная изоформа секурина регулирует экспрессию гена NFYB, который участвует в онкогенезе и формировании устойчивости к химиотерапевтическим препаратам.

Полученные нами предварительные результаты показывают, что подавление минорной изоформы секурина снижает чувствительность клеток линии НЕК293Т к некоторым химиотерапевтическим агентам. Исходя из имеющихся данных, мы предполагаем, что короткая изоформа может играть важную роль в регуляции клеточного роста и формировании лекарственной устойчивости.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90026.

Литература:

1. Demin D.E., et al. "The novel short isoform of securin stimulates the expression of cyclin D3 and angiogenesis factors VEGFA and FGF2, but does not affect the expression of MYC transcription factor." *Molecular Biology* 52.3 (2018): 436-445.
2. Demin D.E., et al. "The Influence of the Minor Short Isoform of Securin (PTTG1) on Transcription is Significantly Different from the Impact of the Full Isoform." *Molecular Biology* 54.1 (2020): 43-50.

1.10. ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИОЦИНОВ Па КЛАССА С НЕКАНОНИЧЕСКОЙ СТРУКТУРОЙ "ПЕДИОЦИНОВОГО БОКСА"

Еремчук С.И., Вершинина М.А., Баландин С.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
sofiia.ermchuk@gmail.com

В борьбе за экологическую нишу бактерии вырабатывают бактериоцины - синтезируемые на рибосомах антибактериальные пептиды, которые могут служить средством для вытеснения конкурирующих видов. В настоящее время областью применения бактериоцинов является пищевая промышленность: высокая антибактериальная активность бактериоцинов и низкая токсичность многих из них для человека позволяют использовать их в качестве пищевых консервантов. Перспективной областью применения бактериоцинов является медицина. На фоне снижения эффективности классических антибиотиков из-за распространения резистентных к ним штаммов значительно возрос интерес к бактериоцинам как к потенциальным антимикробным лекарственным средствам.

Ацидоцин А является представителем бактериоцинов класса Па (педиоцин-подобных бактериоцинов, PLB), характерной особенностью которых является отсутствие посттрансляционных модификаций, за исключением одной или двух дисульфидных связей, а также наличие так называемого "педиоцинового бокса" - аминокислотной последовательности YGNG(V/L) в N-концевой части молекулы. Согласно общепринятой модели, N-концевой фрагмент участвует в формировании комплекса PLB с молекулярной мишенью - бактериальной фосфоенолпируват-маннозофосфотрансферазой, локализованной в мембране клетки-мишени. Ацидоцин А является одним из двух известных на сегодняшний день пептидов данного семейства, педиоциновый бокс которых содержит дополнительный аминокислотный остаток (YG**T**NGV). Известно, что большинство аминокислотных замен в педиоциновом боксе приводят к значительному снижению антимикробной активности пептида. Известно также, что спектр активности ацидоцина А отличается от спектра активности классических PLB.

Целью данной работы являлось исследование влияния дополнительного остатка треонина в структуре педиоцинового бокса на антимикробную активность в отношении чувствительных к классическим PLB штаммов бактерий. В рамках работы были получены рекомбинантный аналог ацидоцина А, лишенный остатка треонина в педиоциновом боксе, а также мутантная форма авицина А (классического PLB), содержащая указанный остаток. Проведено тестирование антимикробной активности ацидоцина А, авицина А и их мутантных аналогов в отношении ряда бактериальных штаммов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00369.

1.11. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ 3D СТРУКТУРЫ α_7 -ХОЛИНОРЕЦЕПТОРА В КОМПЛЕКСЕ С НЕЙРОНАЛЬНОЙ МЕМБРАНОЙ И СЛАБЫМ ТОКСИНОМ WTX

Заиграев М.М.¹, Чугунов А.О.², Шенкарёв З.О.², Люкманова Е.Н.²

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
maximzaigraev@yandex.ru

Слабый токсин из *Naja kaouthia* (WTX) необратимо блокирует никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР). Эти рецепторы ответственны за холинергическую передачу сигналов в нервной системе и рассматриваются как перспективные фармакологические мишени. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор α_7 типа (α_7 -нАХР) - гомопентамер, состоящий из α_7 -субъединиц, - экспрессируется в мозге, иммунной системе и эпителии, где выполняет ряд важных физиологических функций, включая когнитивные и воспалительные процессы, а также гомеостаз эпителия.

Недавно была получена структура низкого разрешения комплекса модельного внеклеточного домена α_7 -нАХР с WTX методом криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) (Люкманова и др, неопубликованные данные). На этой основе в настоящей работе методами компьютерного моделирования была построена модель комплекса полноразмерного рецептора с WTX в мембранном окружении. При построении модели учитывались как данные ЯМР-спектроскопии о мембраноактивном сайте WTX, так и данные об остатках токсина, наиболее важных для его взаимодействия с рецептором.

Был проведён ансамблевый докинг WTX (код PDB: 2MJ0) в лиганд-связывающий участок модельного внеклеточного домена α_7 -нАХР (код PDB: 4HQP) с помощью программы ZDOCK. С помощью молекулярной динамики (МД) был получен набор конформаций в программе GROMACS. Фильтрация решений докинга учитывала наличие ключевых лиганд-рецепторных контактов (с помощью программы PLATINUM (Pyrkov et al., 2009)) и соответствие решений данным крио-ЭМ и ЯМР. Для итогового отобранного решения с помощью моделирования по гомологии в программе MODELLER была построена модель комплекса полноразмерного α_7 -нАХР с пятью молекулами WTX, погруженная в липидный бислой, близкий по составу к нейрональной клеточной мембране (POPC:POPE:CHOL = 2:1:1). По итогам расчёта МД комплекса эффективной длительностью >1500 нс был проведён анализ лиганд-рецепторных и лиганд-мембранных взаимодействий, что позволило уточнить экспериментальные данные и выявить новые остатки WTX, играющие важную роль при взаимодействии с α_7 -нАХР и мембраной.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-74-20163.

1.12. ВЛИЯНИЕ ГОРМОНОВ ЧЕЛОВЕКА НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Карташова А.К.¹, Панкратов Т.А.²

¹ГБОУ Школа № 1535, Москва

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ "Биотехнологии" РАН, Москва
tpankratov@gmail.com

Человеческий лизоцим - это фермент, являющийся одним из компонентов гуморального иммунитета человека. Он играет ключевую роль первичного барьера на пути бактериальных и грибных инвазий в пищеварительном тракте. Также лизоцим участвует в обеспечении относительной стерильности некоторых покровов и секретируемых организмом жидкостей: слезной жидкости, грудного молока и зон вокруг молочных желез. Лизоцим присутствует в том числе и на поверхности кожи человека. Глубоко изучен лизоцим, получаемый из белка куриных яиц. Поскольку человеческий лизоцим отличается от куриного лизоцима только одним аминокислотным остатком и небольшим количеством модификаций третичной структуры, в большинстве лабораторий именно яичный фермент получил наибольшее распространение как модель для биохимических исследований. Мы изучали воздействие на лизоцим ряда человеческих гормонов стероидного и пептидного происхождения: адреналина (А), норадреналина (НА), эстрадиола (Э) и натрийуретических пептидов ANP и BNP. Наша гипотеза заключалась в том, что гормоны, выделяемые при различных стрессовых состояниях у человека, действуя на молекулярном уровне, могут изменять активности ферментов. Мы испытывали воздействие на лизоцим гормонов четырех концентраций: физиологической (соответствующей норме в плазме крови человека), а также 10-, 50- и 100-кратно увеличенной. Также исследовали влияние на активность лизоцима температуры инкубации фермента с гормонами.

Фермент (20мг/мл, 20000 ЕА) растворяли в фосфатном буфере (0,0667 М; рН 6,25) и инкубировали вместе с гормонами (34, 37 и 40°C) в течение 2 часов. Далее обработанный гормонами фермент вносили в 2 мл суспензии клеток культуры *Micrococcus luteus* и снимали кривую снижения оптической плотности каждые 10 секунд (YenWay, 540 нм). Полученные коэффициенты аппроксимации линейной регрессии использовали для сравнения кинетики активности лизоцима в наших вариантах. Опыты показали, что А, Э и ANP усиливали активность фермента пропорционально возрастанию концентрации до 150% от контроля, тогда как НА и BNP не изменяли этой активности или снижали её. В то же время, увеличение температуры инкубации до 37°C усиливало эти эффекты, стимулируя также и усиление активности BNP. При температуре 40°C активность лизоцима снижалась во всех вариантах. Полученные результаты позволяют сделать вывод о значительном влиянии человеческих гормонов на активность лизоцима. Они могут играть роль в опосредованном контроле численности бактерий кожной и внутриполостной микрофлоры человека.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ №19-74-10071.

1.13. СТРУКТУРА БЕЛКОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ В БОЛЕЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОМ СОСТОЯНИИ: МОДЕЛЬ И СВОЙСТВА

Князева С.В.¹, Коноплева М.Н.¹, Манухов И.В.^{1,2}

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

²ГосНИИгенетика, Москва

knyazeva.sv@phystech.edu

Белки lux-оперона играют важную роль в области генной инженерии и для решения прикладных задач. Lux-биосенсоры, содержащие lux-гены, используются для решения проблем, связанных с экологией, определением механизмов токсического воздействия веществ на бактериальную клетку, тестирования разрабатываемых медицинских препаратов (доклиника) и др. [1].

В представленной работе проводится построение трехмерной структуры белков lux-оперона, по гомологии и без нее, где она невозможна. Планируется провести мутагенез целевых генов для повышения термостабильности белков: люциферазы (LuxAB) из *Photorhabdus luminescence*, а также редуктазы жирных кислот LuxC, ацилтрансферазы LuxD и ацил-протеин синтазы LuxE. К настоящему времени известны лишь структуры LuxAB [2] и LuxD (PDB 1THT) [3].

Для решения поставленных задач в начале был проведен поиск всех имеющихся последовательностей, кодирующих белки - LuxA и LuxB - двух субъединиц бактериальной люциферазы, а также LuxC, LuxD и LuxE - субъединиц редуктазы, восстанавливающей субстрат люциферазной реакции тетрадеканаль, и эволюционно близких к ним белков в общедоступных базах данных [4]. Путем анализа и сравнения результатов разных программ (PyMol Python, ConSurf и др., а также интернет-ресурсы: I-Tasser, RaptorX, Swiss-Model) был проведен филогенетический анализ семейства белков с поиском схожей топологии. Для всех белков было проведено моделирование по семейству белков и наглядно продемонстрированы эволюционно сохраняющиеся элементы последовательности. На основе моделирования были построены и наглядно представлены трехмерные структуры каждого белка с учетом мутаций для повышения термостабильности люциферазы. Таким образом предсказана трехмерная структура и свойства белков lux-оперона в более термостабильном состоянии.

Литература:

1. Манухов И.В. Структура lux-оперонов и механизмы регуляции типа "Quorum Sensing" у морских бактерий // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, ФГУП "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов" - М., 2011, 42 стр.
2. Tanner JJ, Miller MD, Wilson KS, Tu SC, Krause KL Structure of bacterial luciferase beta 2 homodimer: implications for flavin binding // Biochemistry - 1997, 36 p.665-72
3. Lawson DM, Derewenda U, Serre L, Ferri S, Sztittner R, Wei Y, Meighen EA, Derewenda ZS Structure of a myristoyl-ACP-specific thioesterase from *Vibrio harveyi* // Biochemistry
4. O'Leary N.A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation // Nucleic Acids Research. 2015. T. 44. № D1. C. D733-D745.

1.14. МОДЕЛИРОВАНИЕ NMDA-РЕЦЕПТОРА В ПОСТСИНАПТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ

Комолов А.С.^{1,2}, Тимофеев В.И.^{2,3}, Петренко Д.Е.²

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

²НИЦ "Курчатовский институт", Москва

³Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва
askomolov@mail.ru

Проводимость нервных импульсов в головном мозге человека может меняться в следствии изменения липидного состава постсинаптической мембраны.

NMDA-рецептор - это ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат (NMDA). Процессы, происходящие при активации данного рецептора, играют ключевую роль в синаптической пластичности, а значит в памяти и обучении. В данной работе построена полноатомная модель рецептора в постсинаптической мембране состоящая из фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина, фосфотидилсерина и фосфатидилинозитола, в определенном процентном составе.

Методом молекулярной динамики промоделирован комплекс N-метил-D-аспартат (NMDA)-рецептора с липидами постсинаптической мембраны. Проанализировано поведение составляющих системы во времени. Описаны взаимодействия NMDA-рецептора с липидами постсинаптической мембраны. Показано, что подобный комплекс может быть использован для исследования системы, содержащей NMDA-рецептор и липиды постсинаптической мембраны в различных концентрациях.

Работа выполнена при поддержке НИЦ "Курчатовский институт" (приказ №1363 от 25.06.2019).

1.15. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР НЕЙРОТОКСИНОВ AMS3, AMS9.3.1 ИЗ ЯДА *METRIDIDIUM* *SENILE* И ТВ94 ИЗ ЯДА *TIBELLUS OBLONGUS*

Корнилов Ф.Д.^{1,2}, Лушпа В.А.^{1,2}, Малеева Е.Е.¹, Владимиров А.А.¹,
Логашина Ю.А.¹, Андреев Я.А.¹, Арсеньев А.С.^{1,2}, Минеев К.С.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет), Долгопрудный
kornilov.fd@phystech.edu

Природные токсины - интересные объекты для изучения, так как они являются потенциальными лекарственными средствами, а также возможными молекулярными инструментами для исследования нервной системы. Между открытием молекулы токсина и её применением в практических целях лежит многочисленное количество исследований. Один из наиболее важных этапов изучения состоит в определении пространственной структуры молекулы, знание которой позволяет в дальнейшем производить рациональный дизайн и мутагенез.

В представленной работе методами спектроскопии ЯМР были определены пространственные структуры трёх токсинов пептидной природы: AMS3 (40 а.о.) и AMS9.3.1 (42 а.о.), двух гомологов из *Metridium senile*, и ТВ94 из *Tibellus oblongus* (39 а.о.). В ходе работы для всех токсинов в том числе были определены структурные особенности, такие как элементы вторичной структуры, порядок замыкания цистеинов, образования водородных связей и другие. Из анализа полученных данных следует, что пространственные структуры AMS3 и AMS9.3.1 состоят из трёхтяжевого антипараллельного β -листа и двух длинных петель, вторая петля является частично неструктурированной и подвижной. Конформации каждой из молекул стабилизированы тремя дисульфидными мостиками, а также 10 и 13 водородными связями, соответственно. При выравнивании пространственных структур проявляется высокая гомология за исключением участка второй петли. Структура ТВ94 представляет собой β -шпильку. Конформация молекулы стабилизирована 5 дисульфидными и 9 водородными связями. По данным ЯМР выявлено, что С-концевой участок (6 последних а.о.) неструктурирован и подвижен, тогда как вся остальная часть молекулы является стабильной.

1.16. РОЛЬ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ Arg45 И Tyr80 В СТРУКТУРЕ АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ Len с 3

Корунаева Е.Ю.^{1,2}, Финкина Е.И.², Мельникова Д.Н.², Овчинникова Т.В.²

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
l.korupaeva@inbox.ru

Липид-транспортирующие белки (Lipid Transfer Proteins или LTP) являются повсеместно присутствующими в растениях белками, которые связывают и переносят липидные молекулы. Многие из них являются аллергенами, вызывающими аллергические реакции разной степени тяжести. Изучение данных белков имеет высокую актуальность, поскольку пищевые и пылевые аллергены класса LTP входят в состав диагностических аллергопанелей и являются кандидатными компонентами разрабатываемых вакцин для проведения превентивной аллергенспецифичной иммунотерапии.

Известно, что аллергенность белков определяется их структурными и физико-химическими свойствами. В данной работе мы исследовали роль в структуре аллергена чечевицы Len с 3 двух консервативных для растительных LTP аминокислотных остатков - Arg45 и Tyr80. Для этого были получены рекомбинантные аналоги Len с 3 с заменой соответствующих аминокислот на аланин (R45A, Y80A и R45A/Y80A). Полученные рекомбинантные белки использовали в экспериментах по моделированию расщепления белков в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) человека. Белки последовательно расщепляли сначала пепсином в кислых условиях, а далее смесью трипсина и химотрипсина при основном pH. Отобранные алиquotы реакционных смесей анализировали с помощью SDS-электрофореза в ПААГ. Денситометрический анализ окрашенных гелей проводили, используя систему гель-документирования Gel Doc XR+ с программным обеспечением Image Lab. Было показано, что замена Arg45 и Tyr80 приводит к снижению скорости деградации Len с 3, что особенно выражено в случае двойного мутантного аналога R45A/Y80A. Полученные мутантные аналоги Len с 3 были также использованы в ELISA экспериментах по взаимодействию со специфичными антителами IgE из сывороток пациентов с аллергией. Для этого были использованы сыворотки пациентов в разведении 1:4, вторичные античеловеческие антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, и стабилизированный субстрат TMB для ELISA. Мы продемонстрировали, что замена Tyr80 не изменяет, а Arg45 немного снижает способность Len с 3 связывать IgE из сывороток пациентов с аллергией. В тоже время, иммунореактивность двойного мутантного аналога R45A/Y80A была снижена в значительной степени.

Таким образом, нами было показано, что Arg45 и Tyr80 являются важными аминокислотными остатками в структуре аллергена чечевицы Len с 3, по которым происходит расщепление данного белка в ЖКТ человека. Кроме того, данные аминокислоты, по-видимому, входят в состав В-клеточных эпитопов аллергена чечевицы.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 20-45-05002).

1.17. СТРУКТУРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ДИНАМИКА "ТРЕХПЕТЕЛЬНЫХ" БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С НИКОТИНОВЫМИ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

Кочаровская М.В.^{1,2}, Пармонов А.С.¹, Царёв А.В.^{1,2}, Кульбацкий Д.С.¹,
Шулепко М.А.¹, Люкманова Е.Н.^{1,2}, Шенкарёв З.О.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет), Долгопрудный
kocharovskaya.mv@phystech.edu

Белки семейства Lu6/uPAR или "трехпетельные" белки, гомологичные α -нейротоксинам змей, являются эндогенными модуляторами никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR) человека. Этот класс белков характеризуется наличием LU-домена с "трехпетельной" структурой, состоящей из β -структурного ядра, стабилизированного дисульфидными связями, и трех вытянутых петель. На сегодняшний день белки семейства Lu6/uPAR обнаружены у многих животных, включая иглокожих, рыб, амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих. Несмотря на гомологию структуры Lu6/uPAR белки демонстрируют большое функциональное разнообразие.

В работе исследована структура и динамика белка человека SLURP 1, секретируемого клетками эпителия, и водорастворимых LU-доменов GPI-заякоренных белков Lynx2 , Lypd6 и Lypd6b , представленных в мозге. Для исследования использовали рекомбинантные ^{15}N - и/или ^{13}C , ^{15}N -меченые аналоги белков, ренатурированные из цитоплазматических тел включения *E. coli*. Пространственная структура белков в растворе была определена методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии. Данные о релаксации ядер ^{15}N позволили охарактеризовать общую вращательную диффузию молекул, а также их внутримолекулярную динамику на двух временных диапазонах: пиконаносекунды и микро-миллисекунды. Кроме того, для белков SLURP 1, Lypd6 и Lypd6b наблюдались процессы конформационного обмена в диапазоне времен миллисекунды-секунды, связанные с *cis-trans* изомерией пептидных связей Xxx-Pro . Полученные результаты были сопоставлены с опубликованными данными о белках Lynx1 и SLURP 2 человека, и о α -нейротоксинах WTX и NTII. В рассматриваемых белках наблюдали две различные топологии β -структуры, а также различное расположение α -спиральных элементов. Различия в распределении зарядов и гидрофобных групп на поверхности белков указывают на значительные различия в их взаимодействии с nAChR. Согласно полученным данным, Lu6/uPAR белки демонстрируют высокую конформационную пластичность, которая, вероятно, необходима для адаптации трехпетельной структуры к оптимальному взаимодействию с различными типами nAChR.

Работа поддержана РНФ (№19-74-20176) и РФФИ (№20-04-00830, Lypd6 и Lypd6b).

1.18. ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО СЕМЕЙСТВА ПРОЛИН-БОГАТЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ПАРНОКОПЫТНЫХ

Кругликов Р.Н., Пантелеев П.В., Болосов И.А., Овчинникова Т.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
alarm14@gmail.com

Антимикробные пептиды (АМП) являются молекулярными факторами врожденного иммунитета большинства многоклеточных видов живых организмов, включая человека. Благодаря комплексному действию на различные мишени в бактериальных клетках они могут рассматриваться в качестве прототипов новых лекарственных средств для замены или дополнения к используемым в клинической практике антибиотикам. Пролин-богатые АМП - обширный класс защитных пептидов, ингибирующих трансляцию в бактериальных клетках посредством блокирования рибосомного туннеля и пептидил-трансферазного центра. Целью данной работы являлось изучение представителей нового семейства пролин-богатых АМП, обнаруженных у жвачных парнокопытных и состоящих из 28-30 аминокислотных остатков. Данное семейство характеризуется наличием уникального пролин/аргинин-богатого мотива, включающего также консервативный остаток гистидина и гидрофобного С-концевого фрагмента. Исследуемые природные пептиды, а также их мутантные аналоги были получены с использованием бактериальной системы экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3). Для каждого пептида были определены минимальные ингибирующие концентрации в отношении широкой панели бактериальных штаммов. Для установления возможного механизма действия была изучена способность пептидов ингибировать процесс трансляции с использованием бактериальной бесклеточной белок-синтезирующей системы. Кроме того, было изучено влияние пептидов на проницаемость бактериальных мембран при помощи колориметрического ONPG-теста. Потенциальное цитотоксическое действие изучаемых пептидов оценивалась с помощью гемолитического теста.

В результате работы нами были созданы плазмидные конструкции для гетерологической экспрессии трёх новых пролин-богатых антимикробных пептидов (из хирола *Beatragus hunteri*, оронго *Pantholops hodgsonii* и вилорогой антилопы *Antilocapra americana*) и целого ряда их модифицированных аналогов, включая укороченные фрагменты и соединения с единичными аминокислотными заменами. Целевые рекомбинантные пептиды получены в количестве не менее 1 мг каждого. Была показана выраженная активность пептидов дикого типа в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Показано, что цитоплазматическая мембрана не является основной мишенью для данного структурного семейства АМП. В минимальных ингибирующих рост бактерий концентрациях полноразмерные пептиды эффективно подавляют процесс биосинтеза белка у бактерий, причём ключевую роль в данном процессе играет С-концевой фрагмент пептидов. В результате проведенного рационального дизайна одного из пептидов был получен аналог, обладающий повышенной антибактериальной активностью и представляющий значительный интерес с точки зрения возможного практического применения в медицине.

1.19. ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ КЛЕТКИ РЕКОВЕРИНА И КАВЕОЛИНА-1 *IN VITRO*

Лебедева А.Ю.^{1,2}, Владимиров В.И.¹, Авдюшкин А.С.^{1,2},
Михайлова И.В.^{1,2}, Казаков А.С.³, Пермяков С.Е.³, Зерний Е.Ю.⁴,
Зинченко Д.В.¹

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

²Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

³Институт биологического приборостроения РАН, Пушкино

⁴Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ
имени М.В. Ломоносова, Москва

ay_lebedeva@mail.ru

Функционирование зрительной и нервной систем регулируется благодаря изменению концентрации внутриклеточного кальция, который активируют различные сигнальные каскады, приводящие к конкретным физиологическим эффектам. Разнообразие этих событий является результатом действия белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров (НКС). Са²⁺-связывающий белок рековерин относится к семейству НКС, а нарушение экспрессии или функционирования белков данного семейства приводит к развитию нейродегенеративных и нейроофтальмологических заболеваний. Известно, что рековерин может взаимодействовать с трансмембранным белком кавеолин-1, который обладает регуляторной активностью в отношении различных сигнальных партнеров в том числе к рековерину, как было показано ранее. Окислительный стресс является триггером, активирующим фосфорилирование кавеолина-1 по Tyr14 и приводит к окислению рековерина, что наиболее проявляется в димеризации белка. Таким образом, целью работы было установление влияния условий окислительного стресса на взаимодействие изучаемых белков.

В ходе эксперимента были получены окисленные формы человеческого и бычьего рековерина, а также мимик фосфорилированного кавеолина-1 Y-14-E, в котором остаток тирозина заменен на остаток глутатионовой кислоты (кавеолин-E). Преципитация на аффинном сорбенте нативного и окисленного (димер) бычьего и человеческого рековерина с N-концевыми фрагментами кавеолина-1 и кавеолина-E, показала наличие Са²⁺-зависимого взаимодействия. Любая форма рековерина связывается с любой формой кавеолина-1 лучше в отсутствие ионов Са²⁺, что указывает на Са²⁺ чувствительность процесса. Кинетические константы взаимодействия, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса, продемонстрировали, что нативная и окисленная формы бычьего рековерина проявляют лучшее взаимодействие с кавеолином-1, чем с кавеолином-E. Так же константы показывают более выраженное взаимодействие кавеолина-1 и кавеолина-E с окисленной формой рековерина, чем с нативной. Результаты данной работы свидетельствуют о том, что при окислительном стрессе меняется специфика взаимодействия белков, что может быть связано, с окислительно-восстановительными механизмами регуляции зрительной системы.

1.20. САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ БОЛЕВОГО РЕЦЕПТОРА TRPV1 ВЫЯВИЛ СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ТЕПЛОВУЮ И КАПСАИЦИН-ОПОСРЕДОВАННУЮ АКТИВАЦИЮ КАНАЛА

Лубова К.И.¹, Чугунов А.О.¹, Андреев Я.А.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва
lubova.ksenia@gmail.com

TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) является одним из ключевых белков, участвующих в развитии гипералгезии, ассоциированной с повреждением тканей организма. На сегодняшний день лечение болевых синдромов, вызванных дисфункцией TRPV1, всё ещё остается серьёзной терапевтической проблемой, что делает понимание механизмов активации, десенситизации и регуляции TRPV1 актуальной задачей. Мы обнаружили пять новых аминокислотных остатков TRPV1, участвующих в тепловой и капсаицин-опосредованной активации канала. Известно, что ток ионов через пору TRPV1 регулируется верхними и нижним воротами. Молекулярно-динамические расчёты показали, что самое узкое место в верхних воротах сформировано остатком Gly643. Мы продемонстрировали, что замена даже следующим наименьшим остатком аланина в этой позиции ослабляет активацию канала. С другой стороны, наш анализ показал, что "узким местом" нижних ворот являются P679 и A680 - двойная мутация I679A + A680G привела к фенотипу "всегда открытый" канал. Далее, наше моделирование показало, что движения Asn676, расположенного в полости между воротами, стабилизируют закрытое и открытое состояния канала. Дальнейшие вычисления предложили замену Asn на Ser, чтобы оказать наименьшее влияние на структуру канала. Однако даже такой мутант оказался нефункциональным, что указывает на чрезвычайную важность Asn676 для функциональности TRPV1. Наконец, мы обнаружили, что движения цитозольного домена TRP также могут влиять на проводимость поры. *In silico* анализ коррелированных движений поры и примыкающего к поре TRP домена показал, что остаток Lys688 в этом домене образует ионный мостик, фиксирующий движения всего TRP-домена. Действительно, замена Lys на небольшой и гибкий Gly привела к значительному увеличению чувствительности канала, в то время как замена Lys на жесткий Pro имела противоположный эффект. Таким образом, наши результаты дают лучшее понимание молекулярной механики, лежащей в основе функционирования TRPV1.

Проект поддержан РФФИ (грант №16-15-00167).

1.21. ПОЛУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ФАКТОРА РЕАКТИВАЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ RpfB *M. TUBERCULOSIS* В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Макарова А.О.¹, Кузницын Р.А.², Лапенкова М.Б.³, Владимирский М.А.³,
Грановский И.Э.²

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

²ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушкино

³Национальный медицинский исследовательский центр
фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний, Москва
anna.makarova0@yandex.ru

Примерно треть населения планеты подвержена латентной инфекции *Mycobacterium tuberculosis*. При этом микобактерии находятся в так называемом дормантном состоянии, которое характеризуется пониженной метаболической активностью, неспособностью к росту на плотных питательных средах и резистентностью к антибиотикам. Нередко (2-23% случаев) при латентной инфекции происходит реактивация, т.е. переход возбудителя в активное состояние, обусловленный различными факторами, в том числе активностью белков Rpf-семейства. Rpf-факторы обладают гидролазной активностью в отношении пептидогликана микобактерий. Белок RpfB предположительно вносит наибольший вклад в реактивацию, что представляет интерес для диагностики и возможного лечения латентного туберкулёза. Структурная организация RpfB включает каталитический домен, G5-домен, участвующий в адгезии, и три DUF-домена, функция которых на данный момент неизвестна.

В ранних экспериментах было показано, что при экспрессии в клетках *E. coli* белок RpfB нарабатывается преимущественно в тельцах включения. В данной работе был получен химерный белок SlyD-RpfB в растворимой форме, содержащий на N-конце шаперон SlyD с His₆-меткой. Очистку белка осуществляли методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-сефарозе с последующим отщеплением SlyD TEV-протеазой.

Активность очищенного из *E. coli* препарата RpfB проверили на дормантных клетках *M. tuberculosis*. Для этого был использован подход, основанный на способности микобактериофага D29 реплицироваться исключительно в делящихся клетках микобактерий. Дормантные формы микобактерий инкубировали с бактериофагом как в присутствии RpfB, так и без него. Размножение микобактериофага оценивали методом ПЦР "в реальном времени". В результате было показано, что полученный препарат белка RpfB способен выводить микобактерии из дормантного состояния.

Таким образом, предложенный нами подход пригоден для получения функционально активного фактора RpfB.

1.22. ВЛИЯНИЕ БЕЛКА Hmo1 НА СТРУКТУРУ НУКЛЕОСОМ IN VITRO

Малинина Д.К.¹, Сивкина А.Л.¹, Студитский В.М.^{1,2}, Феофанов А.В.^{1,3}

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, 19111-2497, USA

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва, Россия

daria99malinina@gmail.com

Белки HMGB (high mobility group B) - группа ядерных негистоновых белков, для которой характерно наличие уникального ДНК-связывающего домена. Hmo1 - один из HMGB белков *Saccharomyces cerevisiae*, содержащий два глобулярных ДНК-связывающих домена (А и В) и положительно заряженный С-концевой участок. Hmo1 принимает участие в таких важных процессах, как транскрипция и репликация ДНК. Ранее было показано, что В-домен белка Hmo1 высоко гомологичен HMGB-домену белка Nhr6 [1]. Так как Nhr6 необходим для работы АТФ-независимого ремоделирующего комплекса дрожжей FACT (facilitates chromatin transcription) [2], была поставлена задача исследовать взаимодействие Hmo1 с нуклеосомами, его влияние на структуру нуклеосом и их реорганизацию белковым комплексом FACT. Анализ комплексов проводили методами EMSA и spFRET микроскопии в растворе. Обнаружено, что образование комплекса нуклеосом с Hmo1 приводит к увеличению расстояния между витками ДНК по сравнению с интактными нуклеосомами. Полученные результаты позволяют заключить, что Hmo1, как и белок Nhr6, способствует разворачиванию нуклеосом белковым комплексом FACT, но нарушает структуру нуклеосом в меньшей степени.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда (грант № 19-74-30003).

Литература:

1. Козлова А.Л., Валиева М.Е., Малоченко Н.В., Студитский В.М. HMGB-белки как ДНК-шапероны, модулирующие активность хроматина// Молекулярная биология. 2018. Т. 52. № 5. С. 1-26.
2. Valieva M.E. et al. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // Nat. Struct. Mol. Biol. 2016. V. 23. No 12. P. 1111-1116.

1.23. НАЛИЧИЕ ВНУТРЕННЕЙ НЕУПОРЯДОЧЕННОСТИ В БЕЛКАХ, СВЯЗАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ

Мануйлов В.Д.¹, Ильинский Н.С.¹, Уверский В.Н.^{1,2}

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

²Морсанский медицинский колледж, Университет Южной Флориды, 33612 Тампа, США

manujlov.vd@phystech.edu

Внутренне неупорядоченные белки (ВНБ) играют важную роль при образовании токсичных агрегатов белков. Актуально выяснить, насколько внутренняя неупорядоченность представлена в белках, связанных со старением, в каких клеточных процессах она наиболее выражена. Ранее подобный анализ был проведен для белков, вовлеченных в болезнь Альцгеймера, лобно-височную долевою дегенерацию, боковой амиотрофический склероз.

В список белков, выбранных для анализа в этой работе, были включены 158 белка. Из них 42 белка одновременно присутствуют в базах данных GenAge и Gene Ontology, а также классифицированы алгоритмами машинного обучения как относящиеся к старению. Также в список были добавлены 117 белков, выбранные на основе обзорной статьи по протеомике и старению. Для полученной выборки белков были проанализированы показатели разупорядоченности - предсказанный процент внутренней неупорядоченности (ППВН, на основе 6 алгоритмов), MobiDB, MoRF. В результате оказалось, что из выбранных 158 белков 30.4% лежат в промежутке значений ППВН от 0 до 10%, 38.6% белков - от 10 до 30%, и 31% белков - более 30%. Таким образом, около 70% рассматриваемых белков являются частично или полностью ВНБ. Этот результат был также подтвержден с помощью другого вычислительного метода, использующего заряд и гидрофобность белка. Анализ также показал, что белки, более связанные со старением, имеют среднее значение внутренней неупорядоченности в 1.5 раза выше, чем белки, менее связанные со старением. Кроме того, была проведена классификация этих белков по типу 'фермент/не фермент'. Анализ показал, что для ферментов, участвующих в старении, более характерно наличие четкой структуры: из них 50.9% принадлежит промежутку значений ППВН от 0 до 10%, 43.4% - промежутку от 10 до 30% и 5.7 % ферментов - более 30%.

Полученные данные свидетельствуют, что внутренняя неупорядоченность характерна для белков, связанных со старением. Знание уровня внутренней неупорядоченности рассматриваемых белков позволит углубить понимание механизмов старения и наметить пути его замедления.

1.24. ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ АНАЛОГОВ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ЧЕЧЕВИЦЫ Lc-LTP2

Никитина М.А.^{1,2}, Мельникова Д.Н.^{1,2}, Овчинникова Т.В.^{1,2}

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
d_n_m_@mail.ru

На сегодняшний день, актуальной задачей фундаментальной и прикладной медицины является поиск и создание новых систем доставки лекарственных средств, направленных на повышение терапевтической эффективности, переносимости и безопасности лекарственной терапии. Способность связывать широкий спектр лигандов и высокая стабильность растительных липид-транспортующих белков (LTP) могут предложить много неисследованных возможностей для такой задачи. Lc-LTP2 чечевицы был выбран в качестве модельного белка для исследования механизма его взаимодействия с различными природными и имеющими косметическое и/или фармацевтическое применение веществами.

Целью данной работы было получение мутантных аналогов Lc-LTP2 с точечными заменами Y17W и Y80W для исследования механизма связывания данного белка с лигандами. Схема введения мутаций включала полноразмерную амплификацию базовой экспрессирующей конструкции pET-His8-TrxL-Lc-LTP2 с помощью инвертированной ПЦР с использованием мутагенизирующих праймеров. Последующую рециркуляризацию плазмиды осуществляли методом RecA-независимой рекомбинации *in vivo* (RAIR). На основе полученных плазмид и штамма *E.coli* BL-21 (DE3) была разработана система для гетерологической экспрессии мутантных аналогов Lc-LTP2. Была проведена оптимизация состава питательной среды, температуры и других условий экспрессии, что позволило достичь удовлетворительного выхода гибридных белков. Целевые белки были получены с использованием аффинной хроматографии, реакции расщепления гибридных белков бромцианом, повторной аффинной хроматографии и ОФ-ВЭЖХ. Таким образом, разработанная методика выделения позволила получить мутантные аналоги Lc-LTP2 (Y17W) и Lc-LTP2 (Y80W) с выходом не менее 3 мг/л культуры и 3,6 мг/л культуры, соответственно.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00150)

1.25. МУТАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ ЦИТОХРОМА *c* С ЗАМЕНАМИ, ИМИТИРУЮЩИМИ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ОСТАТКОВ Тгг: ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКА

Никонова Д.Д.^{1,2}, Беляков В.В.³, Пахомов Е.А.³, Гусев И.Д.¹, Черткова Р.В.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

³ГБОУ школа № 1543, Москва

tyt0@list.ru

Цитохром *c* - мультифункциональный белок, который служит переносчиком электронов между комплексами III и IV электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий, а также инициатором запуска клеточного апоптоза через активацию каспазного каскада. Помимо этого, цитохром *c* обладает рядом неканонических функций, таких как антиоксидантная, пероксидазоподобная, может участвовать в регуляции процессов выхода ионов Ca^{2+} в цитоплазму, репарации ДНК и реконструкции нуклеосом. Переключение функций цитохрома *c* тонко регулируется различными посттрансляционными модификациями (ПТМ) белка. Одной из важнейших ПТМ цитохрома *c* как в состоянии гомеостаза, так и в состоянии стресса, является фосфорилирование. Наиболее частыми мишенями оказываются остатки Тгг, расположенные в позициях 48 и 97, находящиеся на поверхности белковой глобулы. Изучение влияния фосфорилирования остатков на функционирование цитохрома *c* приобретает особый смысл, поскольку дисфункция митохондрий вызывает множество различных патологий, к примеру, ишемию и рак. Учитывая, в какой степени митохондриальная активность зависит от работы цитохрома *c*, можно ожидать, что исследования в этой области могут открыть новые подходы к терапии многих заболеваний.

В настоящей работе для изучения структурных и функциональных изменений, вызванных фосфорилированием остатков Тгг цитохрома *c* была сконструирована и получена панель мутантных вариантов, в которых остатки Тгг в положениях 48, 67, 74, 97 были заменены на нейтральные или отрицательно заряженные остатки, имитирующие избирательное фосфорилирование. Введение мутаций в ген лошадиного цитохрома *c* проводили методом сайт-направленного мутагенеза. В качестве матрицы использовали плазмидный вектор pVPCYC1, содержащий ген цитохрома *c* и ген гем-лигазы. Экспрессию мутантных генов проводили в клетках *E.coli*. Выделение белка осуществляли согласно двухстадийной схеме, включающей жидкостную хроматографию на катионообменном сорбенте MP HS (Bio-Rad, США) и на гидроксипатите. Качественную и количественную оценку содержания цитохрома *c* в полученных фракциях проводили спектрофотометрически и электрофоретическим анализом в SDS-PAAG.

1.26. КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ И КОМПЛЕКСОВ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В ИЗ *SERRATIA PROTEAMACULANS*

Петренко Д.Е.¹, Тимофеев В.И.^{1,2}, Михайлова А.Г.³, Ракитина Т.В.^{1,3}

¹НИИ "Курчатовский институт", Москва

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

dmitry.e.petrenko@gmail.com

Олигопептидазы В (OpV) - это трипсиноподобные сериновые пептидазы, относящиеся к семейству пролилолигопептидаз. Олигопептидазы В обнаружены в бактериях, протозойных паразитах и растениях. Известно, что они являются факторами патогенеза при паразитарных и некоторых бактериальных инфекциях и являются потенциальными мишенями для разработки терапевтических средств. Поиск специфических ингибиторов OpV для последующего дизайна лекарственных средств, в том числе антипаразитарных препаратов, требовал знания пространственной структуры данного фермента.

В 2019 г. была получена первая пространственная структура бактериальной OpV из *Serratia Proteamaculans* (PSP), которая должна была прояснить, каким образом происходит активация бактериальных ферментов данного класса. Однако анализ структуры показал, что фермент в кристалле имеет каталитически неактивную конформацию, в которой остатки активного центра разобщены между собой.

Цель данной работы - получение и рентгеноструктурный анализ кристаллов фермента, находящегося на разных стадиях каталитической активации. Для этого осуществлен подбор условий кристаллизации мутантных форм PSP, а также комплексов PSP с рядом лигандов, проведена наработка кристаллов и их рентгеноструктурный анализ.

Предварительный анализ рентгеноструктурных данных показал, что во всех случаях кристаллы принадлежат одной и той же пространственной группе, что указывает на то, что в отличие от протозойных аналогов каталитическая активация PSP происходит без значительных изменений взаимного расположения доменов.

Работа выполнена при поддержке РЦ МКБ НИИ Курчатовский институт, вычислительные исследования - при частичной финансовой поддержке НИИ "Курчатовский институт" (приказ №1363 от 25.06.2019).

1.27. ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССА НОНСЕНС-ОПОСРЕДОВАННОЙ ДЕГРАДАЦИИ РНК (NMD) НА ТРАНСКРИПЦИЮ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК У РАСТЕНИЙ

Петров Е.А.^{1,2}, Фесенко И.А.², Князев А.Н.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
egor.vyatka@mail.ru

Эукариотическая система нонсенс-опосредованной деградации РНК (nonsense-mediated mRNA decay) контролирует качество мРНК, деградируя транскрипты, содержащие преждевременный стоп кодон (premature stop codons, РТС). Предполагается, что таким образом система NMD может предотвращать синтез абберантных белков, которые могут оказаться опасными для клетки. Однако оказалось, что около 10% эукариотических транскриптов регулируются системой NMD, позволяя клетке тонко подстраивать экспрессию генов под внешние воздействия. При этом, мало известно о регуляции системой NMD длинных некодирующих РНК (длнкРНК), которые содержат короткие открытые рамки считывания, способные кодировать пептиды.

В своей работе мы впервые исследовали влияние системы NMD на регуляцию транскрипции длнкРНК у растений. Для проведения экспериментов были использованы нокаутные по гену SMG1, одного из ключевых компонентов системы NMD у животных и большинства растений, линии мха *Physcomitrium patens*. Линии были полученные нами из всемирной коллекции Moss Stock Center. Для анализа были взяты длнкРНК, уровень транскрипции которых изменялся в нокаутных линиях, включая те, которые кодируют пептиды. Уровень транскрипции оценили при помощи количественного ОТ-ПЦР-анализа в режиме реального времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR GreenI. В качестве референсного гена использовали АСТ (актин). Нормализацию осуществляли на уровень экспрессии исследуемых генов в растениях дикого типа. Мы установили, что у нокаутных smg1 и smg2 линий мха наблюдается повышение уровня транскрипции нескольких длнкРНК. Наиболее интенсивно растет транскрипция длнкРНК, кодирующей 57-аа микробелок PSEP3.

Наши результаты указывают на то, что у растений транскрипция длинных некодирующих РНК, может контролироваться системой нонсенс-опосредованной деградации РНК. Выключение данной системы может приводит к увеличению количества продуктов трансляции длнкРНК.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00938.

1.28. КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И С-ТЕРМИНАЛЬНЫЙ ДОМЕН ГЕМОЛИЗИНА II *BACILLUS CEREUS*

Петров Е.Л.^{1,2}, Руденко Н.В.^{1,2}, Каратовская А.П.², Замятина А.В.^{1,2}, Сиунов А.В.³, Андреева-Ковалевская Ж.И.³, Нагель А.С.³, Бровко Ф.А.^{1,2}, Солохин А.С.³

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

³ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”,

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина

РАН, Пушкино

Zenia20ii@mail.ru

Основным фактором патогенности бактерии *Bacillus cereus*, являющейся одной из наиболее распространенных причин внутрибольничных инфекций, является порообразующий токсин гемолизин II (HlyII), способный разрушать мембраны клеток хозяина. Гемолизин II *B. cereus* отличается от других гемолизин бактерий наличием С-концевого домена HlyII. Известно, что в отсутствии HlyIICTD гемолитическая активность HlyII снижается в значительной степени. Показано что HlyIICTD способен независимо связываться с эритроцитами.

В данной работе исследовано взаимодействие HlyIICTD с клетками иммунной системы. На предмет взаимодействия с HlyIICTD были проанализированы следующие клеточные линии: Jurkat (иммortalизованная линия Т-лимфоцитов человека), J774 (моноциты мыши, макрофагальная линия), DAUDI (линия клеток афроамериканской лимфомы Беркитта человека), Raji (лимфобластоидная линия лимфомы Беркитта человека). Большинство клеток линий Jurkat и J774 в присутствии С-терминального домена HlyII утрачивали основные морфологические признаки живых клеток, (например, способность к адгезии) вплоть до полной гибели, что носило концентрационную зависимость от добавляемого HlyIICTD. При этом инкубация В-клеточных линий DAUDI и Raji с HlyIICTD не приводила к каким-либо изменениям клеточных культур.

Количественную характеристику взаимодействия HlyIICTD с макрофагами и Т-клетками проводили с использованием биотинилированного препарата HlyIICTD. Реакцию проявляли стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена. В координатах Скэтчарда были определены константы аффинности HlyIICTD с исследуемыми клеточными линиями. Установлено: для клеток J774 константа аффинности составила $7,8 \times 10^6$, для Jurkat - $15,8 \times 10^6$. Эффективность взаимодействия HlyIICTD с Т-лимфоцитами сравнима с таковой по отношению к эритроцитам ($5,63 \times 10^6 \cdot \text{M}^{-1}$). В случае Т-лимфоцитов значительно выше.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-04-00592.

1.29. ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ ХИМЕРЫ mEos3.2-MVHC И MVHC-mEos3.2 - ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ

Прудникова Д.А.^{1,2}, Чудецкий И.С.¹, Кузьменков А.И.¹, Василевский А.А.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
pda.prudnikova@gmail.com

Потенциал-зависимые кальциевые каналы (Ca_v) отвечают за ток ионов Ca^{2+} в ответ на деполяризацию мембраны, что в свою очередь инициирует множество клеточных процессов, таких как секреция нейромедиатора, передача нервного импульса и экспрессия генов в клетках и тканях. Локализация и изучение динамики этих трансмембранных белков до сих пор остается важной и актуальной проблемой современной физиологии и сигнальной биологии.

Традиционными молекулярными инструментами для изучения ионных каналов, в том числе Ca_v , выступают токсины из яда различных организмов. С их помощью осуществлялись работы по поиску, выделению и физиологической характеристике новых ионных каналов. Модификация подобных токсинов флуоресцентными или изотопными метками позволяет создавать эффективные зонды, для детекции и визуализации этих трансмембранных белков.

Ранее мы разработали новый подход по созданию гибридных полипептидов, состоящих из флуоресцентного белка и токсина, действующего на тот или иной ионный канал. В данной работе мы решили придерживаться данной стратегии и разработать флуоресцентные молекулярные зонды для Ca_v . В качестве токсина мы выбрали один из компонентов яда морской улитки *Conus magus* - ω -конотоксин MVHC, который является блокатором кальциевых каналов N- и P/Q-типа. В качестве флуоресцентной метки мы решили использовать флуоресцентный белок mEos3.2, который относится к классу фотопереключаемых флуоресцентных белков.

Химерные молекулы с N- и C-концевым расположением флуоресцентного белка (mEos3.2-MVHC и MVHC-mEos3.2) были получены с использованием рекомбинантной системы экспрессии на базе *Escherichia coli* BL21. Для этого мы трансформировали бактериальные клетки методом "теплового шока" плазмидой, несущей соответствующие гены. Выделение гибридных белков проводилось с помощью аффинной хроматографии, а гель-фильтрация применялась для финальной очистки. В результате нами были получены два новых флуоресцентных зонда, которые в дальнейшем будут использоваться для визуализации Ca_v .

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-34-70031).

1.30. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА НОВОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА КАПИТЕЛЛАЦИНА ИЗ ПОЛИХЕТЫ *CAPITELLA TELETA*

Резникова О.В.¹, Царёв А.В.², Пантелеев П.В.², Овчинникова Т.В.²,
Шенкарёв З.О.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, Москва
olesya-r@list.ru

Антимикробные пептиды (АМП) - группа структурно-разнообразных молекул, играющих важную роль в системе врожденного иммунитета. Основным механизмом действия АМП является нарушение целостности мембран патогенных организмов. В настоящее время активно развивается область применения АМП как метода борьбы с микроорганизмами, обладающими резистентностью к существующим антибиотикам. Наиболее активными и стабильными в физиологических условиях являются АМП со структурой β -шпильки, стабилизированной дисульфидными связями. В работе изучали пространственную структуру нового АМП капителлацина из полихеты *Capitella teleta*.

Рекомбинантный аналог капителлацина получен в клетках *E. coli* в виде слитной конструкции с тиоредоксином А. Слитный белок очищали с помощью Ni^{2+} -аффинной хроматографии, гидролизовали CNBr, а затем целевой пептид очищали на ВЭЖХ с обращенной фазой. Структуру капителлацина исследовали методом ^1H ЯМР-спектроскопии в воде при pH 5.2 и 30°C. По результатам анализа 2D ЯМР-спектров обнаружены две формы пептида в воде, возникающие из-за *цис-транс* изомерии пептидной связи Ser1-Pro2. Относительная заселенность двух конформеров составила 1:5, а процесс обмена между ними имеет характерное время более 200 мс. По данным ЯМР рассчитана пространственная структура основной формы капителлацина (*транс*-Ser1-Pro2). Установлено, что пептид имеет структуру β -шпильки, стабилизированной двумя дисульфидными и шестью водородными связями. Проведено сравнение структуры капителлацина с другими АМП, имеющими структуру β -шпильки, такими как ареницин-2, альвинеллацин, протегрин-1 и тахиплезин-1. Анализ гидрофобного и электростатического потенциала на поверхности пептида не выявил наличия выраженных амфифильных свойств у молекулы капителлацина в воде. Однако ЯМР исследование в мембраномоделирующем окружении показало, что пептид имеет сродство к мицеллам додецилфосфохолина (DPC), встраивается в мицеллу, сохраняя при этом конформацию β -шпильки.

ЯМР-исследование поддержано грантом РФФИ №19-74-30014.

1.31. НЕТИПИЧНЫЕ МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ОКСИДАЗЫ АСКОМИЦЕТОВ

Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Мясоедова Н.М., Шебанова А.Д., Гайдина А.С., Коломыцева М.П.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
РАН, Пушкино
zhanna.renfeld@yandex.ru

Грибные лакказы (КФ 1.10.3.2, "голубые" оксидазы) - одна из групп медьсодержащих оксидаз (МСО), которые являются внеклеточными ферментами и способны окислять широкий спектр ароматических фенольных соединений, различающихся по строению и свойствам, из-за чего нашли применение во многих отраслях промышленности (в пищевой, текстильной, косметической, целлюлозно-бумажной, фармацевтической и др.), а также для детоксикации ксенобиотиков и создания биосенсоров, для синтеза и модификации широкого спектра соединений. К сожалению, использование широко распространенных в природе базидиальных лакказ невозможно для ряда клеточных биотехнологий, осуществляемых в цитоплазме клетки, значения рН которой находятся в нейтральной области, так как большинство лакказ обладают максимальной активностью в кислых условиях среды. В связи с чем особый интерес вызывают малоизученные алкалофильные грибные лакказы, продуцируемые аскомицетами.

В ходе скрининга аскомицетов, продуцирующих оксидазы наиболее активные при нейтрально-щелочном рН, для дальнейших исследований были отобраны два гриба *Myrothecium roridum* и *Curvularia geniculata*. Оптимизация условий культивирования с использованием злаковых и бобовых культур в качестве ростовых субстратов, а также применение типичных лакказных индукторов, позволила получить достаточный объем культуральных жидкостей для выделения нетипичных оксидаз. Оксидазы были выделены в гомогенном виде и охарактеризованы их молекулярные, физико-химические и кинетические свойства. Подтверждено их оптимальное функционирование в нейтрально-щелочных условиях среды со всеми использованными лакказными субстратами. Оксидазы культуральных жидкостей исследованных грибов также показали способность окислять фенилпропаноиды (феруловую кислоту и кониферилловый спирт) с образованием соединений полимерной природы, имеющих потенциал применения в фармацевтике. Получены первые нуклеотидные последовательности генов аскомицетов *M. roridum* и *C. geniculata*, кодирующих оксидазы, определено их филогенетическое родство.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта РФФИ-Аспиранты № 20-34-90059.

1.32. ИЗУЧЕНИЕ АНАЛОГОВ BRICHOS-АССОЦИИРОВАННОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА КАПИТЕЛЛАЦИНА ИЗ МОРСКОЙ ПОЛИХЕТЫ *CAPITELLA TELETA*

Сафронова В.Н., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
saf-victorianik@yandex.ru

В связи со стремительным ростом резистентности патогенных микроорганизмов к традиционным антибиотикам, а также появлением новых штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, существует необходимость в разработке новых антибактериальных агентов с принципиально отличающимся механизмом действия от существующих противоинфекционных средств. Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) - важные компоненты иммунной системы многоклеточных организмов, обеспечивающие их защиту в ответ на проникновение патогенных агентов. АМП играют ключевую роль в защите беспозвоночных организмов ввиду отсутствия у них системы адаптивного иммунитета. Морские полихеты - эволюционно древняя группа беспозвоночных, которая является перспективным и сравнительно малоизученным источником новых биологически активных молекул. Ранее мы обнаружили и получили рекомбинантный аналог природного β -спилечного АМП из полихеты *Capitella teleta*, названного капителлацином (СТ). Стоит отметить, что капителлацин образуется из более крупного белка-предшественника, содержащего так называемый BRICHOS-домен. Ряд аналогов капителлацина (СТ1 - СТ7) как потенциальных антибактериальных агентов был получен с использованием системы гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3). Полученные пептиды проявляют сопоставимую антимикробную активность *in vitro* по отношению к условно-патогенным грамположительным и грамотрицательным бактериям. Было установлено, что капителлацины не оказывают повреждающего действия на целостность цитоплазматической мембраны и мембраны эукариотических клеток, в то время как пептид СТ7 проявляет выраженный мембранолитический эффект и вызывает значительный лизис эритроцитов. Полученные соединения, за исключением СТ3, в концентрациях, подавляющих планктонный рост культуры *P. aeruginosa*, практически полностью ингибируют процесс формирования биопленки, что свидетельствует о высокой эффективности их антибактериального действия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-54-80026.

1.33. ПРОТЕАЗА S ИЗ *PHOTORHABDUS LUMINESCENS* ОБЛАДАЕТ БАКТЕРИОТОКСИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ

Светлова А.О., Карасева М.А., Демидюк И.В.

Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва
svetlovaanastasia@yandex.ru

Протеаза S (PrtS) из инсектопатогенной бактерии *Photorhabdus luminescens*, относится к семейству протеализинподобных протеаз (ППП). Показано, что PrtS подавляет иммунный ответ и вызывает меланизацию у насекомых, и, таким образом, вероятно, участвует в патогенезе, но прямых доказательств этого нет. В то же время информация, полученная для ППП из других бактерий, позволяет предположить, что ферменты данной группы являются антибактериальными токсинами, потенциальными эффекторами неустоановленной системы межбактериальной конкуренции. Однако и эта гипотеза базируется исключительно на косвенных данных.

В рамках исследований участия PrtS в бактериальном патогенезе насекомых нами была предпринята попытка создания рекомбинантного продуцента фермента с использованием клеток *E. coli* и коммерческой экспрессионной системы на основе РНК-полимеразы бактериофага T7. Использование штамма *E. coli* BL-21(DE3) и вектора pET23 позволило получить только продуцент протеазы, инактивированной мутацией Glu168-Ala в каталитическом центре, что привело к предположению о токсичности интактного фермента для бактериальных клеток. Учитывая это, для продукции активного фермента мы использовали сочетание штамма *E. coli* T7 Express *lysY/lq* (вариант BL-21, предназначенный для получения токсичных белков) и плазмиды pET-DUET-1. Данный вектор дополнительно несет ген *LacI*, а T7-промотор находится под управлением оператора лактозного оперона, что обеспечивает более строгий контроль экспрессии целевого гена. Применение этого подхода позволило успешно культивировать клетки *E. coli*, несущие ген активной PrtS до индукции экспрессии. После добавления индуктора (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид в концентрации 0,5 mM) активный по гидролизу пептидного субстрата 2-аминобензоил-Arg-Ser-Val-Ile-Lys(2,4-динитрофенила) целевой белок начинал накапливаться в клетках (его удавалось детектировать при помощи SDS-электрофореза), однако через 1 ч накопление белка прекращалось, и клетки гибли в течение 2 ч.

Таким образом, на примере PrtS нами впервые продемонстрировано, что протеализинподобная протеаза может обладать бактериотоксическим действием, и оно определяется протеолитической активностью фермента. Этот результат свидетельствует в пользу гипотезы об участии ППП в межбактериальной конкуренции.

1.34. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДАМИ СТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ

Соловьева А.Ю.¹, Хренова М.Г.¹, Тихонова Т.В.¹, Попов В.О.^{1,2}

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²НИЦ "Курчатовский институт", Москва

nastya.soloveva1@yandex.ru

Тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) катализирует реакцию расщепления тиоцианата до цианата и элементарной серы с переносом двух электронов на внешний акцептор. TcDH содержит уникальный активный центр с тремя ионами меди, который не имеет аналогов среди других медь-содержащих белков. Однако до сих пор не были получены структуры комплексов TcDH с субстратом или продуктом реакции, что позволило бы экспериментально установить способ связывания субстрата в активном центре фермента и проверить сформулированный с применением комбинированного метода квантовой и молекулярной механики (QM/MM) механизм реакции. Для характеристики положения субстрата в активном центре фермента может быть использовано положение ингибиторов, которые являются аналогами субстрата, переходного состояния, продукта или лигандами ионов меди. На этапе скрининга эффективность потенциальных ингибиторов оценивалась величиной IC₅₀, которая равна концентрации ингибитора, при которой скорость ферментативной реакции уменьшается до 50% от исходной. Наиболее эффективными ингибиторами являются продукт реакции цианат (IC₅₀ = 0,7 мМ), цианид (IC₅₀ = 0,003 мМ) и амитрол (3-амино-1,2,4-триазол, IC₅₀ = 0,029 мМ). Для этих трех ингибиторов определили кинетический механизм и константу ингибирования реакции окисления тиоцианата. Механизм ингибирования для всех трех ингибиторов - конкурентный, константы ингибирования составляют 0,7 мМ, 1,6 мкМ и 20 мкМ, соответственно. Для цианида и амитрола с помощью метода QM/MM было смоделировано предполагаемое положение ингибиторов в активном центре TcDH. Согласно предложенным моделям, оба соединения образуют координационные связи с двумя ионами меди, препятствуя продуктивному связыванию тиоцианата. Для получения экспериментальных структур комплексов TcDH с наиболее эффективными ингибиторами методом рентгеноструктурного анализа проводится сокристаллизация TcDH с цианатом, цианидом и амитролом. Полученные структуры будут использованы для определения способа связывания субстрата в активном центре TcDH и проверки предложенного ранее механизма реакции.

1.35. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БЕЛКОВОГО ОКРУЖЕНИЯ НА ПЕРВИЧНЫЙ ДОНОР ЭЛЕКТРОНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИИ *RHODOBACTER SPHAEROIDES* С ТРЕМЯ АМИНОКИСЛОТНЫМИ ЗАМЕЩЕНИЯМИ N(L173)L+I(L177)H+F(M197)H

Третчикова О.А.^{1,2}, Фуфина Т.Ю.², Васильева Л.Г.²

¹Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино
olyatretchikova@yandex.ru

Начальные стадии процесса фотосинтеза происходят в фотосинтетических реакционных центрах (РЦ) с квантовым выходом близким к 100%. РЦ пурпурной бактерии *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* локализован в клеточной мембране и состоит из трех субъединиц (L, M и H) и десяти кофакторов. Пигмент-белковые взаимодействия димера бактериохлорофилла (БХл) с его белковым окружением определяют многие важные свойства первичного донора электрона, необходимые для обеспечения эффективного разделения заряда в РЦ.

В данной работе методом ПЦР, стандартными молекулярно-биологическими и микробиологическими методами были внесены аминокислотные замещения His на Leu в позиции L173, Ile на His в позиции L177 и Phe на His в позиции M197 в РЦ *Rba. sphaeroides*. Были подобраны условия для выделения и очистки комплекса из мембран. Измерены спектры поглощения при комнатной и низкой (90 K) температурах. Полученные спектры отличаются от спектров поглощения РЦ дикого типа. Основные изменения связаны со спектральными свойствами БХл. В частности, в спектре мутантного РЦ отсутствует Q_y -полоса поглощения специальной пары Р и отмечается длинноволновый сдвиг Q_y -полосы поглощения мономерного БХл на 11 нм с увеличением ее амплитуды. В Q_y области поглощения мономерных БХл у мутантного РЦ заметна полоса при 802 нм, соответствующая поглощению мономерного БХл ВА. В то же время максимум полосы БХл в Q_x области спектра поглощения мутантных пигмент-белковых комплексов совпадает с таковым у дикого типа, указывая на то, что количество молекул БХл в обоих РЦ одинаково (четыре молекулы). Результаты спектрального анализа позволяют предположить, что в мутантном РЦ Q_y -полоса поглощения Р не отсутствует, а претерпевает очень значительный коротковолновый сдвиг, практически перекрываясь с Q_y -полосой мономерных БХл. Такой феномен неизвестен в литературе и представляет интерес для дальнейшего исследования. Пигментный анализ мутантного РЦ показал, что соотношение БХл:БФео составляет 1,34, а в РЦ дикого типа оно равно 2. Эти результаты не согласуются со спектрами поглощения и, вероятно, объясняются пониженной стабильностью мутантного РЦ. С помощью метода измерения дифференциальных (свет-темнота) спектров поглощения установлено, что мутантные РЦ фотохимически активны.

1.36. ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК КОКАТЕМЕРНЫХ КАНАЛОВ ASIC3 ЧЕЛОВЕКА И КРЫСЫ

Уграйтская В.М.¹, Осмаков Д.И.², Королькова Ю.В.²

¹МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
ugraitskaja@yandex.ru

Введение. Протон-активируемые каналы ASIC (Acid-Sensing Ion Channels) принадлежат к числу фармакологически-значимых нейрорецепторов. Изучение строения и функционирования каналов, позволяет раскрывать природу таких патологических состояний как ишемический инсульт, рассеянный склероз, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, мигрень, глиобластома, эпилепсия, а также природу различных болевых состояний, способствуя созданию нового поколения обезболивающих средств.

Результаты. Получены конструкции в составе вектора pVax, кодирующие кокатемерные каналы ASIC3 крысы и человека с шшитыми линкерными последовательностями в единый белок субъединицами. Проведено сравнение характеристик экспрессированных в ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* кокатемерных каналов и каналов, чьи субъединицы не шшиты. Для каналов ASIC3 человека показано, что введение линкеров между субъединицами практически не оказывает влияния на процессы активации-инактивации химерного канала. Тогда как для каналов ASIC3 крысы жесткая сшивка субъединиц в единый белок приводит, по-видимому, к ряду конформационных изменений, оказывающих влияние на процесс активации канала. Показано, что одним из факторов, участвующих в активации канала, является подвижность концевых участков субъединиц. Удаление части остатков канала в С-концевом фрагменте может приводить к возникновению "пиковой" компоненты ответа для канала человека и значительному увеличению этой компоненты для канала крысы. Использование более длинного линкера для сшивки отдельных субъединиц канала ASIC3 крысы, возможно, приведет к кокатемерному каналу с характеристиками канала дикого типа.

Выводы. Изучение работы ASIC каналов - перспективное и важное направление, как в медицине, так и в нейробиологии. Создание кокатемерных конструкций дает возможность контролировать субъединичный состав экспрессированных химерных каналов для определения сайтов и механизма связывания активных соединений с различными субъединицами.

1.37. ИЗУЧЕНИЕ ПЕПТИДА НОВОГО СТРУКТУРНОГО КЛАССА ИЗ ЯДА МОРСКОЙ АНЕМОНЫ, МОДУЛИРУЮЩЕГО РАБОТУ КИСЛОТО-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИОННОГО КАНАЛА 1a ТИПА

Хасанов Т.А.^{1,2}, Осмаков Д.И.^{1,3}, Андреев Я.А.^{1,3}, Козлов С.А.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва
Khasanov17@yandex.ru

Кислото-чувствительные ионные каналы (ASIC каналы) относятся к надсемейству амилорид-чувствительных дегенерин/эпителиальных Na⁺-каналов. В организме млекопитающих обнаружено по меньшей мере 6 изоформ, и одна из них, ASIC1a, широко представлена как в центральной, так и в периферической нервной системе. ASIC1a каналы участвуют в различных, в том числе и патологических, процессах организма, таких как: ишемия, ацидоз, воспаление. Яды животных являются богатым источником различных лигандов ионных каналов. Так, из яда морской анемоны *Metridium senile* был выделен и изучен новый пептидный модулятор ASIC1a каналов. Пептид, названный MS54, был получен в результате трехстадийного разделения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с последующим электрофизиологическим испытанием, проводившимся после каждой стадии разделения на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих ASIC1a каналы. Была установлена первичная структура пептида, для которой не было найдено гомологов среди других пептидных молекул. Для более масштабных исследований была отработана схема получения рекомбинантного аналога пептида. Исследования механизма действия MS54 показали, что пептид является потенциатором, в наномолярной концентрации связывающимся с каналом в его открытом состоянии. Таким образом, был найден новый модулятор ASIC1a каналов, который не только открывает новую группу пептидных лигандов, но и служит перспективным инструментом для изучения этой группы каналов.

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

1.38. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТОКСИНА PaurTx-3 С МЕМБРАНОМОДЕЛИРУЮЩИМИ СРЕДАМИ И НАТРИЕВЫМ КАНАЛОМ Nav1.4

Хорев А.С.^{1,2}, Мышкин М.Ю.^{1,2}, Лукьянов Д.К.¹, Беркут А.А.¹,
Василевский А.А.^{1,2}, Шенкарёв З.О.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет), Долгопрудный
horev.as@phystech.edu

Потенциал-зависимые натриевые каналы - важный класс мембранных белков, играющих ключевую роль в формировании потенциала действия. С мутациями в генах, кодирующих эти белки, связан ряд расстройств, таких как: периодический паралич, миотония, миостения и другие. Пептидные токсины из яда беспозвоночных, в том числе пауков, обладают высоким сродством и разнообразием эффектов и профилей селективности по отношению к натриевым и другим ионным каналам, что делает их перспективными кандидатами для фармакологического применения.

Объект данного исследования - пептидный токсин PaurTx-3 из яда паука *Paraphysa scrofa* - имеет, согласно литературным данным, аффинность к клеточным мембранам и ряду натриевых каналов человека. Методом ЯМР-спектроскопии нами было проведено исследование связывания PaurTx-3 с мембраномоделирующими средами на примере мицелл детергента DPC и смешанных мицелл DPC/LDAO. Наиболее чувствительны к добавлению мицелл оказались сигналы аминокислотных остатков, образующих характерный для подобного рода токсинов гидрофобный кластер. Добавление 16-доксилстеарата к PaurTx-3 в DPC также подтвердило участие гидрофобного кластера во взаимодействии с мицеллами. В результате измерения коэффициентов распределения между фазами оказалось, что токсин имеет почти на порядок меньшее сродство к мицеллам DPC/LDAO, чем к мицеллам DPC. Исследование ¹⁵N-меченого PaurTx-3 в комплексе с немеченым вторым потенциал-чувствительным доменом (ПЧД-II) канала Nav1.4 в мицеллах DPC и DPC/LDAO показало, что токсин вероятнее всего взаимодействует с ПЧД-II при помощи кольца положительно заряженных аминокислотных остатков на своей поверхности. В свою очередь, исследование меченого ПЧД-II в комплексе с немеченым PaurTx-3 показало, что сайт взаимодействия с токсином у ПЧД-II скорее всего располагается во внеклеточной петле S3-S4, которая является каноническим сайтом связывания подобных токсинов.

1.39. ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ pH-СЕНСОР НА ОСНОВЕ ЖЕЛТОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА ИЗ *PHIALIDIUM SP.*

Чевокина Е.С.^{1,2}, Мартынов В.И.², Пахомов А.А.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
e-chevokina@yandex.ru

Желтый флуоресцентный белок из гидроидной медузы *Phialidium sp.* (phiYFP) имеет максимумы возбуждения и эмиссии флуоресценции при 522 и 537 нм, соответственно. В отличие от ближайшего гомолога - зеленого флуоресцентного белка из гидроидной медузы *Aequorea victoria* (GFP), в phiYFP дикого типа не происходит процесс переноса протона в возбужденном состоянии (excited state proton transfer, ESPT), в результате чего при уменьшении pH белок теряет способность к флуоресценции. В результате сайт-направленного мутагенеза аминокислотных остатков в самом хромофоре и его ближайшем окружении была получена форма phiYFP-T65V, для которой показано наличие ESPT. Мутантный белок имеет два пика возбуждения флуоресценции при 412 и 516 нм, соответствующие протонированной и анионной форме хромофора соответственно, и один пик эмиссии флуоресценции при 527 нм. Титрованием белков в нативной и мутантной формах в диапазоне pH от 4 до 12 были установлены значения pKa хромофора. Соотношение максимумов возбуждения флуоресценции в синем и голубом спектральных диапазонах зависит от pH, что позволяет использовать phiYFP-T65V в качестве внутриклеточного ратиометрического pH-сенсора. Также была изучена зависимость спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции в зависимости от концентрации хлорид-анионов в среде. Предложен метод для одновременного определения pH среды и концентрации хлорид-анионов.

1.40. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ TLR ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДОМ ЯМР

Шабалкина А.В., Гончарук С.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
shabalkina.av@phystech.edu

Толл-подобные рецепторы (TLR) - рецепторы иммунной системы, чья основная задача распознавание патогенов и запуск реакций для защиты организма. Нарушения в функционировании данных белков связаны с целым рядом заболеваний таких как ревматоидный артрит, атеросклероз, ишемия, астма, аллергия и многими другими. Толл-подобные рецепторы - перспективные мишени для поиска новых лекарств. Данные белки относятся к трансмембранным белкам первого типа. В то время как их внеклеточные и внутриклеточные домены исследованы достаточно подробно, трансмембранные домены (ТМД), представленные одиночной альфа-спиралью, слабо изучены.

На сегодняшний день известны структуры ТМД только для двух представителей семейства - TLR3 и TLR4. Интересно, что при изучении TLR4 также было уделено внимание внутриклеточному примембранному региону, соединяющему трансмембранный и внутриклеточный домены. Было обнаружено, что на самом деле данный регион является продолжением трансмембранного домена. Данные результаты привели к вопросу о том, для всех ли представителей семейства внутриклеточный примембранный регион является частью ТМД?

Ответ на данный вопрос могут дать только структурные исследования остальных представителей семейства. В данной работе мы представляем высокоэффективный протокол получения ТМД пяти представителей семейства TLR человека. Разработанные методики основаны на продукции пептидов методом бесклеточного синтеза с итоговым выходом около 1 мг на 1 мл реакционной смеси. Использование метода бесклеточной экспрессии позволяет легко получать изотопно-меченые производные в миллиграммовых количествах для структурных исследований методом ЯМР. Кроме того, в работе представлены протоколы очистки, позволяющие получать очищенный препарат пептида, готовый для встраивания в различные мембраноподобные среды, что необходимо для проведения дальнейших исследований ТМД в нативном окружении.

1.41. ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗ СЕРООКИСЛЯЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *THIOHALOBACTER THIOCYANATICUS*

Шипков Н.С.¹, Дергоусова Н.И.¹, Тихонова Т.В.¹, Сорокин Д.Ю.², Попов В.О.¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

shipkov1995@yandex.ru

Галофильная сероокисляющая бактерия *Thiohalobacter thiocyanaticus* способна к росту на тиоцианате (SCN^-) в качестве единственного источника энергии. В процессе роста *T. thiocyanaticus* в присутствии SCN^- экспрессируется белок, гомологичный медь-содержащей тиоцианатдегидрогеназе (TcDH), окисляющей тиоцианат по цианатному пути у галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus*. Идентичность аминокислотных последовательностей двух белков составляет около 30%, при этом в белке из *T. thiocyanaticus* присутствуют все необходимые для катализа аминокислотные остатки. Окружение генов TcDH в геномах двух бактерий отличается. Однако, оба генома содержат гены белков, ответственных за транспорт меди (CopCD в *T. paradoxus* и CusAB в *T. thiocyanaticus*) в непосредственной близости от генов TcDHs.

Особый интерес представляет белок, принадлежащий к суперсемейству тиоредоксинов (ThR), ген которого предшествует гену TcDH в геноме *T. thiocyanaticus*. ThR не содержит каталитического домена тиоредоксинов (CXXC), но при этом образует с TcDH устойчивый комплекс. Исследуется потенциальная роль тиоредоксина в сворачивании и стабилизации TcDH.

Клетки *T. thiocyanaticus* культивировали на минеральной среде в миксотрофных условиях в присутствии тиосульфата и тиоцианата. Белок выделяли из периплазматической фракции клеток и очищали с использованием анионообменной хроматографии и стадии гель-фильтрации. Полученный препарат анализировали с помощью SDS-PAGE и MALDI-TOF-MS. Ферментативную активность измеряли спектрофотометрически с использованием в качестве акцепторов электронов цитохрома с из сердца лошади или феррицианида калия.

Оптимизированы условия роста *T. thiocyanaticus* с тиоцианатом в качестве источника энергии. Оптимизирована процедура выделения и получен гомогенный препарат TcDH. Методом рентгенофлуоресцентного анализа показано, что свежевыделенный TcDH содержал ионы меди. Обнаружена тиоцианатдегидрогеназная активностью после дополнительного насыщения белка ионами Cu(II) .

Выводы. Из бактерии *T. thiocyanaticus* выделен фермент, отвечающий за первую стадию разложения тиоцианата. Выделенный фермент гомологичен ранее описанной TcDH из *T. paradoxus*. Проведена предварительная характеристика нового фермента. Обнаружен устойчивый комплекс TcDH с ThR.

СЕКЦИЯ 2

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

2.1. ДНК-ПОЛИМЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ PRIMPOL ЧЕЛОВЕКА НА МАТРИЦЕ С ВНУТРИЦЕПЕЧНОЙ ЦИСПЛАТИНОВОЙ СШИВКОЙ

Болдинова Е.О., Шилкин Е.С., Гагаринская Д.И., Макарова А.В.

Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва
lizaboldinova@yandex.ru

Цисплатин является широко используемым химиотерапевтическим препаратом при лечении многих видов злокачественных опухолей. Механизм действия цисплатина заключается в блокировании репликации внутрицепочечными и межцепочечными сшивками ДНК; наиболее распространенный тип цисплатиновых ДНК-аддуктов (около 65%) - сшивка между соседними гуанинами одной цепи (d(GpG)). Праймаза-полимераза человека PrimPol реинициирует синтез ДНК *de novo* ниже места повреждения ДНК, а также способна эффективно включать нуклеотиды напротив многих типов повреждений ДНК. В данной работе исследовали ДНК-полимеразную активность PrimPol ДНК на матрице, содержащей d(GpG)-цисплатиновую сшивку *in vitro*.

В присутствии ионов Mn^{2+} в качестве кофактора PrimPol эффективно и точно включала напротив сшитых гуанинов комплементарные dCTP, но дальнейший синтез ДНК был затруднен. Репликативный фактор PolDIP2 (Polymerase δ interacting protein 2) существенно увеличивал эффективность репликации ДНК PrimPol напротив d(GpG)-цисплатиновой сшивки и стимулировал удлинение ДНК PrimPol после "прохождения" повреждения. Кроме того, было обнаружено, что ДНК-полимеразы Pol κ и Pol ζ могут выполнять функции ДНК-полимеразы экстендера и продолжать синтез ДНК после включения нуклеотидов напротив d(GpG)-цисплатиновой сшивки PrimPol *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-14-00354.

2.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕЛОМЕРНОЙ РОЛИ БЕЛКА Ars2 В ЯИЧНИКАХ ДРОЗОФИЛЫ

Борисов Е.Е.^{1,2}, Шитова М.С.¹, Калмыкова А.И.¹

¹Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва

²Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В.

Ломоносова, Москва

borisovevgenij5@gmail.com

Drosophila melanogaster используется как модельный объект во многих биологических исследованиях, включая исследование биологии теломер на организменном уровне. Теломеры дрозофилы поддерживаются за счет транспозиции ретротранспозонов, среди которых основным является HeT-A (Healing Transposon), а не за счет активности теломеразы, что является ярким примером возникновения в природе функциональных аналогий. Механизмы поддержания гомеостаза теломер в герминальных тканях особенно важны для сохранения целостности генома. Обнаружено несколько путей, которые участвуют в регуляции экспрессии теломерных повторов и поддержании теломерного хроматина в клетках зародышевого пути дрозофилы: система с участием Piwi-interacting RNA (piRNA), ряд транскрипционных факторов и деаденилазный комплекс. РНК-связывающий белок Ars2 (Arsenic Resistance Protein 2) был выявлен как негативный регулятор экспрессии теломерного повтора HeT-A у дрозофилы и TERRA (telomeric repeat-containing RNA) у человека, что указывает на его консервативную роль в биологии теломер. Ars2 является высококонсервативным компонентом кэп-связывающего комплекса, а также входит в состав различных белковых комплексов, определяющих судьбу транскриптов в ядре. Данная работа направлена на исследование регуляторной роли белка Ars2 в герминальных тканях дрозофилы и его участия в функционировании теломер. Полученные нами высокоспецифичные антитела к Ars2 позволяют исследовать внутриклеточную локализацию Ars2 и его взаимодействия с белками, участвующими в регуляции теломер. Клеточное фракционирование и иммуноокрашивание выявило присутствие Ars2 как в ядре, так и в цитоплазме герминальных клеток. Дисфункция Ars2 приводит к мощному накоплению транскриптов HeT-A в яичниках дрозофилы, часть которых остается в ядре и ассоциирована с теломерами. Обнаружено, что при этом происходит изменение теломерного хроматина, а именно, увеличивается содержание форм гистона H3, ассоциированных с активной транскрипцией. Наши данные указывают на то, что Ars2 может участвовать в котранскрипционном механизме узнавания теломерных транскриптов и передаче сигналов к хроматиновым комплексам, что приводит к подавлению транскрипции теломерных повторов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00254.

2.3. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ ЧЕЛОВЕКА РЕПЛИКАТИВНЫМ ФАКТОРОМ PolDIP2

Бушueva В.А.^{1,2}, Болдинова Е.О.¹, Макарова А.В.¹

¹Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва

²МИРЭА - Российский технологический университет, Москва

bushuevalera19@gmail.com

Многофункциональный белок PolDIP2 (Polymerase δ interacting protein 2) участвует в регуляции процессов окисления-восстановления, организации митотического веретена и сегрегации хромосом, процессинге пре-мРНК, важен для поддержания морфологии и функций митохондрий, участвует в миграции клеток и клеточной адгезии. Все больше исследований указывают на роль PolDIP2 в качестве регуляторного фактора репликации и транслезионного синтеза ДНК. PolDIP2 взаимодействует с высокоточной ДНК-полимеразой Pol δ , регуляторным репликативным фактором PCNA, ДНК-праймазой и ДНК-полимеразой PrimPol и несколькими транслезионными и репарационными ДНК-полимеразами. Однако функции PolDIP2 в синтезе и репарации ДНК до конца не изучены. Кроме того, до сих пор не опубликована структура PolDIP2. Исследование PolDIP2 затрудняют методические сложности, с которыми сталкиваются исследователи при выделении белка. PolDIP2, экспрессированный в клетках бактерий, подвергается протеолизу и склонен к агрегации.

Ранее в нашей лаборатории были разработаны методики очистки PolDIP2 с HIS-тагом и GST-тагом. Методика очистки с HIS-тагом не позволяла преодолеть проблему протеолиза и низкой степени очистки, а N-концевые аминокислотные остатки, оставшиеся после отрезания GST-тага нарушали функциональное взаимодействие PolDIP2 с PrimPol. В данной работе была разработана методика выделения белка PolDIP2 с N-концевым SUMO-HIS тагом, что позволило повысить стабильность и растворимость белка и выделить PolDIP2 без дополнительных N-концевых аминокислот, остающихся после отрезания других тагов. С помощью ДНК-полимеразных реакций с радиоактивно-меченным ДНК субстратом был проведен анализ функционального взаимодействия PolDIP2 с PrimPol и ДНК-полимеразами Pol κ и Pol δ . Показано, что фактор PolDIP2 эффективно стимулирует синтез не только PrimPol, но и Pol κ , относящейся к γ -семейству ДНК-полимераз, но не влияет на синтез Pol δ , относящейся к χ -семейству ДНК-полимераз.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-аспиранты № 19-34-90147 и гранта РНФ № 18-14-00354.

2.4. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНА ФИТОЕНДЕСАТУРАЗЫ *NICOTIANA TABACUM* С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННОЙ дцРНК

Голубева Т.С.^{1,2}, Черенко В.А.^{1,2}, Филипенко Е.А.¹, Кочетов А.В.¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск
frolova@bionet.nsc.ru

Экзогенные двуцепочечные РНК (дцРНК), используемые для защиты растений, в последнее время широко исследуются как потенциальная альтернатива химическим инсектицидам и пестицидам. Помимо отсутствия необходимости в создании ГМО, этот подход также позволяет избежать многих проблем, связанных с применением различных химикатов, а совершенствование системы доставки может улучшить использование дцРНК в качестве биоинсектицида в полевых условиях. В нашей работе мы создали генетическую конструкцию для наработки дцРНК в клетках *E. coli* с целью выключения гена фитоендесатуразы в растениях *Nicotiana benthamiana*. Снижение экспрессии гена фитоендесатуразы имеет отчетливое фенотипическое проявление в виде побеления молодых листьев. В качестве системы доставки дцРНК использована корневая обработка растений грубым лизатом бактериальной суспензии. Данный подход широко используется в модельных экспериментах по регуляции экспрессии генов у растений с помощью экзогенных дцРНК.

В данном исследовании в качестве модельного растения для проведения эксперимента был использован табак Бентхама (*N. benthamiana*). Для наработки дцРНК использован штамм *E. coli* HT115 (DE3): данный штамм является дефицитным по РНКазе III, что делает его использование возможным для наработки дцРНК. В качестве вектора использована плаزمид L4440, особенностью которой является наличие двух сильных T7 промоторов в противоположных направлениях, благодаря чему возможен синтез дцРНК с заданной последовательностью. Для обработки растений синтез дцРНК в клетках *E. coli* индуцировался IPTG с последующим получением грубого лизата согласно методике. Обработка растений проводилась 3 раза в неделю в течение 4 недель.

По истечении 4 недель обработки листья *N. benthamiana*, обработанные лизатом бактерий со вставкой фрагмента гена фитоендесатуразы, демонстрировали фенотипы фотообесцвечивания молодых листьев, характерные для сайленсинга гена фитоендесатуразы.

Полученные результаты демонстрируют, что корневая обработка дцРНК является простым и практичным методом доставки дцРНК. Данный способ обработки может быть также использован для доставки молекул дцРНК в качестве фунгицида и инсектицида.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках реализации проекта № 19-74-00067.

2.5. ОТВЕТ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА С НОКАУТОМ ГЕНА *PRIMPOL* НА ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК

Громова А.С.¹, Болдинова Е.О.¹, Ким Д.В.², Чупров-Неточин Р.Н.³, Жарков Д.О.², Макарова А.В.¹

¹Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский Институт", Москва

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный
grom-nast@yandex.ru

Праймаза и полимеразы человека PrimPol обладает как ДНК-праймазой, так и ДНК-полимеразной активностями. PrimPol обеспечивает реинициацию репликации после остановки репликативной вилки на поврежденной ДНК, но конкретные функции PrimPol в клетке и ее участие в защите от разных типов повреждений ДНК не изучены. Предполагается, что реинициация репликации после повреждений, вызванных химиотерапевтическими препаратами, может служить механизмом формирования опухолевой химиорезистентности.

Для определения роли PrimPol в ответе на разные типы повреждений ДНК с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 была получена линия клеток аденокарциномы легкого A549 с нокаутом гена *PRIMPOL*. Сдвиг рамки считывания был подтвержден методом TIDE и секвенированием, а отсутствие PrimPol в экстракте клеток - вестерн-блотом. Клетки с геном дикого типа (*PRIMPOL*^{+/+}) и с нокаутом (*PRIMPOL*^{-/-}) обрабатывали разными концентрациями ДНК-повреждающих агентов: перекиси водорода, метилметансульфоната, блеомицина и цисплатина. Оценивали скорость пролиферации клеток и их выживаемость с помощью МТТ-анализа метаболической активности. Скорость пролиферации клеток с геном *PRIMPOL*^{-/-} по сравнению с клетками дикого типа была незначительно снижена, но отличий в метаболической активности при обработке цисплатином, метилметансульфонатом и блеомицином не наблюдалось. Статистически значимое увеличение метаболической активности клеток с геном *PRIMPOL*^{-/-} наблюдали при индукции окислительного стресса перекисью водорода. Мы предполагаем, что накопление повреждений и неспособность клеток реиницировать репликацию приводит к задержке клеточного цикла (в синтетической или G2 фазах), что отражается на разной чувствительности популяции клеток (в разных фазах цикла) к активным формам кислорода.

Работа поддержана грантом РНФ № 18-14-00354.

2.6. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ФОРМ БЕЛКА SpyCas9 И ПРОВЕРКА ИХ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМЫ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* НА ОСНОВЕ ГЕНА-МИШЕНИ ADE2

Давлетшин А.И., Гарбуз Д.Г., Спасская Д.С., Тютеева В.В., Карпов Д.С.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
artem.dav7@yandex.ru

Модификация, удаление или встраивание в геном определенных генов являются важным инструментом как фундаментальной науки, так и промышленной биотехнологии, а в перспективе и медицины. Эффективное и безопасное редактирование геномов требует создания и оптимизации инструментов модификации ДНК как *in vitro*, так и *in vivo*.

Одним из таких перспективных инструментов является система CRISPR/Cas9 (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats - короткие палиндромные повторы регулярно расположенные группами/ CRISPR associated protein - CRISPR-ассоциированный белок). В настоящее время CRISPR/Cas является самой простой и удобной системой для редактирования ДНК. Однако при редактировании белок Cas9 может проявлять неспецифическую активность, поэтому для более точного редактирования ДНК необходимо увеличение специфичности системы.

В нашей работе мы получили новые формы белка *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpyCas9), которые содержат комбинации мутаций, нацеленных на повышение точности редактирования ДНК-мишени в геноме (eSpCas9(1.1), Cas9-HF1, Hypo-Cas9, iCas9). Кроме того, был получен ряд конструкций, содержащих случайные мутации вблизи от активного центра белка, повлиявшие на активность белка SpyCas9.

Для проверки активности полученных модифицированных SpyCas9 белков, была разработана и опробована тест-система на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с использованием в качестве мишени гена ADE2 (Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase). С помощью данной тест-системы была проведена оценка активности полученных модифицированных SpyCas9 белков, которая показала, что как минимум две комбинации мутаций не уступают по активности белку дикого типа и, предположительно, имеют повышенную специфичность в отношении ДНК-мишени. В целом, получен большой массив данных о влиянии более 30-и отдельных мутаций на точность и активность белка SpyCas9.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-07015.

2.7. ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА КЛЕТОК ЯИЧНИКА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА СНО-S СИСТЕМОЙ CRISPR/Cas

Даянова Л.К.¹, Орлова Н.А.², Ковнир С.В.², Воробьев И.И.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

l.daianowa@yandex.ru

Для редактирования геномов широко применяется система CRISPR, эффективность которой в настоящий момент ограничена только эффективностью трансфекции и последующего отбора трансфицированных клеток. В ходе проведения редактирования генома клеток системой CRISPR/Cas необходимо проводить оптимизацию условий - экспериментальную проверку *in silico* расчетов направляющих РНК (gРНК) - на нескольких этапах. На первом этапе подбирают эффективный gРНК, на втором - условия трансфекции, на третьем - оптимальный метод скринирования клонов на наличие заданных мутаций.

Поскольку не все gРНК одинаково эффективны, целесообразно провести их предварительную проверку методом специфического гидролиза гетеродуплексных продуктов ПЦР нуклеазой бактериофага T7. Этот метод может давать несколько заниженные результаты, однако обычно не дает ложнопозитивных. Для подтверждения результатов можно применять метод прямого секвенирования ПЦР продуктов с анализом TIDE.

Клетки линии СНО-S были трансфицированы плазмидой, кодирующей нуклеазу Cas9 и ген устойчивости к действию пуромицина, а также смесями плазмид, кодирующих gРНК к пяти таргетным генам - дигидрофолатредуктазе (4 варианта gРНК), глутатионсинтетазе (4 варианта gРНК), а также трем генам BAK, BAX, FUT8, нокаут которых обеспечит лучшие ростовые характеристики культуры. Была проведена оптимизация метода анализа эффективности редактирования каждого из целевых генов для полученных поликлональных популяций. Для этого был проведен подбор праймеров и оптимизация условий ПЦР, позволяющих получать с геномной ДНК единственный ПЦР-продукт размером 600-1000 п.о., подобраны условия проведения реакции с T7 эндонуклеазой, для каждого гена определена эффективность работы gРНК. Процент конверсии составил для гена DHFR от 33% до 64%, для всех четырех gRNA были зафиксированы продукты распада, соответствующие ожидаемым позициям сайтов геномного редактирования. В случае гена GS были зафиксированы продукты специфического распада только для двух из четырех gРНК, степень конверсии составила от 32% до 86%. Подобраны условия ПЦР для проведения анализа без выделения геномной ДНК, что ускорит анализ клонов, полученных при трансфекции клеток смесью выбранных эффективных gРНК. Полученные результаты верифицированы методом TIDE.

2.8. ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА *Dras1*

Картамышева Л.В.¹, Сивопляс Е.А.¹, Куликов А.М.²

¹Московский педагогический государственный университет, Москва

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

sivoplyas-ekater@mail.ru

Гены *Ras* - один из наиболее консервативных генов, продукт экспрессии которого встречается на всех стадиях развития от дрожжей до человека. Данный ген входит в семейство кодирующих белков, относящихся к малым G-белкам (малые ГТФазы), играющих роль "молекулярных переключателей". Ген *Ras1* является универсальным переключателем от рецепторов к транскрипционным факторам. Ген *Ras* - самый известный протоонкоген. У человека также присутствуют гены родственные данному гену (*H-ras*, *K-ras* и *N-ras*), при этом они мало отличимые от дрозофилиного *Dras1*, поэтому мы можем использовать этот ген в качестве модели для изучения связанных с канцерогенезом сигнальных каскадов. Считается, что большинство мутаций нейтральны и их накопление протекает постепенно. Однако нами показано, что возможны кардинальные изменения регуляторной области гена, произошедшие в очень короткие сроки.

В эксперименте использованы 11 близкородственных видов *Drosophila* группы *virilis* из коллекции Института биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН. Показана полная смена промоторной области гена *Dras1* у дрозофил группы *virilis* по сравнению с *D. melanogaster*. На ранних этапах эволюции в ходе дивергенции видов подродов *Drosophila* и *Sophophora* от общего предка изменения промоторной области данного гена были вызваны инсерцией мобильных элементов *Mariner*, *Helitron*, *Penelope* и *Paris*. Данная инсерция сопровождалась инверсионной перестройкой хромосомы. Дивергенция общего предка видов *D. littoralis*, *D. ezoana* и сопровождалась инсерцией мобильного элемента в центральную часть предпромоторной области. Мы наблюдаем процесс полной смены регуляторной и промоторной области гена как минимум в трех случаях, в ходе дивергенции видов дрозофил разной степени родства. Это показатель высокой скорости эволюции, так как в кратчайшие сроки было восстановлено функционирование гена, при инактивации которого появляется летальный аллель, не способный поддерживать экспрессию данного гена.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00840 мол_а.

2.9. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ С ЦЕЛЬЮ ПАСПОРТИЗАЦИИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ БИОТИПОВ ОСИНЫ

Кондратьева А.М., Гродецкая Т.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж
kondratyeva_anya@mail.ru

Культивирование *in vitro* представляет собой перспективный метод для создания растений с заданными свойствами и использования их в лесовосстановлении. Осина является перспективными древесными растениями, поскольку обладает значительным регенерационным потенциалом и широко распространена в районах с умеренным и холодным климатом Европы и Азии, Северной Америки и Канады. При этом применение молекулярных маркеров наряду с использованием цитогенетических методов позволяет провести точную оценку исходного материала для введения в культуру *in vitro*, а также исследовать генетическую изменчивость микроклонов в процессе длительного культивирования.

Объектом исследования являлись размноженные *in vitro* клоны осины (*Populus tremula*), произрастающие на плантации ВНИИЛГИСбиотех в г. Семилуки и образцы полученных от них клонов из культуры *in vitro*. Анализ образцов был проведен по девяти SSR-локусам (ORPM: 30 и 344; PMGC: 2060, 2163, 2571, 2679, 2852; WPMS: 5, 14). В ходе проведенного микросателлитного анализа было выявлено три различных генотипа (15/01, 6/03 и 20/04), при этом *in vitro* клоны были идентичны по генетической структуре исходным деревьям, что свидетельствует о высокой генетической однородности в процессе культивирования. При этом все используемые в исследовании локусы показали низкий полиморфизм, что, вероятно, связано с близким родством проанализированных генотипов. На основе результатов микросателлитного анализа генотипы 15/01 и 20/04 проявляют большее сходство по отношению друг к другу относительно 6/03. Таким образом, молекулярно-генетический анализ микросателлитных локусов осины позволил установить генетическую структуру, на основании которой были составлены генетические паспорта и определена плоидность некоторых исследуемых образцов. Наличие четких отличий в генетической структуре по ряду проанализированных микросателлитных локусов между генотипами дает основание считать метод микросателлитного анализа высокопродуктивным в оценке генотипов различных растений.

2.10. НЕГАТИВНЫЙ ФАКТОР ЭЛОНГАЦИИ NELF УЧАСТВУЕТ В АКТИВНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ ЭКДИЗОНОВОГО КАСКАДА ДРОЗОФИЛЫ

Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е.

Институт биологии гена РАН, Москва

mazinam@genebiology.ru

В течение многих лет считалось, что состояние "паузы" РНК-полимеразы II (Pol II) на промоторах регулирует транскрипцию генов в развитии дрозофилы, определяя пространственно-временные свойства их активации и репрессии. Однако конкретные белки, участвующие в формировании "паузы" Pol II, все еще в значительной степени неизвестны. В своей работе мы описали молекулярный механизм участия негативного фактора элонгации (NELF) в организации "паузы" Pol II на генах, транскрипция которых индуцируется гормоном 20-гидроксиэкдизоном (20E). Ранее, в модельной системе 20E-зависимых генов мы показали участие фактора NELF в инициации транскрипции [1, 2]. Кроме того, с использованием современных методов мечения пространственно сближенных белков биотином мы обнаружили взаимодействие рецептора 20E EcR с субъединицей NELF-A фактора NELF [Mazina et al (2020) *Sci Rep*, 10(1):4793]. В представленной работе мы продолжили исследование роли NELF в транскрипции и показали, что данный фактор рекрутируется на промоторы и энхансеры 20E-зависимых генов и участвует как в их активной транскрипции, так и в поддержании репрессированного состояния. Нокаут NELF вызывает значительное падение транскрипции 20E-зависимых генов, а также снижение уровня связывания субъединицы Spt5 фактора элонгации транскрипции DSIF с их промоторами. Мы предполагаем, что важной функцией фактора NELF является участие в стабилизации элонгирующего комплекса Pol II-DSIF. Чтобы напрямую связать NELF с регуляцией 20E-зависимых генов в процессе развития, мы оценили присутствие NELF на промоторах 20E-зависимых генов во время их активной транскрипции, как в эмбриогенезе, так и в метаморфозе. Мы показали, что 20E-зависимые гены остаются в состоянии "паузы" Pol II на личиночной стадии, где они временно репрессируются, и их репрессия коррелирует с присутствием фактора NELF на промоторах.

Литература:

1. Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Fursova N.A., Nedil'ko P.N., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. (2015) Early-late genes of the ecdysone cascade as models for transcriptional studies. *Cell Cycle*, 14, 3593-3601.
2. Mazina M.Y., Kovalenko E.V., Derevyanko P.K., Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. (2018) One signal stimulates different transcriptional activation mechanisms. *BBA - Gene Regul. Mech.* 1861, 178-189.
3. Mazina M.Y., Ziganshin R.H., Magnitov M.D., Golovnin A.K., Vorobyeva N.E. (2020) Proximity-dependent biotin labelling reveals CP190 as an EcR/Usp molecular partner. *Sci. Rep.* 10, 4793.

2.11. РОЛЬ КОНСЕРВАТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ СУБДОМЕНА ModN В АКТИВНОСТИ PrimPol

Манукян А.А.^{1,2}, Болдинова Е.О.¹, Макарова А.В.¹

¹Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

annamg183@gmail.com

Праймаза/полимераза человека PrimPol - фермент, обладающий как ДНК-полимеразной, так и ДНК-праймазной активностями. Он участвует в репликации ядерной и митохондриальной ДНК и способен инициировать синтез ДНК *de novo* после остановок репликативной вилки с помощью праймазной активности, и, предположительно, также встраивает dNTP напротив поврежденных нуклеотидов ДНК-матрицы.

Структура каталитического кора PrimPol была расшифрована, но функции отдельных остатков активного центра не были исследованы биохимически. В настоящей работе для анализа ДНК-полимеразной и ДНК-праймазной активностей PrimPol человека на основании трехмерной структуры каталитического кора фермента были выбраны два консервативных аминокислотных остатка субдомена ModN, взаимодействующих с матричной ДНК: Arg47 и Arg76. Методом сайт-направленного мутагенеза были получены точечные одиночные мутации в гене *PRIMPOL*, несущие замены исследуемых остатков на аланин. Мутантные варианты PrimPol были экспрессированы в клетках *E. coli* и очищены с помощью аффинной и ионообменной хроматографии.

Исследование свойств мутантных вариантов PrimPol на неповрежденной матрице показало, что замены остатков Arg47 и Arg76, отвечающих за связывание с матричной ДНК, приводят к снижению ДНК-праймазной и ДНК-полимеразной активностей PrimPol. Замена R47A снижала активность PrimPol, в то время как замена R76A вызвала полную потерю активности в реакциях с ионами Mg²⁺ в качестве кофактора и резкое падение активности в реакциях с Mn²⁺. С помощью анализа подвижности в нативном полиакриламидном геле для мутантных вариантов PrimPol было также показано нарушение образования комплекса ДНК-PrimPol-dNTP. Кроме того, обе замены снижали транслезионную активность PrimPol напротив 8-оксогуанина и изменяли спектр включения dNTP на неповрежденных и поврежденных ДНК-матрицах. Полученные данные свидетельствуют о важной роли остатков Arg47 и Arg76 в катализе PrimPol.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-аспиранты № 19-34-90147.

2.12. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ КОАКТИВАТОРА ТРАНСКРИПЦИИ SAYP В АКТИВАЦИИ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Мусабиров А.А.^{1,2,3}, Менчиц Я.А.^{1,4}, Гузь А.В.^{1,3,4}, Лебедева Л.А.¹, Качаев З.М.^{1,3}, Шидловский Ю.В.^{1,3,4}

¹Институт биологии гена РАН, Москва

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

³Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва
anton.am88@gmail.com

Молекулярные основы работы врождённого иммунитета являются в настоящее время актуальной областью исследований. В качестве объекта исследований в нашем проекте выступают факторы транскрипции, участвующие в активации генов иммунного ответа: факторы семейства NF-κB (Dif, Dorsal, Relish), DEAF-1 и SAYP модельного организма *Drosophila melanogaster*. Известно, что указанные факторы участвуют также в процессах онтогенеза. В настоящем исследовании мы изучаем и описываем новые молекулярные взаимодействия при активации генов иммунного ответа и участие в них данных белков.

Нами были наработаны и очищены различные эпитопы изучаемых белков, и были получены антитела к ним. Посредством коиммунопреципитации было обнаружено совместное осаждение DEAF-1 и SAYP. Таким образом найдено новое взаимодействие между фактором и коактиватором транскрипции. Мы локализуем отдельные домены этих белков, которые опосредуют найденное взаимодействие.

Для исследования механизмов активации генов иммунного ответа нами была разработана система их активации в культуре клеток S2. При обработке культуры клеток дрозофилы суспензией *E. coli* и *Micrococcus luteus* (грамотрицательная и грамположительная бактерии) происходит индукция сигнальных путей IMD или Toll, опосредующих экспрессию генов антимикробных пептидов. Методом хроматин-иммунопреципитации (ChIP) показано привлечение на промоторы генов антимикробных пептидов изучаемых факторов. Проведённый с помощью РНК-интерференции нокадаун SAYP привёл к снижению активности генов иммунного ответа в несколько раз. Сочетание методов ChIP и нокадауна позволит выяснить взаимное влияние указанных факторов друг на друга при активации генов.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-34-51003.

2.13. ВЫДЕЛЕНИЕ И АКТИВНОСТЬ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ REV1 ЧЕЛОВЕКА

Новикова А.А.^{1,2}, Столяренко А.Д.¹, Шилкин Е.С.¹, Полтораченко В.А.¹, Макарова А.В.¹

¹Институт молекулярной генетики НИЦ “Курчатовский институт”, Москва

²МИРЭА - Российский технологический университет, Москва

annnovikova00@icloud.com

Повреждения ДНК блокируют работу высокоточных репликативных ДНК-полимераз. Репликация в поврежденных участках осуществляется с помощью ряда особых высокоошибочных ДНК-полимераз в ходе процесса транслезионного синтеза. Нарушение их функционирования *in vivo* приводит к чувствительности к ДНК-повреждающим агентам. REV1 - ключевая ДНК-полимераза транслезионного синтеза эукариот, действующая преимущественно как цитидинтрансфераза, а также служащая в клетке плацдармом для сборки транслесомы - комплекса остальных транслезионных полимераз и репликативных факторов. Функционирование REV1 как цитидинтрансферазы возможно благодаря узнаванию и включению входящего нуклеотида аминокислотными остатками активного центра (вместо комплементарности ДНК). Исследование и разграничение каталитической и структурной функций REV1 человека ограничены сложностью получения препаратов рекомбинантного белка хорошего качества.

В работе предложена трехстадийная методика выделения REV1 человека из *E. coli*. Полученный препарат в значительной степени протеолизирован, но активен. В соответствии с литературными данными, выделенный препарат REV1 осуществляет включение dCMP напротив двух наиболее распространённых повреждений ДНК, АП сайта и 8-охо-G, а также всех неповрежденных нуклеотидов матрицы. Кроме того, REV1 осуществлял эффективное включение dCMP напротив 1,N⁶- этеноаденина, нарушающего уотсон-криковские водородные связи и блокирующего активность большинства ДНК-полимераз, за исключением Pol ι, руководствующейся хугстиновскими взаимодействиями. Действительно, нарушение хугстиновских взаимодействий введением модификации 7-дезааденина привело к блокированию активности REV1. Мы впервые заключаем, что каталитический механизм REV1 основывается на хугстиновских взаимодействиях при преодолении повреждений аденина.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-54-00024.

2.14. СЕЛЕКЦИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ КАРПОВЫХ (*CYPRINIDAE*) ИЗМЕНЯЕТ КОРОТКИЕ ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ?

Орлов М.А.¹, Тихонов А.Ю.²

¹ФИЦ "Пушкинский научный центр биологических исследований РАН",
Пушино

²Группа компаний "Аква-Лого", Москва
orlovmikhailanat@gmail.com

Короткие tandemные повторы в скобки (Simple sequence repeats, SSRs) это повторяющиеся последовательности ДНК с единицей длиной от 1 до 6 нуклеотидов. Ранее выявлено, что значительная длина и высокая точность (правильное чередование) первичной структуры SSRs связаны с локализацией генов, подвергающихся активному отбору, а именно селекции. SSRs также играют важную роль в регионах наиболее активных эволюционных процессов, таких как хромосомные перестройки и области, затронутые отдаленной гибридизацией в ходе полногеномных удвоений. В качестве объектов исследования в этой области очень перспективны рыбы семейства карповых (*Cyprinidae*). Действительно, отдельные карповые могут служить примером отдаленной гибридизации (включая межродовую), полногеномных удвоений и беспрецедентно продолжительной племенной работы на простые, легко отслеживаемые внешние признаки (декоративность).

В данной работе рассматриваются данные о секвенированных SSRs для 28 представителей семейства карповые. Для каждого из Для каждого набора последовательностей повторов, соответствующего конкретному виду, рассчитаны частоты встречаемости ди-, три- и тетра-нуклеотидов. Полученные данные проанализированы с помощью метода главных компонент (PCA) и кластеризации по Уорду. Анализ литературы позволил выделить группы видов в соответствии со "степенью одомашненности":

- 1) природные виды (в искусственных условиях не разводятся, могут вылавливаться);
- 2) промысловые виды (разводятся в искусственных условиях на еду);
- 3) декоративные виды (разводятся в искусственных условиях).

В итоге выявлено, что нуклеотидный состав наборов SSR карповых сильно варьирует. При этом культивируемые виды более склонны иметь отдельные повторы, достаточно длинные для нестабильности. В то же время первичная структура доступных наборов SSR видоспецифична и может отличать культивируемые виды от диких, что выявлено при помощи PCA. Кластерный анализ успешно выделил "дикую" и "культивируемую" группы. Для "одомашненного" кластера характерна большая представленность TG/CA-динуклеотидов, что согласуется с данными о большей склонности к мутациям и нестабильности именно TG-пар.

2.15. МАЛАЯ РНК MTS1338 - ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ФАКТОР ВИРУЛЕНТНОСТИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Острик А.А.¹, Григоров А.С.², Ажикина Т.Л.², Салина Е.Г.¹

¹Институт биохимии им А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва

albina.ostrik@gmail.com

Возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) выработал широкий спектр различных механизмов защиты в ответ угнетающие факторы, действующие со стороны макроорганизма во время инфекции. Одним из таких механизмов является способность бактериальной клетки быстро изменять уровень экспрессии генов в ответ на меняющиеся условия окружающей среды посредством регуляторных некодирующих малых РНК. Ранее нами показано положительное влияние гиперэкспрессии малой РНК MTS1338 на выживание *Mtb* в стрессовых условиях *in vitro* и при инфекции макрофагов. Клетки *Mtb* с гиперэкспрессией MTS1338 демонстрировали сохранение метаболической активности на более высоком уровне при снижении pH, длительном голодании, действии NO и H₂O₂ по сравнению с контрольным штаммом.

Транскриптомный анализ штамма *Mtb* с гиперэкспрессией MTS1338 обнаружил активацию ряда генов, связанных с вирулентностью как при нормальных условиях, так при стрессовом воздействии: по сравнению с контрольным штаммом, увеличивался уровень экспрессии основного секретируемого иммуногенного белка Mpt70. При этом в штамме *Mtb* с делецией малой РНК MTS 1338 наблюдалось снижение уровня экспрессии секретируемых белков EspA и EspD, ряда белков семейства PE-PGRS (PE-PGRS 5,7,14,15,21,54,56,57), присутствующих только у патогенных микобактерий, и генов семейства *mceI*, кодирующих белки, способствующие выживанию в макрофагах (MceI A,B,C,D). Уровень экспрессии белка RPE51, выполняющего у *Mtb* функцию порина и участвующего в транспорте питательных веществ в клетку, возрастает в штамме с гиперэкспрессией MTS1338 и, наоборот, снижается в штамме с делецией. В штамме с гиперэкспрессией MTS1338 также отмечено повышение уровня экспрессии *furA*, кодирующего глобальный транскрипционный репрессор, и транскрипционных регуляторов *cntR* и Rv2642, относящихся к семейству ArsR и принимающих участие в защите клетки от токсичного действия двухвалентных катионов металлов. Кроме того, в штамме с делецией MTS1338 наблюдается ингибирование аэробного дыхания и активация нитратредуктаз, что указывает на активацию нитратного дыхания и вероятное развитие в таких клетках окислительного стресса.

Полученные результаты позволяют предположить, что малая РНК MTS1338, является фактором вирулентности *Mtb*, обеспечивая адаптацию микобактерий к иммунному ответу организма-хозяина и их выживание в агрессивной внутриклеточной среде.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект №18-15-00332).

2.16. ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПРОКАРИОТИЧЕСКОГО БЕЛКА СЕМЕЙСТВА АРГОНАВТОВ

Пантелеев В.А.^{1,2}, Кропочева Е.В.²

¹Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина", Москва

²Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва
panteleev.vova205@yandex.ru

Белки-аргонаваты - катион-зависимые эндонуклеазы, использующие короткие гидовые нуклеиновые кислоты, для узнавания и специфического расщепления нуклеиновых кислот - мишеней. Белки-аргонаваты эукариот (eAgo) известны как участники РНК-интерференции. Гомологичные им прокариотические аргонаваты (pAgo) более разнообразны и мало исследованы. В отличие от eAgo, pAgo могут использовать ДНК в качестве гидов и мишеней (гДНК и тДНК соответственно). Вопросы, связанные с функциями pAgo в клетке, остаются открытыми. pAgo имеют большой потенциал использования в различных методиках *in vitro* и для геномного редактирования *in vivo*. Цель исследования - охарактеризовать особенности эндонуклеазной активности pAgo из мезофильной бактерии *Exiguobacterium marinum* - EmaAgo.

Для изучения свойств белка-аргонавата EmaAgo в системе *in vitro*, белок был экспрессирован в клетках *E. coli* и очищен с помощью металл-аффинной хроматографии и хроматографии на гепариновой колонке. Субстратную специфичность EmaAgo изучали с помощью линейных одноцепочечных ДНК или РНК-мишеней (50 нт) и комплементарных им гидовых ДНК или РНК (18 нт). Были использованы гиды с разными 5'-концевыми нуклеотидами, а также гиды фосфорилированные или не фосфорилированные по 5'-концу. Для определения предпочтительных параметров протекания реакции расщепления мишени были использованы буферные растворы с различным рН, ионной силой, различными двухвалентными катионами. Реакция проводилась при различных температурах. Также исследовали активность аргонавата со сверхспирализованной плазмидной ДНК в качестве мишени.

Согласно полученным данным, EmaAgo - активный мезофильный pAgo и предпочитает 5'-фосфорилированные-гДНК для разрезания тДНК. Наблюдается незначительное предпочтение к А в качестве 5'-концевого нуклеотида. Лучшее работает с Mn^{2+} в растворе и при 100мМ NaCl. Оптимум рН=7.4-8. По результатам опытов с плазмидой, EmaAgo способен к гид-независимой эндонуклеазной активности, но не способен к гид-опосредованной активности на двуцепочечной мишени в данных условиях.

Таким образом, показано, что белок аргонавт из бактерии *E. marinum* является ДНК-зависимой ДНК-нуклеазой и способен специфично расщеплять однонитевую ДНК при физиологической температуре.

2.17. ВЛИЯНИЕ микроРНК НА ЭКСПРЕССИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ВЫСОКОКОНСЕРВАТИВНОГО ГЕНА *Dras1*

Сивопляс Е.А.¹, Максимчук М.Д.¹, Белкина Е.Г.², Лазебный О.Е.², Куликов А.М.²

¹Московский педагогический государственный университет, Москва

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

sivoplyas-ekater@mail.ru

Нуклеотидная последовательность высококонсервативных генов является стабильной и незначительно изменяется от таксона к таксону. Такая особенность позволяет провести гомологический ряд от, например, насекомых до млекопитающих, по-видимому, у всех эукариот присутствуют микроРНК, которые представляют собой регуляторы экспрессии генов. В цитоплазме, где осуществляется контроль трансляции, конкретная микроРНК ищет мишень на мРНК, а найдя её - комплементарно связывается с последней. В дальнейшем может произойти деградация или ингибирование. Каждая микроРНК может контролировать сотни мРНК.

Объект нашего исследования - генетический аппарат дрозофил, в частности высококонсервативный ген *Dras1*. Продукт этого гена - белок - важный участник ферментативной реакции, участвующей в делении. Он передает сигнал от рецепторов к фосфотрансферазам. Синтез данного белка осуществляется в течение всей жизни у эукариот, а степень экспрессии зависит от регулирующих механизмов. Ошибки в последовательности таких генов при делении клетки, приводят к канцерогенезу.

В нашем эксперименте последовательность микроРНК связывается с матричной РНК гена *Dras1*, препятствуя началу синтеза белка на рибосоме. Путем биоинформационного анализа определены сайты посадки микроРНК. В дальнейшем были получены три линии дрозофил с гиперэкспрессией нескольких разновидностей микроРНК (miR-312, miR-313 и miR-92a). Для подтверждения связывания микроРНК с мРНК мы использовали репортерный ген флюоресцирующего белка GFP под промотором Gal4. Для дрозофил-трансформантов была разработана уникальная схема скрещивания. У особей, полученных в результате такого скрещивания, в отличие от исходных трансформантов, не наблюдалось свечения GFP.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00840 мол_а.

2.18. СИСТЕМЫ DGR В АНТИВИРУСНОМ ИММУНИТЕТЕ БАКТЕРИЙ

Соколов А.А.^{1,2}, Белалов И.Ш.^{1,3}, Летаров А.В.^{1,4}

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана, Москва

³Механико-математический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

⁴Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
sokolov.ars.a@gmail.com

Системы DGR (Diversity-generating retroelements) представляют из себя уникальное семейство генетических ретроэлементов, которые используют обратную транскрипцию для создания большого числа вариантов последовательности, в определенных участках генов белков-мишеней. Множество вариантов белка позволяет быстро адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды. Мы предположили, что DGR системы могут использоваться некоторыми бактериями в качестве основы системы приобретенного антифагового иммунитета, в некотором смысле аналогично соматической гипермутации в генах антител млекопитающих.

Для проверки гипотезы о связи DGR с иммунитетом бактерий были использованы данные о 948 уникальных DGR в геномах бактерий (Yan F. et al. Discovery and characterization of the evolution, variation and functions of diversity-generating retroelements using thousands of genomes and metagenomes. BMC Genomics. 2019). Первым этапом в исследовании был отбор генов - элементов потенциальных DGR (RT, TR, VR). Для этого был использован протокол ICITY (Shmakov, S.A. et al. Systematic prediction of functionally linked genes in bacterial and archaeal genomes. PNAS. 2019). Данный пайплайн был применен к RT, TR и VR по отдельности. По итогам данного этапа были отобраны 448 потенциально связанных с DGR белков. Вторым этапом стала филогенетическая кластеризация, по результатам которой было получено 26 кластеров, содержащих 266 белков. Далее, нами были рассмотрены данные о 780 уникальных белковых семействах (pfam, COG) с предсказанными анти-фаговыми иммунными функциями (Doron S. et al. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. Science. 2018). Эти pfam и COG были использованы как база данных для RPS-BLAST белков из предыдущего этапа, в результате чего мы получили 7 уникальных белков. Заключительным этапом стал анализ VR содержащих белков, на котором были проведены процедуры, аналогичные предыдущим двум этапам. В результате, были получены данные о 15 уникальных белках.

Таким образом, для экспериментальной проверки в нашей лаборатории отобраны 15 VR-содержащих белков и 7 белков, функционально взаимодействующими с DGR, с высокой вероятностью одновременно задействованных в антифаговом иммунитете бактерий.

2.19. РАЗРАБОТКА МЕТОДА МАССИРОВАННОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РЕПЕРТУАРОВ ГЕНОВ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЧЕЛОВЕКА НА ПЛАТФОРМЕ OXFORD NANOPORE

Ткаченко В.К.¹, Лебедев Ю.Б.², Мамедов И.З.^{2,3}, Комков А.Ю.^{2,3}

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва
tkachenko.vk@phystech.edu

Массированное таргетное секвенирование репертуаров генов Т-клеточных рецепторов (TCR) является мощным инструментом для изучения адаптивного иммунитета и в настоящее время применяется для анализа Т-клеточного ответа на вирусные инфекции и аутоантигены, анализа клональности при лейкозах и лимфомах, а также исследования лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль. Большинство существующих методов реконструкции репертуаров TCR основано на секвенировании на платформах Illumina. Однако стоимость самих приборов и их обслуживания существенно лимитирует процесс внедрения этих методов в научную и клиническую практику. Одним из способов преодоления этого ограничения является использование альтернативной технологии секвенирования - Oxford Nanopore (ON). Основной целью данного исследования является разработка метода получения библиотек генов TCR для секвенирования на платформе ON. Для получения геномных библиотек была использована ДНК из клеток периферической крови здорового донора. На первой стадии с помощью мультиплексной ПЦР были получены ампликоны генов альфа и бета цепей TCR, в которые с помощью ПЦР были введены адаптеры и индексы для секвенирования на платформе Illumina. Полученные индексированные ампликоны были использованы для получения библиотеки для секвенирования по технологии ON. Поскольку точность секвенирования на ON сильно зависит от длины фрагментов ДНК, имеющиеся ампликоны (400 п.о.) были собраны в конкатемеры. Для создания перекрывающихся концов с помощью ПЦР в ампликоны были введены адаптеры с палиндромной последовательностью длиной 20 нт. Полученные мономеры с помощью сборки по Гибсону (NEBuilder HiFi DNA Assembly kit, NEB) были объединены в гексамеры (~2400 п.о.). Мономеры и конкатемеры меньшей длины были удалены с помощью магнитных частиц SPRI (Beckman Coulter). Гексамеры были использованы для получения финальной библиотеки для ON по протоколу производителя. Таким образом, был разработан метод последовательного получения библиотек для секвенирования репертуаров генов TCR на платформах Illumina и ON.

Исследование поддержано РФФИ (грант № 20-015-00462).

2.20. АКТИВНОСТЬ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ X-СЕМЕЙСТВА ЧЕЛОВЕКА НА МЕТИЛИРОВАННЫХ ДНК-МАТРИЦАХ

Хрячкова А.Ю.^{1,2}, Шилкин Е.С.², Петрова Д.В.³, Жарков Д.О.^{3,4},
Макарова А.В.²

¹МИРЭА - Российский технологический университет, Москва

²Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск

⁴Новосибирский государственный университет, Новосибирск
stasey9909@mail.com

Модификация оснований ДНК играет ключевую роль в эпигенетической регуляции работы генов, дифференцировке клеток и канцерогенезе. 5-метилцитозин (mC) и продукт его окисления - 5-гидроксиметилцитозин (hmC) - относятся к числу наиболее распространённых модификаций ДНК и располагаются преимущественно в CpG-сайтах. Вследствие спонтанного дезаминирования mC образуется T, поэтому такие сайты являются горячими точками мутагенеза геномной ДНК. Нуклеотидные замены C→T в CpG-сайтах в сиквенс-контексте 5'-TCG-3' часто встречаются во многих типах опухолей. К распространённым спонтанным повреждениям в CpG-сайтах также относятся дезаминирование C с образованием урацила и окисление G до 8-охо-G. Предполагается, что одним из механизмов мутагенеза в CpG-сайтах может быть промутагенный синтез ДНК напротив mC и hmC репаративными ДНК-полимеразами X-семейства Pol β или Pol λ, участвующими в эксцизионной репарации урацила и 8-охо-G.

В работе проведен анализ активности Pol beta и Pol lambda человека на ДНК-матрицах, содержащих mC, hmC и 8-охо-G в сиквенс-контексте 5'-TCG-3'. Показано, что mC и hmC не влияют на ДНК-полимеразную активность и спектр включаемых нуклеотидов Pol beta и Pol lambda на матрицах с неповрежденным G. Наличие в матричной цепи 8-охо-G приводит к сильному ингибированию активности Pol lambda, однако метилирование соседнего матричного C не изменяет точности фермента. В то же время Pol beta значительно эффективнее синтезирует ДНК на 8-охо-G содержащих матрицах, хотя влияния метильной группы C на точность синтеза также не наблюдали.

Работа выполнена при поддержке РФФИ-комфи 17-00-00264 (МАН) и РФФИ-комфи 17-00-00261 (ДОЖ).

2.21. ЗОНДИРОВАНИЕ G-КВАДРУПЛЕКСНЫХ СТРУКТУР В ПРОТЯЖЕННОЙ ДНК ПРОМОТОРА ОНКОГЕНА MYC

Чащина Г.В.^{1,2}, Лукьянова А.В.^{1,2}, Бениаминов А.Д.¹, Калюжный Д.Н.¹

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

²Московский физико-физический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный
chashchina.g.v@gmail.com

Регуляторные участки генома человека, богатые GC парами, способны формировать альтернативные структуры ДНК, называемые G-квадруплексные (G4). Образование таких структур предположительно регулирует экспрессию генов и уровень метилирования промоторов. Структурные характеристики G4 ДНК известны из исследований одонитевых фрагментов ДНК, а в составе двойной спирали практически не изучены.

В качестве модельной системы мы использовали фрагмент ДНК из промотора онкогена MYC длиной 401 пар оснований, полученный ПЦР-амплификацией геномной ДНК линии клеток Raji. Ранее для последовательности промотора гена MYC мы показали образование трех возможных параллельных G4-структур, вызывающих остановки ДНК-полимеразы [1]. Для выявления и характеристики образования G4-структур был применен метод окисления гуанинов в G4 структурах порфириновым производным ZnP1 [2]. Образец, содержащий G4-структуры в двунитевой ДНК был получен медленным отжигом в условиях молекулярного краудинга. Оказалось, что гуанины на 5'-конце каждого блока в G-богатой области окислялись сильнее, чем в двойной спирали не отожденного фрагмента ДНК, что подтверждает образование параллельной G4-структуры в составе двойной спирали ДНК. Фотоиндуцированное окисление приводило к конформационному переходу из сформированной G4-структуры обратно в двойную спираль ДНК.

Таким образом, фотоиндуцированное окисление ДНК может быть использовано для изучения G4 структур в двойной спирали ДНК, а порфирин ZnP1 является инструментом для изучения структурных свойств ДНК, а также для направленного разрушения G4-структур.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 20-14-00332.

Литература:

1. Чащина Г.В., Бениаминов А.Д., Калюжный Д.Н. Стабильные G-квадруплексы промоторов онкогенов вызывают зависимость от ионов калия остановки термостабильной ДНК полимеразы // Биохимия, 2019. № 5. С.730-738.
2. Benjaminov, A. D., R. A. Novikov, O. K. Mamaeva, V. A. Mitkevich, I. P. Smirnov, M. A. Livshits, A. K. Shchyolkina and D. N. Kaluzhny. Light-induced oxidation of the telomeric G4 DNA in complex with Zn(II) tetracarboxymethyl porphyrin // Nucleic Acids Res., 2016, Vol. 44, No. 21, P. 10031-10041.

2.22. ДНК-ПОЛИМЕРАЗНАЯ И ТРАНСЛЕЗИОННАЯ АКТИВНОСТИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ P118L И P365R POL ИОТА ЧЕЛОВЕКА

Шилкин Е.С., Макарова А.В.

Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва
shilkinevgeniy.chem@gmail.com

Транслезионный синтез (ТЛС) - процесс синтеза ДНК на матрицах, содержащих повреждённые основания ДНК. ТЛС является одним из механизмов толерантности клетки к повреждениям ДНК. ДНК-полимераза Pol *iota* человека относится к Y-семейству полимераз, играющих ключевую роль в транслезионном синтезе. Нарушение работы Pol *iota* ассоциировано с увеличением скорости накопления мутаций и повышенным риском развития онкологических заболеваний. Мутации и некоторые полиморфизмы Pol *iota* связаны с повышенным риском канцерогенеза.

В настоящей работе впервые охарактеризованы полиморфные формы Pol *iota* человека с аминокислотными заменами P118L и P365R в активном центре. В ходе работы получены генетические конструкции, несущие гены полиморфных форм Pol *iota*. Ферменты выделены из клеток *S. cerevisiae* с помощью аффинной хроматографии. Показано, что общая ДНК-полимеразная активность полиморфных форм на неповрежденных ДНК-матрицах не отличается от активности белка дикого типа. Однако, форма P365R продемонстрировала изменения в спектре включаемых нуклеотидов напротив матричного C. Протестирована транслезионная активность форм Pol *iota* на матрицах, содержащих распространенные повреждения ДНК - АП-сайт, 8-оксо-Г и 1,N6-этенoadенин. Показано, что активность формы с заменой P365R значительно ингибируется напротив 8-оксо-Г, тогда как напротив АП-сайта у этой формы изменяется спектр включаемых нуклеотидов по сравнению с белком дикого типа.

Работа выполнена при поддержке РФФИ-комфи 17-00-00264.

СЕКЦИЯ 3

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ, УГЛЕВОДОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

3.1. АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АЛЛЕНОКСИДСИНТАЗЫ В AOS-RNAi РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ

Буряк В.И.¹, Пиголов А.В.², Мирошниченко Д.Н.³, Клементьева А.А.³

¹Тульский государственный университет, Тула

²ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино

³Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

Vlada.buryak@gmail.com

Жасмонаты - это фитогормоны, которые по своей химической природе являются оксипипинами - окисленными производными жирных кислот. В растениях жасмонаты выполняют разнообразные биологические функции, такие как контроль фертильности, стимулирование защитных реакций, замедление роста, подавление фотосинтеза. Функции жасмонатов в пшенице мало исследованы, и растения, в которых подавлен биосинтез жасмонатов, представляют собой удобный инструмент для изучения функций этих гормонов.

Консервативный биологический ответ на двухцепочечную РНК, также известный как РНК-интерференция (RNAi) или пост-транскрипционное замалчивание генов, обеспечивает устойчивость организма к нуклеиновым кислотам патогенов. В современной биологии этот механизм, присущий многим организмам, используют для подавления экспрессии генов. Подход RNAi был использован для подавления экспрессии гена алленоксидсинтазы (*AOS*) - первого гена жасмонатной ветви пути биосинтеза оксипипинов. Для РНК-интерференции в исследуемых линиях был использован фрагмент гена из центральной консервативной части белок-кодирующей последовательности гена *AOS*, что должно привести к замалчиванию всех аллелей *AOS* в трансгенных растениях пшеницы.

Анализ относительной экспрессии гена *AOS* был проведен с помощью оборудования и программного обеспечения Roche Lightcycler 96. Для анализа были использованы независимые RNAi трансгенные линии, в качестве контроля использовали нетрансгенные растения Саратовская-60 и ранее исследованные трансгенные растения, с повышенной экспрессией гена *AOS*. В ходе анализа было обнаружено, что RNAi растения характеризуются более высокой экспрессией *AOS*, чем контрольные линии. Этот результат оказался неожиданным. Для выяснения причин такого эффекта требуются дальнейшие исследования.

3.2. МЕХАНИЗМЫ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ N-АЦИЛДОФАМИНОВ НА КЛЕТКИ НЕОПЛАЗИЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Гамисония А.М.^{1,2}, Акимов М.Г.¹, Бобров М.Ю.^{1,2}, Грецкая Н.М.¹, Безуглов В.В.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва
alyafonya@mail.ru

N-ацилдофамины (NADA) представляют собой семейство эндогенных амидных производных жирных кислот, действующих на ключевые белки каннабиноидно-ванилоидной системы. Было установлено, что соединения этой группы являются важнейшими биорегуляторами, обладающими широчайшим спектром действия и участвующими во многих физиологических и биохимических процессах. Среди всего многообразия функций N-ацилдофаминов особое внимание привлекает их способность оказывать существенное влияние на жизнеспособность клеток, вызывая гибель опухолевых клеток. Несмотря на выраженный цитотоксический эффект данных соединений, механизм их действия остаётся малоизученным. Выяснение механизма действия природных N-ацилдофаминов является актуальной задачей для понимания их роли в регуляции процессов в клетках, а также для раскрытия терапевтического потенциала этих соединений и их аналогов (в частности, для разработки противоопухолевых препаратов). Цель данной работы - раскрыть классические и неклассические механизмы цитотоксического действия природных ацилдофаминов и их аналогов на клетки неоплазий млекопитающих: клетки феохромоцитомы PC12 и клетки эутопического и эктопического эндометрия, полученные от пациенток с эндометриозом.

Мы установили, что мишенью NADA на клетках феохромоцитомы PC12 является рецептор non-CB1/CB2 GPR55. Этот рецептор передает сигнал на фосфолипазу C, которая генерирует инозиттрифосфат (IP3), вызывающий высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных пулов через IP3-рецептор. Ca^{2+} через кальмодулин и протеинкиназу CaMKIV активирует фактор транскрипции CREB, который обеспечивает экспрессию нейрональной NO-синтазы, последующую генерацию NO и АФК. Далее сигнал через чувствительную к АФК протеинкиназу ASK1 передается на протеинкиназу JNK и происходит запуск внутреннего пути апоптоза с активацией каспаз 9 и 3. В дополнение к данному пути зафиксированы дополнительные ветви с участием протеинкиназы G, гуанилилциклазы, белка Ras и калпаина, которые предположительно служат для усиления и дублирования сигнала. Мишенью NADA на клетках эндометрия и очагов эндометриоза является рецептор CB1. Этот рецептор передает сигнал на SPT, которая способствует стимуляции синтеза церамида, далее сигнал через белок p38 приводит к последующей индукции апоптоза по каспаза-зависимому пути. Установлено, что развитие сигнального каскада через рецептор GPR55 является неклассической моделью токсичности N-ацилдофаминов по отношению к опухолевым клеткам. В свою очередь на клетках эутопического и эктопического эндометрия реализуется классическая модель токсичности через CB1 рецептор.

Таким образом, нам впервые удалось полностью и детально охарактеризовать классические и неклассические пути передачи внутриклеточного сигнала NADA при индукции клеточной смерти клеток неоплазий млекопитающих.

3.3. ФУНКЦИОНАЛЬНО-СПЕЙСЕРИРОВАННЫЕ КОНСТРУКЦИИ КАК ИНСТРУМЕНТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВИРУСА ГРИППА

Ермолаева Д.Р.¹, Рыжов И.М.², Бовин Н.В.², Zubkova O.⁴, Шилова Н.В.^{2,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

³НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Россия

⁴Ferrier Research Institute, Victoria University of Wellington, New Zealand
ermolaeva.diana.97@mail.ru

На поверхности вируса гриппа (ВГ) находятся два углевод-связывающих белка - гемагглютинин и нейраминидаза, они отвечают за взаимодействие клетки хозяина с вирусной частицей. С помощью гликоципа, содержащего более 400 гликанов, было установлено, что ряд вирусов человека и птиц распознают не только классические сиалилированные лиганды, но и ряд сульфатированных гликанов - моно- и ди-сульфатированные производные N-ацетиллактозамина (LacNAc), изолактозамина, 3-O-Su-GalNAc β и др. Для выяснения роли сульфатированных лигандов в адгезии ВГ были синтезированы их липидные производные. Производные отличались по плотности сульфатов (на примере моносульфатированного 4'SuLacNAc и персульфатированной мальтозы (perSuMalt) и по длине спейсера, соединяющего гликановую и липидную части (длинный карбоксиметилглицильный (CMG) и короткий адипиновый (Ad)). В качестве липидной части выступал 1,2-диолеил-фосфатидилэтаноламин (DOPE).

Синтез гликолипида с длинным спейсером 4'SuLacNAc-CMG-DOPE осуществляли в два этапа: реакцией аминоэтилгликозида с Ad(ONSu)₂ получали активированный эфир, который затем конденсировали с CMG-производным, содержащим DOPE. Синтез гликолипида с коротким спейсером 4'SuLacNAc-Ad-DOPE осуществляли конденсацией аминоэтилгликозида с активированным эфиром DOPE-Ad-ONSu. Вещества были синтезированы с выходами 68% и 81,5%, соответственно. Синтез гликолипидов perSuMalt-CMG-Ad-DOPE, (perSuMalt)₂-CMG-Ad-DOPE и (perSuMalt)₃-CMG-Ad-DOPE осуществлялся путем конденсации CMG-производного, содержащего пентинильный фрагмент, с производным perSuMalt, несущим терминальную азидную группу в спейсерном фрагменте, то есть при помощи "click"-реакции. Катализ осуществляли ионами Cu⁺, генерируемыми в реакционной смеси восстановлением Cu²⁺ аскорбатом натрия в присутствии лиганда THPTA. Выходы веществ составили 63%, 52% и 23%, соответственно.

Встраивание липидных конъюгатов в клетки дает возможность изучать роль сульфатированных гликанов в адгезии ВГ.

3.4. D-SELF МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ГЛИКОГЕНА НА ОСНОВЕ ЭМПИРИЧЕСКИХ КОЭФФИЦИЕНТОВ АВТОМОДЕЛЬНОСТИ

Иванов-Ростовцев П.А.

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва
rostovtsevp@gmail.com

В работе [1] исследовалась возможность периодического накопления гликогена дрожжей в часовых и минутных временных масштабах. Гранулы гликогена, в свою очередь, различаются по возрасту, по размерам, концентрации, и локализации в цитоплазме.

Для анализа структуры гликогена в предлагаемой работе исследуется масштабная самоорганизация гранул гликогена путем моделирования по методу D-SELF [2]. Результатом моделирования является построение нулевой (базовой) структуры гликосомы, относительно которой могут рассматриваться реальные процессы роста и распада гликогена.

В качестве граничных уровней при моделировании используются эмпирические коэффициенты из работы [3], где исследуется масштабное структурирование различных геодинамических процессов различной природы с точки зрения их устойчивости к внешним воздействиям.

Полученные результаты моделирования предполагается проверить экспериментально с целью уточнения эмпирических коэффициентов и границ применимости базовой модельной структуры гликосомы.

Литература:

1. Иванов-Ростовцев П.А. D-SELF моделирование устойчивости роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при корреляции активностей углекислоты и гликогена // Гены и клетки. Т. XV, № 3, Приложение, 2020, С.188.
2. Degtyarev G.M. et al. "Space-time symmetry in open dynamic systems (D-SELF model)". *Sov. Phys. Dokl.* 1990; 35(12):1062-1064.
3. Садовский М.А. Автомоделность геодинамических процессов // Садовский- М.А. Избранные труды. - М : Наука, 2004. - С. 363-368.

3.5. ВСТРАИВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЛИКОЛИПИДОВ В БАКТЕРИИ И КЛЕТКИ

Комарова В.А., Рапопорт Е.М., Рыжов И.М., Попова И.С., Тузиков А.Б., Бовин Н.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
veronika12.98@yandex.ru

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что гликолипиды, высвобождающиеся из клетки, могут встраиваться в другие клетки, или бактерии. В результате, по липидному составу мембрана клетки (или бактерии) акцептора приобретает некоторые черты клетки-донора. Такое маскирование под "свое" может привести к тому, что клетки (бактерии) - акцепторы не будут узнаваться эффекторами врожденного и приобретенного иммунитета, а значит в случае переноса липидов на бактерии способствовать распространению инфекции.

Целью данного исследования было исследовать кинетику встраивания из окружающей среды липидов в клетки и бактерии. В качестве объекта были использованы синтетические аналоги природных гликолипидов, получившие родовое название FSL (functional spacer lipid); благодаря наличию остатка DOPE (1,2-*O*-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина) они сохраняют способность природных прототипов встраиваться в мембрану клетки (Frame et al., Transfusion, 2007 47: 876-882). Были использованы три конструкта, отличающиеся по остатку F: FSL-A^{tetra} (GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β), который по размеру гликана и гидрофильно-гидрофобному балансу похож на низшие гликофинголипиды, FSL-Fluo, в котором гликанового остатка нет вовсе, FSL-HA, с очень большим гликаном, флуоресцентно-меченой гиалуроновой кислотой (~26-олигосахарид). Показано, что: 1) в клетки накопление FSL-A и FSL-HA происходило медленнее, чем FSL-Fluo, однако, существенного различия между FSL-A и FSL-HA не наблюдалось. 2) Гликолипиды в клетках с разной толщиной гликокаликса накапливались в первые три часа. 3) Также как в случае эукариотических клеток, размер и заряд гликана не влиял на накопление липида в грамположительные бактерии, а именно FSL-A и FSL-HA встраивались в бактерии штамма золотистого стафилококка *St. aureus* O15 в течение первых 5 мин. 3) Встраивание липидов в грамотрицательные бактерии происходило медленнее, чем в грамположительные, а именно в бактерии *E.coli* K12 конструкты FSL-Fluo и FSL-A встраивались в течение 20 мин, а FSL-HA не встраивался вовсе. В целом, встраивание FSL в бактерии происходило быстрее, чем в эукариотические клетки. Размер и заряд гликана влиял на встраивание FSL в бактерии. Полученные данные являются важной информацией для дальнейшего исследования обмена липидов между клетками и бактериями.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 20-04-00677.

3.6. УЧАСТИЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ В АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

Дипатников А.Д.¹, Пазынина Г.В.², Бовин Н.В.², Шилова Н.В.^{2,3}

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова, Москва
Alex.9508@yandex.ru

Антигликановые антитела (АГАТ) являются частью пула естественных антител, появляющихся без дополнительной стимуляции и выполняющих, в том числе, функцию элиминирования патологически измененных клеток. Механизм их действия пока остается неясным. Целью данной работы является изучение роли АГАТ в активации комплемент-зависимой цитотоксичности.

Исследовались антитела к опухоль-ассоциированным антигенам LeC (Gal β 1-3GlcNAc β) и Tn (GalNAc α), выделенные аффинной хроматографией из пула сывороток крови условно здоровых доноров; источником комплемента служила сыворотка крови условно здорового донора. Цитотоксичность антител определяли путем измерения интенсивности поглощения гемоглобина, выделяемого при гемолизе кодецитов - эритроцитов, модифицированных гликолипидами, несущими остатки либо LeC, либо Tn, - последовательно инкубированных с исследуемыми антителами и сывороткой крови того же донора, чьи эритроциты были взяты в эксперимент.

Было обнаружено, что гемолиз наблюдается только в комплементарных парах и практически отсутствует в контрольных образцах (при использовании немодифицированных эритроцитов, в присутствии ингибитора каскада комплемента ЭДТА, а также после блокирования предсуществующих сывороточных антител мономерными гликанами). Таким образом, исследованные АГАТ могут вызывать комплемент-зависимую цитотоксичность, связываясь со своим антигеном на поверхности клеток. Таким образом, естественные антитела, привлекая систему комплемента, могут выполнять в организме функцию "домашней хозяйки", удаляя аберрантно гликозилированные опухолевые клетки.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00749.

3.7. ЛИОТРОПНЫЕ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ НЕОГЛИКОЛИПИДОВ

Масленников А.М.^{1,2}, Шестопалова М.С.^{1,3}, Залыгин А.В.¹, Штыкова Э.В.⁴, Олейников В.А.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

³Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва

⁴Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ "Кристаллография и фотоники" РАН, Москва

antonmaslennikov@yandex.ru

Природные гликолипиды встречаются преимущественно в составе различных плазматических мембран, в которых наиболее вероятно выполняют рецепторную функцию. Неогликолипиды представляют собой аналог природных гликолипидов, они получаются конъюгацией олигосахаридов с липидами, содержащими функциональную группу. Разнообразие функциональных групп, связанных с липидной частью позволяет получать различные модифицированные поверхности мембран, которые нашли применение как в медицинской диагностике, так и в биофизике. Несмотря на синтетическую природу, составляющие части молекул неогликолипидов встречаются в тканях организма человека, следовательно, они являются биосовместимыми, что делает их также подходящими компонентами липидных транспортных систем для доставки лекарственных веществ или матрицами для лекарственных веществ при их трансдермальном транспорте. Также за счёт своей амфифильной природы данная группа веществ может выступать в качестве эмульгаторов.

В данной работе изучалась лиотропная жидкокристаллическая система (ЖК-система), полученная из биотинового конструктора biot-CMG(2)-Ad-DOPE в натрий-фосфатном буфере (PBS). Так как липиды и фосфолипиды, составляющие клеточные мембраны и в ряде случаев межклеточное пространство, а в особенности роговой слой эпидермиса, находятся в жидкокристаллическом состоянии, исследование биосовместимых ЖК-систем может представлять интерес для усовершенствования методов транспорта и доставки лекарственных веществ.

Для исследования использовались метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), так как данный метод является неразрушающим, что позволило провести исследования без нарушения кристаллической структуры ЖК-системы.

Был получен ряд спектров МУРР, на основе которого были определены характерные размеры и индексы Миллера, описывающие кристаллическую решётку, наблюдаемую в исходной лиотропной ЖК-системе, а также в системе, полученной из исходной путём добавления электролита в концентрации, превышающей физиологические пределы. Полученные данные свидетельствуют о нормальном гексагональном типе кристаллической решетки исходной ЖК-системы, а добавление электролита приводит к существенной компактизации кристаллической решётки.

Данная работа позволила получить сведения о структуре лиотропных ЖК-систем, образующихся в растворах неогликолипидов, а также о возможности влиять на размеры элементарной ячейки кристаллической решётки путём добавления электролита. Полученные результаты допускают возможность получения лиотропной ЖК-системы с заданными параметрами кристаллической решётки путём варьирования концентрации электролита, находящегося в системе.

3.8. ГЛИКОЭРРЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УГЛЕВОД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ РАСТЕНИЙ

Никифорова А.В.¹, Патова О.А.², Хлопин В.А.², Бовин Н.В.¹,
Шилова Н.В.^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Институт физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар

³НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.

Кулакова, Москва

nikiforovaalica@gmail.com

Углевод-связывающие белки (УСБ) растений играют основополагающую роль в функционировании растительных клеток. Однако, они по-прежнему остаются малоизученными - известно лишь небольшое количество охарактеризованных УСБ с описанием их гликановой специфичности, локализации и функциональной роли. Основная причина - отсутствие подходящих инструментов для выявления новых и изучения тонкой специфичности уже известных белков. Технология гликоэкреев (или гликочипов) является незаменимым инструментом в решении подобных задач. В настоящем исследовании был создан гликочип, представляющий собой эпоксид-активированную подложку, на которую иммобилизовано более 30 пектиновых полисахаридов (ПС), выделенных из различных растительных источников: галакт-, рамногалакт-, апиогалакт-, ксилогалактуронаны, а также арабиногалактаны (высоко- и низкоэтерифицированные, со слабо разветвленными и разветвленными боковыми цепями). Факт иммобилизации ПС подтверждали с помощью коммерчески доступного набора растительных лектинов известной специфичности, а также стандартной плазмы крови человека группы крови А(II). В обоих случаях наблюдалось связывание с апио- и рамно-, галактуронанами (со слабо разветвленными и разветвленными боковыми цепями) и арабиногалактанами. Лектины распознавали также ксилогалактуронан и низкоэтерифицированный пектин. Таким образом, был подтвержден факт иммобилизации 25 из 31 ПС на созданном гликочипе. Чтобы увеличить надежность растительного эррея, планируется применить неспецифический подход для подтверждения факта иммобилизации лигандов путем периодатного окисления ПС с последующим флуоресцентным мечением по полученным альдегидным группам. Следует отметить, что при использовании плазмы крови количество значимых сигналов было больше при высокой концентрации ПС - 100 мкг/мл, а при использовании лектинов - при низкой (20 мкг/мл).

Исследование проводилось при поддержке гранта РНФ № 20-63-47110.

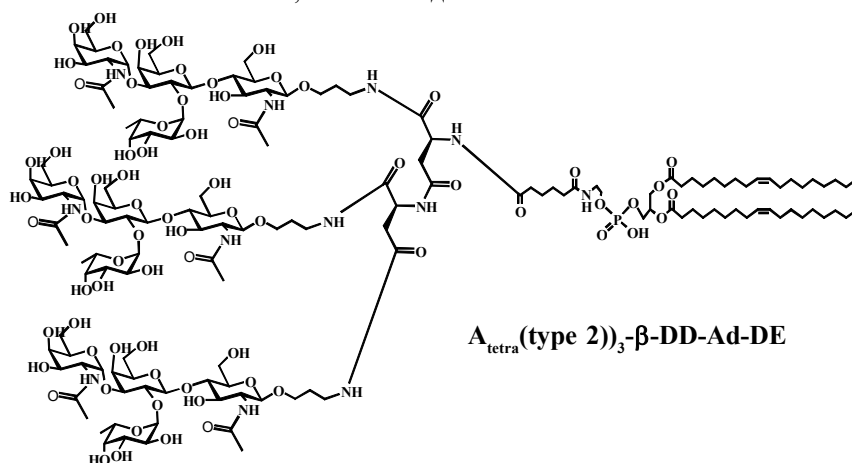
3.9. СИНТЕЗ FSL-КОНСТРУКТА НА ОСНОВЕ КЛАСТЕРА (A_{tetra}(ТИП 2))₃-β-DD

Петракова Д.О.¹, Рыжов И.М.², Тузиков А.Б.², Бовин Н.В.²

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
d.petrakova2000@yandex.ru

FSL-конструктами называют молекулы, состоящие из функциональной части (F), спейсера (S) и липида (L). FSL обладают способностью самостоятельно встраиваться в мембрану живых клеток, не нарушая их жизнедеятельность, и придавать им свойства, заданные функциональной частью, которая может иметь различную природу (гликан, пептид, биотин и т.д.). В частности, в роли функциональной части может выступать кластер, состоящий из олигомера аспарагиновой кислоты, к которому присоединены несколько углеводных фрагментов. В ряде экспериментов такие FSL демонстрировали лучшее связывание с соответствующими анти-гликановыми антителами, чем FSL с единичным гликаном.



A_{tetra}(type 2))₃-β-DD-Ad-DE

Рис. 1

Для более детального изучения взаимодействия таких кластеров с антителами мы синтезировали FSL (A_{tetra}(type 2))₃-β-DD-Ad-DE (Рис. 1). Для этого 3-аминопропил гликозид тетрасахарида Å (тип 2) конденсировали с димером аспарагиновой кислоты β-DD-NHZ, затем деблокировали аминогруппу, а полученный амин вводили в реакцию с активированным эфиром DE-Ad-ONSu, (Ad - остаток адипиновой кислоты, а DE - диолеилфосфатидилэтаноламин).

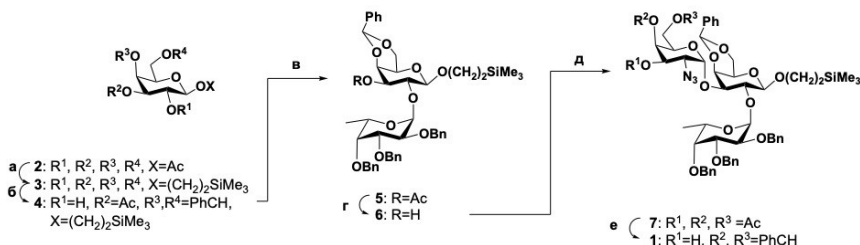
3.10. СИНТЕЗ А-ТРИСАХАРИДНОГО БЛОКА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕПТАСАХАРИДА А (ТИП 3)

Савченко М.С.^{1,2}, Рыжов И.М.¹, Попова И.С.², Бовин Н.В.²

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
sms21297@gmail.com

Гептасахарид А (тип 3) GalNAc1-3[Fucβ1-2]Galβ1-3GalNAc1-3[Fucβ1-2]Galβ1-4GlcNAcβ определяет качественное различие подгрупп крови A1 и A2 - он обнаруживается на A1-эритроцитах, но отсутствует на A2-эритроцитах. Структурно он может быть представлен как два последовательных фрагмента трисахарида А GalNAc1-3[Fucβ1-2]Galβ, связанных с О-4 остатка β-N-ацетилглюкозамина. Для получения этого гептасахарида необходим центральный А-трисахаридный блок **1** (Рис. 1), имеющий аномерную защитную группу в звене Galβ и свободную 3-ОН-группу в звене α-GalN₃.



а) 1) AcBr, MeOH, AcOH/CH₂Cl₂, 2) HO(CH₂)₂SiMe₃, AgOTf, TMM/CH₂Cl₂ (68%), 6) 1) MeONa/MeOH, 2) PhCH(OMe)₂, TsOH/CH₃CN, (85%) 3) N-ацетилимидазол/CH₂Cl₂ (81%), в) Bn₃FucBr, AgOTf, TMM/CH₂Cl₂, г) MeONa/MeOH (45% на 2 стадии), д) Ac₃GalN₃OTf, TMSOTf/Et₂O (80%), е) 1) MeONa/MeOH, 2) PhCH(OMe)₂, TsOH/CH₃CN (83%).

Рис. 1.

Трисахарид **1** получали путем, представленным на Рис. 1. Перацетат галактозы **2** превращали в гликозил-бромид и вводили в реакцию с 2-триметилсилилэтанолам. Полученный гликозид **3** защищали так, чтобы освободить 2-ОН-группу (соединение **4**), фукозилировали и дезацетилировали, что приводило к дисахаридному гликозил-акцептору **6**. Гликозилирование производного **6** ацетилированным трихлорацетимидатом 2-азидогалактозы приводило к α-гликозиду **7**. Дезацетилирование и последующее бензилиденирование соединения **7** давали требуемый блок **1**.

СЕКЦИЯ 4

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

4.1. СИНТЕЗ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГКР- УСИЛИВАЮЩИХ КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРОВ СЕРЕБРА

Алтунина А.В.^{1,2}, Шестопалова М.С.¹, Залыгин А.В.^{1,2}, Олейников В.А.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский педагогический государственный университет, Москва
aaltuninav@gmail.com

Рамановская спектроскопия является перспективным методом оптической колебательной спектроскопии. В настоящее время спектроскопия комбинационного рассеяния находит множество применений, в частности, в биологической и медицинской диагностике. Спектроскопия комбинационного рассеяния требует минимальной подготовки образца. Однако если концентрация вещества в растворе мала или его собственный спектр слишком слаб, его спектр может быть усилен с помощью метода гигантского комбинационного рассеяния света, основанного на эффекте плазмонного резонанса на наноструктурированной поверхности благородных металлов, для чего применяются коллоидные растворы благородных металлов.

В данной работе были синтезированы три типа золей серебра: боргидридный, цитратный и хлоридный. Для проверки коэффициента усиления гигантского комбинационного рассеяния света в качестве образцов были использованы водный раствор фенилаланина в концентрации 10^{-3} М (так как при возбуждении на длине волны 532 нм его пик на 1000 см^{-1} может эффективно применяться для подсчета коэффициента усиления), а также раствор цитохрома С в фосфатном буфере в концентрации 10^{-5} М (так как он является распространенным доступным модельным веществом со значительно более сложной структурой).

Были получены спектры комбинационного рассеяния и гигантского комбинационного рассеяния света на длине волны возбуждения 532 нм и мощностью на образце 3,15 мВт со временем накопления 100с. После чего был произведен подсчет и сравнительный анализ коэффициентов усиления различных типов золей для двух модельных веществ. Боргидридный, цитратный и хлоридный золи на фенилаланине дали усиление в 11, 160 и 9 раз соответственно, а на цитохроме С в 33, 163 и 23 соответственно, что свидетельствует о том, что в ходе исследования сложных органических молекул методом гигантского комбинационного рассеяния для анализа коэффициентов усиления эффективнее использовать цитохром С.

4.2. ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ОДИНОЧНЫХ ЧАСТИЦ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРУКТУРЫ МОНОНУКЛЕОСОМ

Андреева Т.В.¹, Чертков О.В.¹, Малюченко Н.В.¹, Студитский В.М.^{1,2},
Феофанов А.В.^{1,3}

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, 19111-2497, USA

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва, Россия

andreeva.tatyana.2014@post.bio.msu.ru

Нуклеосомы являются структурной единицей хроматина. Существуют различные факторы, оказывающие воздействие на структурную организацию ДНК в хроматине. Мононуклеосомы являются удобной модельной системой, которую можно использовать для исследования влияния таких факторов.

Флуоресцентная микроскопия одиночных частиц является одним из перспективных методов изучения структурной организации мононуклеосом. Метод основан на эффекте Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET), который происходит на небольших расстояниях между двумя флуоресцентными метками. Главным достоинством метода является возможность детектировать изменения в структуре каждой нуклеосомы индивидуально, выявляя отличающиеся по структуре субпопуляции нуклеосом.

В зависимости от задач в исследованиях применяются нуклеосомы с различной структурой линкерной ДНК. Цель данной работы - сравнить структуру нуклеосом в области входа линкерной ДНК в нуклеосому для мононуклеосом с одним коротким (20 п.н.) линкером (LN20) и мононуклеосом с одним длинным (135 п.н.) линкером (LN135) в отсутствии и присутствии ионов Mg^{2+} . LN20 применяются нами в исследованиях взаимодействий нуклеосом с белковыми факторами, а LN135 используются в экспериментах по транскрипции РНК-полимеразой.

Установлено, что LN135 имеют более компактную укладку ДНК вблизи ее входа в нуклеосому, чем LN20. Это может быть связано с взаимным сближением витков ДНК и снижением их подвижности в LN135, предположительно, вследствие более сильного взаимодействия длинной линкерной ДНК с хвостами гистонов по сравнению с LN20.

Добавление Mg^{2+} не приводит к исчезновению структурных различий между LN20 и LN135. Ионы Mg^{2+} не вызывают достоверных структурных изменений в LN135. В тоже время ионы Mg^{2+} снижают эффективность FRET в LN20, по-видимому, вследствие конкуренции с гистонами за связывание с ДНК вблизи входа в нуклеосому и усиления, так называемого, "нуклеосомного дыхания".

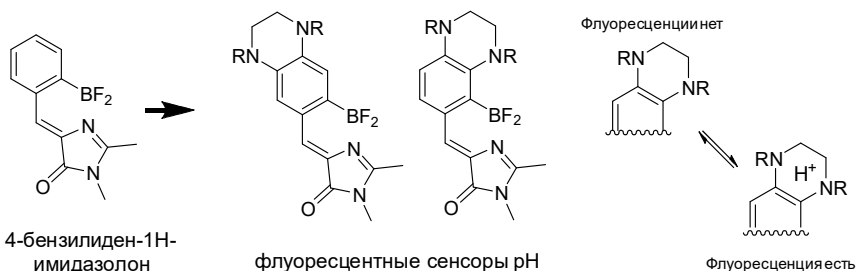
Работа поддержана грантом РФФИ № 19-74-30003.

4.3. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ pH-СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ АРИЛИДИЕНИМИДАЗОЛОНОВ

Балеева Н.С., Баранов М.С.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
nsbaleeva@gmail.com

Флуоресцентные сенсоры являются важным инструментом биологических исследований. В частности широкое применение в изучении сложных процессов, происходящих в живых системах, получили сенсоры pH. Для таких соединений характерно резкое изменение флуоресцентных свойств при изменении pH системы, благодаря присутствию pH-чувствительных фрагментов в структуре. За последние годы в нашей лаборатории было создано новое семейство флуоресцентных красителей имеющих в основе фрагмент 4-бензилиден-1H-имидазолон. Известно, что заместители в *мета*-положении в данной молекуле существенным образом меняют характер граничных орбиталей, причем присутствие в этом положении донорных групп приводит к резкому спаду интенсивности флуоресценции [1]. Очевидно, что введение в это положение pH-чувствительных фрагментов поможет создать различные флуоресцентные сенсоры pH. В настоящей работе мы синтезировали два производных, содержащих аминозаместители в *пара*- и *мета*-положениях бензилиденового фрагмента.



Изучение оптических свойств полученных соединений показало, что нейтральная форма полученных веществ характеризуется крайне низким квантовым выходом флуоресценции, в то время как протонированная ярко флуоресцирует. Объясняется этот феномен тем, что протонирование атома азота уменьшает донорный характер введенной в *мета*-положение группы. pKa полученных веществ составили 3,5 и 6,5, что однозначно может быть использовано для изучения процессов, протекающих в живых системах.

Литература:

1. Seth O, Baranov M.S., Baleeva N.S., Antonova M.M, Johnson K.A., Solntsev K.M. pH-Sensitive fluorophores from locked GFP chromophores by a non-alternant analogue of the photochemical meta effect // Phys. Chem. Chem. Phys. 2016. T. 18. C. 26703-26711.

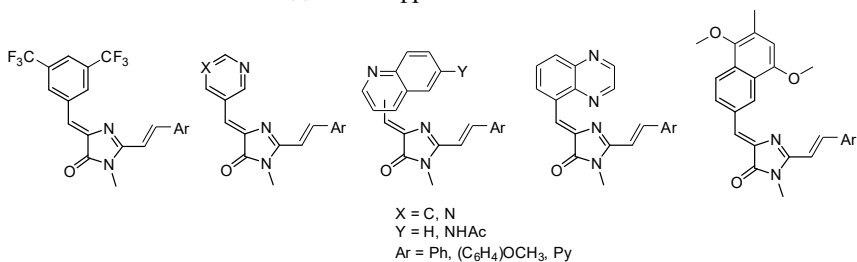
4.4. НОВЫЕ СОЛЬВАТОХРОМНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КРАСИТЕЛИ НА ОСНОВЕ ХРОМОФОРА БЕЛКА Kaede

Зайцева Э.Р., Смирнов А.Ю.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
elvira19999@mail.ru

Активное развитие флуоресцентной микроскопии в конце XX века многократно ускорило исследования в области клеточной биологии. Одним из важнейших компонентов данного метода являются флуоресцентные метки, вводимые в исследуемый объект. Данные метки могут быть флуоресцентными белками или синтетическими флуорофорами. Производные хромофоров флуоресцентных белков являются важным классом последних типов соединений.

Ранее мы показали, что соединения на основе хромофора белка Kaede с сильноакцепторными заместителями в бензилиденовой части, а также с некоторыми сопряженными заместителями, проявляют значительную флуоресценцию, а отдельные соединения способны селективно окрашивать некоторые внутриклеточные органеллы. В данной работе мы решили синтезировать новые производные хромофора белка Kaede с сильноакцепторным дитрифтометильным, пиридиновым, пиримидиновым, хиноксалиновым, диметоксинафтильным и различными хинолиновыми заместителями в бензилиденовом фрагменте.



Мы синтезировали серию новых бензилиденимидазолонов с длинноволновыми максимумами абсорбции и эмиссии, Стоксовы сдвиги которых превышали 100 нм. Данные соединения оказались практически нефлуоресцентными в воде, однако в органических неполярных растворителях проявили высокую флуоресценцию. Это позволяет предполагать, что полученные вещества могут быть использованы как чувствительные к окружению флуорогены, проявляющие высокий квантовый выход флуоресценции только в отдельных внутриклеточных органеллах и не создающие заметного фонового окрашивания.

4.5. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНКазной АКТИВНОСТИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Калинин Д.С.^{1,2}, Трофимова П.В.³, Ерем М.А.², Грановский И.Э.¹

¹Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

³Тульский государственный университет, Тула
309163@gmail.com

Мы описываем чувствительный метод определения сайт-специфической и неспецифической ДНКазной активности, основанный на детекции флуоресценции в режиме реального времени. В качестве сайт-специфической эндонуклеазы использовалась хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага T4, которая вносит в ДНК двунитевые разрывы. Её активность анализировали на ДНК-субстрате, полученном путем отжига двух взаимокomплементарных олигонуклеотидов: один олигонуклеотид содержал на 5'-конце флуоресцентный краситель ROX, тогда как на 3'-конце второго находился гаситель флуоресценции RTQ-2. Эндонуклеазную активность детектировали по разнице температур плавления исходного ДНК-субстрата и продуктов гидролиза, которое проводили после реакции в приборе для ПЦР в реальном времени.

Колицин E9 *E. coli* служил моделью неспецифической нуклеазы. Он гидролизует ДНК *in vitro* до коротких фрагментов за счет внесения множества однонитевых разрывов. Для детекции активности колицина E9 использовали два подхода. Первый подход в основе своей был такой же, как описанный выше для эндонуклеазы SegD. Во втором подходе мы использовали в качестве субстрата сверхспирализованную плазмидную ДНК, которую обрабатывали колицином E9 в присутствии интеркалирующего красителя "SYBR Green". Деграция плазмидной ДНК колицином E9 сопровождалась высвобождением красителя и падением флуоресценции. Этот процесс мы детектировали в режиме реального времени в соответствующем ПЦР-приборе.

В результате проделанной работы нами был разработан простой в исполнении чувствительный метод детекции сайт-специфической и неспецифической ДНКазной активности. Несомненным преимуществом данных методов является возможность проводить количественную оценку ферментативной активности с определением кинетических параметров реакции.

4.6. КООПЕРАТИВНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДИМЕРНОГО ФЕРМЕНТА ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ С СУБСТРАТОМ (АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТОЙ) И КОФАКТОРОМ ГЕМОМ

Кривошей А.В.^{1,2}, Ефремов А.А.², Матвейшина Е.К.², Панова В.В.², Вржещ П.В.^{1,2}

¹Международный учебно-научный биотехнологический центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

²Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В.

Ломоносова, Москва

krivoshey.alexr@gmail.com

Простагландины являются регуляторами воспаления, иммунного ответа и многих других физиологических процессов. Они синтезируются в результате циклооксигеназного окисления арахидоновой кислоты (АА), катализируемого гомодимерным ферментом простагландин-Н-синтазой (PGHS). Наличие кофактора гема строго необходимо для каталитической активности фермента. PGHS необратимо инактивируется в ходе катализируемой реакции и ингибируется нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП).

Имеются некоторые свидетельства наличия кооперативных взаимодействий между субъединицами фермента. В частности, ранее была показана отрицательная кооперативность для ингибиторов PGHS напроксена, ибупрофена и толметина.

В настоящем исследовании обнаружено, что при измерении взаимодействия PGHS с гемом для высоких концентраций фермента (не менее 20 нМ в реакционной системе) наблюдаются отклонения от простейшей схемы, которые объясняются при наличии положительной кооперативности между субъединицами димера. Также показано, что при варьировании концентраций АА в широком диапазоне зависимость скорости циклооксигеназного окисления не описывается уравнением Михаэлиса-Ментен, но может быть описана моделью, учитывающей отрицательную кооперативность при связывании АА с субъединицами PGHS (сродство фермента к первой молекуле субстрата 14 мкМ, ко второй - 1 мМ). Продемонстрировано, что суммарное число оборотов фермента (от начала реакции до полной инактивации) уменьшается с ростом концентрации АА, что также можно объяснить с помощью кооперативной модели. Полученные результаты имеют большое практическое значение для исследования регуляции синтеза простагландинов в организме и фармакологического действия НПВП.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-01150а с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета, и оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

4.7. ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ЛИПИД-ДЕТЕРГЕНТНЫХ ЧАСТИЦ В СМЕСЯХ ТРИФТОРЭТАНОЛ-ВОДА

Мотов В.В.^{1,2}, Кот Э.Ф.^{1,2}, Гончарук С.А.², Арсеньев А.С.^{1,2}, Минеев К.С.^{1,2}

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
motov.vv@phystech.edu

Мембранные белки являются важным объектом структурных исследований в молекулярной биологии. Чтобы получить *in vitro* структуру мембранных белков, близкую к нативной, их помещают в мембраноподобные среды, в качестве которых часто применяются липид-детергентные частицы - изотропные бицеллы. Довольно часто перед переводом в мембраноподобные среды, мембранные белки солюбилизируют в органических растворителях или их смесях с водой. Однако процесс взаимодействия белка с мембраноподобной средой в ходе приготовления образца, как правило, не контролируется, и выбор оптимального отношения растворителей, при котором должно происходить встраивание белка в мембраноподобную среду, зачастую является эмпирическим.

Целью данной работы являлось исследование поведения бицеллообразующих компонент в смеси трифторэтанол(ТФЭ)/вода, а также взаимодействия с ними альфа-спирального мембранного белка.

В ходе работы с использованием методов ЯМР-спектроскопии и динамического рассеяния света было изучено поведение двух распространенных составов бицелл - DMPC/CHAPS с эффективным соотношением липид/детергент $q^*=1$ и DMPC/DHPC с $q^*=0.5$, а также трансмембранного домена TrkA в присутствии DMPC/CHAPS, при различной полярности растворителя. Установлено, при каких соотношениях растворителей образуются липидные и липид-детергентные агрегаты, а также при какой доле ТФЭ трансмембранный домен TrkA встраивается в липидные частицы. Полученные результаты закладывают основу для разработки методик солюбилизации альфа-спиральных мембранных белков в липидные бицеллы из смесей ТФЭ/вода.

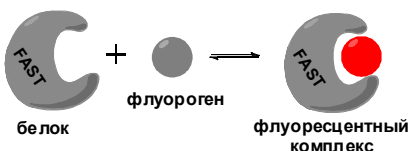
Работа поддержана грантом РНФ № 19-74-30014.

4.8. НОВЫЕ ФЛУОРОГЕНЫ ДЛЯ БЕЛКА FAST С РАСШИРЕННЫМ ЦВЕТОВЫМ РАЗНООБРАЗИЕМ

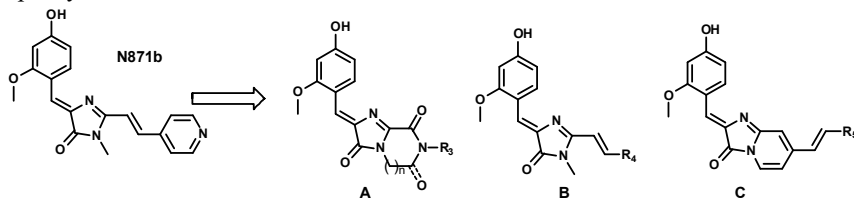
Мяснянко И.Н., Балеева Н.С., Баранов М.С.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
conzbutcher@gmail.com

Использование методов флуоресцентной микроскопии в последнее время находит широкое применение при изучении различных процессов в реальном времени. Одним из перспективных подходов является использование флуороген-активирующих белков в комплексе с низкомолекулярными веществами - флуорогенами. Флуорогены не обладают значимой флуоресценцией в свободной форме, а приобретают её лишь в связанном виде [1].



Ранее в нашей лаборатории было показано, что соединение **N871b** имеет ярко выраженные флуорогенные свойства - при связывании с флуорогенным белком FAST (Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag) [2] наблюдается многократное увеличение флуоресценции. Белок FAST может быть использован в генетически кодируемом флуоресцентном мечении живых систем, а значит создание новых флуорогенов для него является важной задачей. В настоящей работе, мы решили синтезировать ряд аналогов соединения **N871b**, характеризующихся флуоресценцией в более красной области спектра. Было сделано предположение о том, что введение электроноакцепторных заместителей (**A** или **B**) или увеличения π -сопряженной системы (**C**) в молекулу флуорогена сдвинет максимумы флуоресценции его комплекса с белком FAST в красную область.



В данной работе показано несколько типов соединений, структурно схожих с ранее полученным флуорогеном **N871b**, которые обладали различной окраской и демонстрировали выраженную флуоресценцию при образовании комплекса с белком FAST.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-33-90142.

Литература:

1. Dobrucki J.W., Kubitscheck U. Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications: Second Edition., 2017. С. 85-132.
2. Povarova N. V. et al. Chem. Eur. J. 2019. Т. 25, № 41. С. 9592-9596.

4.9. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА КОМПОЗИТА НА ОСНОВЕ МЕЛАНИНА *INONOTUS OBLIQUUS* (ЧАГИ) И СЕЛЕНОМЕТИОНИНА

Прозорова И.Ш., Сысоева М.А.

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
Казань
kuleeva.1996@mail.ru

На сегодняшний день перспективным направлением в биомедицине является адресная доставка лекарственных средств в организм человека. Меланины являются перспективной формой доставки биологически активных веществ, лекарственных средств и антиоксидантов. Их частицы имеют размер от 100 до 300 нм, Z-потенциал приблизительно минус 30 мВ, что позволяет им преодолевать многие барьеры в организме человека. Структура меланина включает пигментную часть, полисахариды и белки, поэтому она имеет много функциональных групп, способных взаимодействовать с лекарственными средствами, антиоксидантами и т.д. Селен проявляет высокие антиоксидантные свойства. Также селен используется в организме как пластический материал для формирования белков. Меланин чаги проявляет общую антиоксидантную активность 157,4 мг ЭАК/г, а селенометионин 27,69 мг ЭАК/г. Биологически активные добавки (БАД), содержащие селеноцистеин или селенометионин, применяют для профилактики и лечения сердечно-сосудистой и иммунной систем, желудочно-кишечного тракта и др., например, "Селен-актив", "Селен форте", "Компливит селен" и т.д. Целью работы являлась разработка композита на основе меланина *Inonotus obliquus* (чаги) и селенометионина с высокими антиоксидантными свойствами, который сможет быстро и эффективно обеспечить антиоксидантную защиту клеток организма, а также выполнить другие физиологические функции при условии его компонентам.

Разработан композит КМ5 на основе меланинов гриба *Inonotus obliquus* - К и селенометионина. Произведен анализ полученного композита комплексом методов. С помощью фотонной корреляционной спектроскопии показано, что исходный меланин К имеет большую вариабельность по размерам частиц - 316,3; 96,5 и 22,1 нм в количестве 57,4; 21,3 и 16,4% соответственно. В композите КМ5 преобладают крупные частицы с размером 593,3; 162,4 и 4814 нм в количестве 79,7; 17,3 и 3,0% соответственно. Исследована восстанавливающая способность полученных объектов. Показано, что у исходного меланина чаги она в 1,3 раза выше по сравнению с композитом. Определены изменения общей антиоксидантной активности композита КМ5 во времени и в разных средах, близких к средам организма человека (дистиллированной воде и фосфатном буфере pH 6 и pH 8). Установлено, что значительного изменения антиоксидантных свойств композита КМ5 во времени и от применяемого растворителя не наблюдается. Показано, что на основе композита меланина чаги и селенометионина могут быть разработаны высокоактивные БАД и лекарственные формы с антиоксидантным действием.

4.10. РАЗРАБОТКА ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИЗМЕРЕНИЯ pH

Симонян Т.Р.¹, Мамонтова А.В.¹, Лукьянов К.А.², Богданов А.М.²

¹Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва

tatiana.simonyan7@gmail.com

Одной из важных основ поддержания гомеостаза и контроля нормальных физиологических функций клеток является специфическая кислотность, характерная для разных субклеточных компарментов. Мониторинг изменений внутриклеточного pH *in situ* может предоставить ценную информацию о клеточном метаболизме и обеспечить более глубокое понимание физиологических и патологических процессов. Большинство традиционных флуоресцентных индикаторов, являясь мощным инструментом для биоимиджинга в реальном времени, способно лишь к относительной оценке изменения исследуемого параметра в клетке. Возможность измерения абсолютных величин, характеризующих аналит (например, концентрации), мы связываем с детекцией сигнала индикаторов во временном домене, где его количественной мерой служит время жизни флуоресценции (*tau*).

В настоящем проекте мы тестируем перспективные pH-чувствительные флуорофоры с лабильным временем жизни флуоресценции - EYFP-G65T (Sen et al., 2019) и EGFP-Y145L/S205V (Мамонтова и др., 2020) - как в качестве флуоресцентных ядер для ранее описанных pH-индикаторов, так и в качестве самостоятельных индикаторов pH. Измерение кинетики затухания флуоресценции четырех конструкций (EYFP-G65T, EGFP-Y145L/S205V, SypHer3s и SypHer3s-G65T) в широком диапазоне pH позволило выявить области, в которых наблюдается линейная зависимость *tau* от pH. Так, шестикратное увеличение *tau* для EYFP-G65T было зарегистрировано в диапазоне pH 4,0 - 5,0, а для SypHer3s и SypHer3s-G65T - в диапазоне pH 5,0 - 7,0; *tau* EGFP-Y145L/S205V увеличивается в 4 раза в диапазоне pH 7,0 - 9,0. Различия в режимах возбуждения флуоресценции указанных молекул открывает перспективу их совместного использования в одной экспериментальной системе для измерения pH в диапазоне 4,0-9,0. Кроме того, замена флуоресцентного ядра индикатора SypHer3s положительно повлияла на его характеристики в спектральном домене. Так, мы показали, что в условиях традиционной флуоресцентной микроскопии (в цитоплазме клеток НЕК293) индикатор SypHer3s-G65T демонстрирует динамический диапазон ответа примерно в 3 раза шире, чем оригинальный SypHer3s.

Данная работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-34-60019).

4.11. КОНЬЮГАТ НАНОЧАСТИЦ С ТРЕТЬИМ ДОМЕНОМ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА: ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ И АНАЛИЗА ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ

Сокол М.Б.^{1,2}, Зенин В.А.³, Яббаров Н.Г.^{1,2}, Моллаева М.Р.^{1,2},
Фомичева М.В.^{1,2}, Никольская Е.Д.^{1,2}

¹Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения,
Москва

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

³ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

mariyabsokol@gmail.com

Паклитаксел (Ptx) - митотический ингибитор таксанового происхождения, используемый в химиотерапии злокачественных новообразований. В нашей лаборатории был получен конъюгат наночастиц из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), содержащий Ptx, с рекомбинантным третьим доменом альфа-фетопротейна (AFP), последний известен как специфичный онкомаркер. Для количественного анализа Ptx в составе конъюгата были разработаны методы УФ-спектроскопии и ВЭЖХ-ОФ.

Наличие в смеси двух молекул, обладающих близкими максимумами поглощения (260 нм для Ptx и 280 нм для AFP), существенно усложняет количественный анализ с помощью УФ-спектроскопии. Для оценки специфичности методики проводили регистрацию спектров модельной смеси и испытуемого раствора. Вклад модельной смеси (δ) в величину оптической плотности рассчитывали по формуле:

$$\delta = \frac{A_{\text{модельной смеси}} \cdot 100}{A_{\text{испытуемого раствора}}}$$

Мешающее воздействие вспомогательных веществ составило менее 1%, что соответствует критерию приемлемости.

ВЭЖХ анализ конъюгата осложнен прежде всего различной сорбцией компонентов на неподвижной фазе колонки. При хроматографировании модельной смеси на картридже C18 сорбировалось 10% PLGA и 30% AFP. Для эффективного отделения Ptx от полимерных молекул были подобраны время центрифугирования и концентрация диметилсульфоксида (ДМСО), выбранного в качестве предрастворителя. Наибольшее извлечение Ptx достигалось при использовании 4% ДМСО и 10 мин центрифугирования.

Таким образом, подобраны условия эффективной пробоподготовки для проведения анализа ВЭЖХ, а также оценена специфичность методики УФ-спектрометрии. Описанные подходы проведения анализа и пробоподготовки, которые будут полезны в различных исследованиях количественного определения инкапсулированных молекул в многокомпонентных системах.

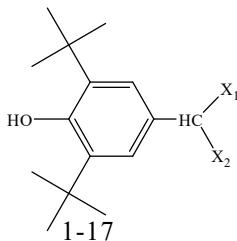
4.12. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРОСТРАНСТВЕННО-ЗАТРУДНЕННЫХ ФЕНОЛОВ

Филиппова М.И., Эшмуратова О.Т., Шамсутдинова Л.П.

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
Казань

larisasham@mail.ru

В настоящей работе проведено исследование синтеза и свойств Р-; Р-, S-; Р-, S-, C(O)-; 2Р-; Р-, N-, S- пространственно-затрудненных фенолов (далее - ПЗФ).



X₁ : P(O)Et₂ (1), P(O)(OMe)₂ (2), P(O)Ph₂ (3), P(O)(OMe)₂ (4), P(O)(OEt)₂ (5), P(O)Ph₂ (6), P(O)Ph₂ (7), P(O)(OMe)₂ (8), P(O)Ph₂ (9), P(O)(OMe)₂ (10), P(O)Ph₂ (11), P(O)Ph₂ (12), P(O)Et₂ (13), P(O)Ph₂ (14), P(O)Et₂ (15), P(O)Ph₂ (16), P(O)(OEt)₂ (17).

X₂ : SC(O)CH₃ (1), SC(O)CH₃ (2), SC(O)CH₃ (3), SH (4), SH (5), SH (6), SCH(P(O)Ph₂)(2,6-ди-*t*-BuC₆H₄OH) (7), SCH(P(O)Ph₂)(2,6-ди-*t*-BuC₆H₄OH) (8), P(O)Ph₂ (9), P(O)(OMe)₂ (10), P(O)(OEt)₂ (12), 2NC(O)C₆H₄C(O) (13), NC(O)C₆H₄C(O) (14), CH₂C(O)CH₃ (15), CH₂C(O)CH₃ (15), S-(*o*-NH₂)C₆H₃ (16), OMe (17).

С помощью компьютерной программы AIOGPS показана низкая растворимость ПЗФ в воде, которая обусловлена экранированием фенольного гидроксила объемными *трет*-бутильными орто-заместителями, что создает стерические препятствия для процесса сольватации. Введение атомов серы, азота и кислорода в фосфорсодержащие ПЗФ привело к уменьшению водорастворимости.

Исследуемые ПЗФ имеют невысокие значения токсичности, предсказанной с помощью программы GUSAR. Вероятно, это связано с их низкой гидрофильностью и выраженными липофильными свойствами.

Согласно данным прогноза программы PASS большинство исследуемых ПЗФ проявляют восстановительные свойства, могут проявлять антиоксидантную активность, ингибировать процессы перекисного окисления липидов и выступать в качестве "ловушек" свободных радикалов. Это позволяет рассматривать данные соединения как потенциальные средства для терапии окислительного стресса.

12 соединений было исследовано на антимикотическую и антибактериальную активность на тест-культурах условно-патогенной микрофлоры. 8 образцов проявили хорошую антимикробную активность *in vitro* и антимикотическую активность.

4.13. СОЗДАНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФОСФОНАТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГРИЗЕОФУЛЬВИНА НА ОСНОВЕ ОКСИМОВ И ГИДРАЗОНОВ

Хисамов М.М.^{1,2}, Сольев П.Н.¹

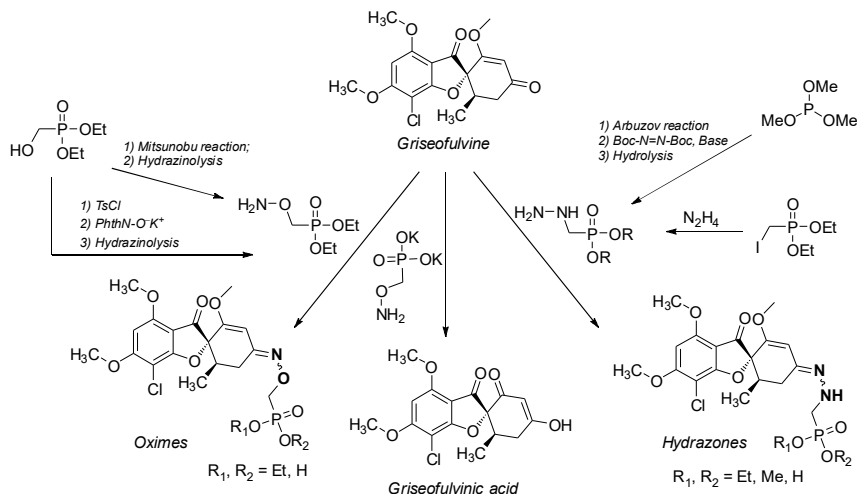
¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

²Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

hisamovmaratag@mail.ru

Гризеофульфин является соединением с широким спектром фармакологического применения благодаря фунгистатическим свойствам. Однако использование гризеофульвина в фармакологии ограничено низкой растворимостью в воде и, как следствие, низкой пероральной биодоступностью. Расширить применение гризеофульвина можно за счёт повышения его растворимости с помощью создания оксимов и гидразонов на основе аминоксиметилфосфоновой и гидразинометилфосфоновой кислот, являющихся удобными клик-реагентами. Синтез аминоксиметилфосфоната проводился стандартным путём, в то время как эфиры гидразинометилфосфоната получены впервые по новой реакции в ходе данного проекта.

Противогрибковая и противобактериальная активность полученных гидразонов и оксимов изучается на базе НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе.



Авторы выражают благодарность к.х.н. Новикову Р.А. за регистрацию спектров ЯМР и к.х.н. Тюрину А.П. за проверку противобактериальной и противогрибковой активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-74-10121).

4.14. НОВАЯ РЕАКЦИЯ СОЧЕТАНИЯ ЭФИРОВ АЗОДИКАРБОКСИЛАТОВ С 8-ГИДРОКСИХИНОЛИНОМ - МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ С ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ АНТИ-ВИЧ АКТИВНОСТЬЮ

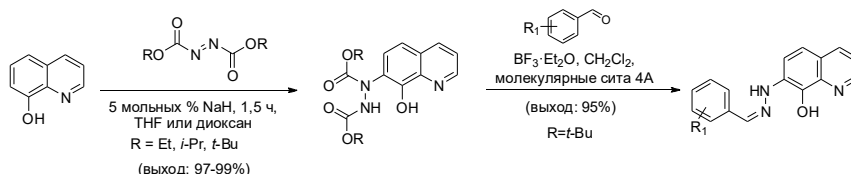
Шерман Д.К.^{1,2}, Сольев П.Н.¹

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

²Биотехнологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
dar.sher.man0@gmail.com

В наше время вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является огромной социальной проблемой. Разработка новых гидразонов, основанных на 7-гидразино-8-гидроксихинолине, позволила бы расширить ряд ингибиторов этого вируса. По своей структуре они напоминают 7-аминометил-8-гидроксихинолины, среди которых ранее были найдены ингибиторы интегразы ВИЧ, потенциальные препараты против болезни Альцгеймера, а также "перехватчики" активных форм кислорода при клеточном окислительном стрессе [1]. Целью нашей работы стала разработка удобного метода синтеза таких производных и изучение механизма С-Н-функционализации.

В нашей работе мы изучили химию эфиров азодикарбоксилатов в роли электрофила в реакции замещения 8-гидроксихинолина (8-HQ). Подбором катализатора нам удалось добиться количественного превращения исходного 8-HQ в монозамещенный продукт. Реакция носит селективный характер - С-Н-функционализация проходит в орто-положение. Целевые гидразоны получены "one-pot" методом, то есть без выделения промежуточного продукта - 7-гидразино-8-гидроксихинолина. Результаты исследования опубликованы в журнале "Green Chemistry" [2].



Цитотоксичность полученных соединений проверена на двух культурах клеток. В настоящее время нами определяется влияние гидразонов на уровень окислительного стресса. В планах определить биологическую активность в отношении интегразы ВИЧ.

Авторы выражают благодарность к.х.н. Новикову Р.А. за регистрацию спектров ЯМР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-74-10121).

Литература:

1. Song H., Xu H., Chen W., Zhan P., Liu X. Med. Chem. Commun., 2015, **6**: 61-74.
2. Solyev P.N., Sherman D.K., Novikov R.A., Levina E.A., Kochetkov S.N. Green Chem, 2019.

СЕКЦИЯ 5

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЗНАВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛ И ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В КЛЕТКЕ

5.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПЕРВИЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ

Гондаренко Е.А., Антипова Н.В., Павлюков М.С., Шахпаронов М.И.,
Цетлин В.И., Кудрявцев Д.С.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Москва
gondarenkoea@gmail.com

Мультиформная глиобластома (GBM) - самая распространенная и агрессивная опухоль головного мозга человека. Рецепторы ацетилхолина, в частности $\alpha 7$ никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR), экспрессируются при многих злокачественных опухолях, что может указывать на то, что повышенная активность этого рецептора связана с пролиферацией раковых клеток. Существует достаточно обширная панель селективных модуляторов, агонистов и антагонистов $\alpha 7$ nAChR.

Исследование проводилось на первичных клетках глиобластомы человека и модельных клеточных линиях. Клетки глиобластомы человека стимулировали различными агонистами $\alpha 7$ nAChR (PNU282987, никотин, гипафорины 6ID и 6NAM), в том числе в присутствии антагонистов (α -кобратоксин и тубокурарин), а также положительного модулятора PNU120596 или без него. Изменение внутриклеточного $[Ca^{2+}]$ регистрировалось при помощи флуоресцентного красителя Fluo-4 AM. Показано, что добавление PNU120596 совместно с агонистами вызывает более заметное увеличение внутриклеточного $[Ca^{2+}]$, что подтверждает участие в исследуемом процессе именно $\alpha 7$ nAChR. Кроме того, α -кобратоксин оказался более эффективным блокатором в случае с синтетическими гипофаринами, в то время как после инкубации с тубокурарином уменьшалась амплитуда ответа на PNU282987. Инкубация клеток с PNU282987, PNU120596 и α -нейротоксинами змей приводила к изменению жизнеспособности клеток.

Проведенное исследование показало применимость кальциевой визуализации в качестве системы скрининга функциональной активности nAChR на клетках глиобластомы. Подтверждена перспективность использования низкомолекулярных и пептидных лигандов nAChR для подавления роста некоторых глиобластом человека.

Исследование выполнено за счет средств гранта РНФ (проект №18-74-10088).

5.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS 9 ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА ЧЕРЕЗ РЕЦЕПТОР GPR55

Дегтярева К.О., Серова О.В., Акимов М.Г., Дудина П.В., Шерстяных Г.Д., Деев И.Е., Петренко А.Г., Безуглов В.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Москва
Degtyarevak99@gmail.com

GPR55- неклассический каннабиноидный рецептор, сопряженный с G-белком и играющий роль в опухолевом росте. Это мультилигандный рецептор, активация которого в зависимости от структуры лиганда может вызывать пролиферацию (лизофосфатидилинозит, 2- арахидоноилглицерин) или апоптоз (анандамид, ацилдофамины) опухолевых клеток. Механизм переключения активности GPR55 не установлен, однако он может быть связан с формированием димеров между GPR55 и каннабиноидными рецепторами CB1 и CB2. Для проверки этой гипотезы были получены нокауты GPR55 и CB2.

В качестве объекта для экспериментов выбрали клеточную линию MDA-MB-231 (опухоль молочной железы), где был зафиксирован значимый уровень экспрессии GPR55 и CB2. Клетки трансфицировали с помощью вектора PX459, в который клонированы участки целевых генов, далее проводили селекцию с использованием путомицина. Выжившие в результате селекции клетки были расклонированы. Из клонов выделили геномную ДНК и с помощью ПЦР наработали участок, куда были внесены изменения. ПЦР-фрагменты заклонировали в Т-вектор и отсеквенировали. Для оценки действия вызывающих апоптоз лигандов GPR55 (дофаминамид докозогексаеновой кислоты; DHA-DA) на нокаутные линии был использован МТТ-тест.

В результате этой работы были получены нокауты рецепторов GPR55 и CB2. Анализа сиквенса показал, что гены, отредактированные CRISPR-CAS 9 более не кодируют функциональный белок во всех аллелях клеток. Было установлено, что при обработке лигандом GRR55 (DHA-DA) клеток с нокаутом CB2 их выживаемость достоверно снижалась по сравнению с обычными MDA-MB-231. Это позволяет сделать предположение о том, что CB2 противодействует GPR55.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ), гранты №№ 19-04-00302, 19-04-01042, 19-04-00815.

5.3. ИНГИБИТОР P13-КИНАЗЫ PI 828 ЯВЛЯЕТСЯ АНТАГОНИСТОМ МУСКАРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Дымова Е.А., Соколова Е.А.

ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биофизики клетки РАН, Пущино
feiris.san@gmail.com

Фосфоинозитид-3-киназа (P13-киназа) представляет собой внутриклеточный фермент, фосфорилирующий фосфатидилинозитолы, который является участником многих внутриклеточных сигнальных процессов. Ключевая роль P13-киназы в механизмах, обеспечивающих пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток, стала основой для применения её ингибиторов в качестве противоопухолевых препаратов.

Другой важной ролью P13-киназы является участие в передаче сигналов от рецепторов плазматической мембраны внутрь клетки. Ранее мы исследовали роль P13-киназы в механизме генерации Ca^{2+} -ответов на АТР в мезенхимных стволовых клетках человека (МСК). PI 828 подавлял Ca^{2+} -ответы клеток на АТР при условии предварительной инкубации с ним не менее 200 с и в концентрациях не меньше 50 мкМ. При этом сам факт вовлеченности P13-киназы в механизм генерации Ca^{2+} -ответов на АТР МСК был подтвержден также с помощью её традиционного ингибитора LY 294002 и его неактивного аналога LY 303511.

В случае клеток линии НЕК 293 Ca^{2+} -ответы на АТР не подавлялись ни одним из использовавшихся ингибиторов P13-киназы, т.е. P13-киназа не была вовлечена в трансдукцию исследуемого сигнала. Однако при проведении аналогичных экспериментов с мускариновыми рецепторами, мы столкнулись с тем, что Ca^{2+} -ответы клеток на ацетилхолин (1 мкМ) подавлялись ингибитором PI 828 в очень низких концентрациях (1 мкМ) и без предынкубации с ним. При этом такой протокол применения PI 828 не приводил к подавлению ответов этих же клеток на АТР. Совокупность описанных данных говорит о том, что P13-киназа скорее всего не была вовлечена в трансдукцию сигнала ацетилхолина, а PI 828 блокировал ответы на него, действуя, по-видимому, экстраклеточно. Таким образом, описанные экспериментальные факты косвенно свидетельствуют о том, что PI 828 проявляет антагонистические свойства по отношению к мускариновым рецепторам.

Нельзя исключать, что подобными антагонистическими свойствами обладают и ингибиторы P13-киназы, использующиеся в качестве лекарственных средств, и это может объяснять широкий спектр вызываемых ими побочных эффектов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-74-00056.

5.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ МЕТОДАМИ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ КАЛЬЦИЯ

***Исаева А.С.¹, Кудрявцев Д.С.², Баркова Д.В.³, Спирина Е.Н.²,
Кашеверов И.Е.², Цетлин В.И.²***

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва
isaevaanastasiyaibh@gmail.com

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) относят к катион-селективным пентамерным лиганд-управляемым ионным каналам. нАХР представляют собой трансмембранные рецепторы, состоящие из пяти субъединиц. Ключевую роль в функционировании рецептора играет С-петля во внеклеточном домене, поскольку способствует связыванию с лигандами и их эффективной упаковке в гидрофобный карман между субъединицами. Выделяют два основных типа нАХР: мышечные (мнАХР) и нейрональные (ннАХР). Первые играют важную роль в механизме нервно-мышечной передачи и являются мишенью миорелаксантов, вторые экспрессируются во многих областях центральной и периферической нервной системы. Дисфункция нАХР может привести к таким заболеваниям как шизофрения, болезнь Альцгеймера, миастенические синдромы, эпилепсия и др. Поэтому изучение функционирования данных рецепторов является актуальной задачей.

В целях выявления механизмов функционирования клинически-значимых мутантных мышечных нАХР была произведена молекулярная динамика, точечный мутагенез, исследование функциональной активности полученных мутантов методами пэтч-клампа и флуоресцентной детекции кальция и обработка результатов кальциевого имиджинга мутантных мнАХР и дикого типа (WT) при аппликации ацетилхолина в разных концентрациях. Исследование показало, что при низких концентрациях ацетилхолина (10 мкМ) мутанты G153S, L199T и L199A проявляют повышенную активность в сравнении с мышечным нАХР WT, а мутация L199A взаимодействует с мутацией G153S (вызывающей миастению), что приводит к уменьшению чувствительности двойного мутанта и к низким, и к слишком высоким концентрациям ацетилхолина. Результаты работы могут быть использованы для рационального конструирования новых миорелаксантов и тест-систем для биомедицинских исследований.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-10088).

5.5. КАРТИРОВАНИЕ ДОМЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ TRIM28 И Kaiso

Лобанова Я.В.¹, Женило С.В.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва

²ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
yaraloban@yandex.ru

Транскрипционный фактор Kaiso относится к группе белков, связывающихся с метилированной ДНК за счет домена цинковые пальцы. Кажется, что роль таких белков должна быть велика, поскольку метилирование является жизненно необходимой модификацией ДНК. Однако нокадаун *zbtb33* (Kaiso) у *Mus musculus* приводит лишь к слабо выраженному поведенческому фенотипу. Если же снизить экспрессию Kaiso в *Xenopus laevis*, то это приведет к летальным последствиям, аналогичным тем, что наблюдаются при удалении ДНК-метилтрансфераз. Также у млекопитающих появляется новый класс белков, который перенимает роль Kaiso в установлении метилирования ДНК. Это класс KRAB-белков, включающий Zfp57, нокаут которого летален у мыши и который в свою очередь образует комплекс с TRIM28. Мы предполагаем, что Kaiso участвует в установлении метилирования ДНК у лягушки за счет взаимодействия с TRIM28, который отвечает за привлечение ДНК-метилтрансфераз.

Цель данной работы: проверить может ли Kaiso связываться с TRIM28, определить домены, вовлеченные во взаимодействие. Для этого были наработаны домены белка Kaiso в составе рGex-2t вектора: ВТВ/POZ домен, цинковые пальцы, линкерный участок. Получена глутатион-сефароза с выбранными фрагментами белка Kaiso. Копреципитационный анализ проводили с лизатами из клеток НЕК293, трансфецированными TRIM28-НА. Показано, что TRIM28 может взаимодействовать с двумя доменами белка Kaiso: ВТВ/POZ и цинковыми пальцами. TRIM28 помимо привлечения ДНК-метилтрансфераз может выступать в роли E3-убиквитин или SUMO-лигазы. Котрансфекция Kaiso-GFP и TRIM28-НА показала, что Kaiso деградирует в присутствии TRIM28. Делеционный анализ показал, что для деградации Kaiso необходим домен цинковые пальцы.

Можно представить следующую схему взаимодействия белков Kaiso и TRIM28: когда Kaiso связан с помощью цинковых пальцев ДНК, он способен привлекать TRIM28 с помощью своего ВТВ-домена, осуществляя регуляцию экспрессии генов; в отсутствии связывания с ДНК уровень белка Kaiso может регулироваться E3-убиквитинлигазной активностью белка TRIM28, причем для этого необходим домен с цинковыми пальцами.

Проделанная работа является первым шагом в доказательстве более крупной гипотезы о роли Kaiso в установлении и поддержании метилирования ДНК.

Работа поддержана РФФИ, проект № 19-29-04139.

5.6. ПОИСК НОВЫХ ИНТЕРАКТОРОВ p73 ПРИ ПОМОЩИ ПРОКСИМАЛЬНОГО МЕЧЕНИЯ

Луппов Д.В., Пестов Н.Б.

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный
Luppov.dv@phystech.edu

Белки семейства транскрипционных факторов p53, такие как p53, p63 и p73 и множество их изоформ, играют огромную роль в канцерогенезе и функционировании организма в целом. В нашем исследовании мы сосредоточили свое внимание на белке p73, который до сих пор изучен значительно хуже, чем p53. Разнообразие изоформ p73 значительно выше, чем у других белков этого семейства. Особо можно выделить два типа: TAp73 - изоформы, обладающие N-терминальным доменом активации транскрипции и DNp73, утеравшие данный домен из-за использования альтернативного промотора. Подытоживая предыдущие исследования можно сказать, что данный белок вовлечен во многие процессы, важные для прогрессии опухоли. Большинство исследований склоняются к тому, что DN изоформа является про-канцерогенной, в то время как TA изоформа проявляет онкосупрессорные свойства.

В нашем исследовании для изучения взаимодействий различных изоформ данного белка мы использовали систему проксимального мечения TurboID. Данная система представляет собой белок, полученный при помощи молекулярной эволюции из биотинлигазы *E. coli* Bir-A, активность которой была многократно усилена. Этот белок способен ковалентно присоединять биотин к остаткам лизина в различных белках, после чего меченные таким образом белки могут быть выявлены и выделены из смеси при помощи стрептавидиновых или подобных им гранул. В нашей работе используются обе версии разработанного белка - полноразмерный TurboID, и менее стабильный и активный, но более компактный и дающий меньше неспецифичного сигнала miniTurbo.

Нами были созданы несколько генетических конструкций, кодирующих химерные белки, представляющие из себя p73, связанный через линкер с биотинлигазой. Данные конструкции были протестированы в различных клеточных линиях, при различных температурах, способах выделения образца (варьировались условия лизиса клеток, вытягивания при помощи магнитных частиц, покрытых стрептавидином и визуализации иммуноблоттингом). Оптимизирована специфичность биотинилирования созданными нами белками, оценена их активность с различными версиями биотинлигазы, показана активность в широком диапазоне температур. Первым успешным результатом явилась детекция олигомеризации p73 в условиях транзientной экспрессии.

5.7. ДВОЙНОЙ МУТАНТ ТОКСИНА ВеМ9 СЕЛЕКТИВЕН К НАТРИЕВЫМ КАНАЛАМ НАСЕКОМЫХ

Черных М.А.¹, Кульдюшев Н.А.¹, Пеньёр С.², Беркут А.А.¹, Тимгат Я.², Ефремов Р.Г.^{1,3}, Василевский А.А.^{1,3}, Чугунов А.О.^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия

²Лёвенский университет, ON II, Herestraat 49, box 922, 3000, Лёвен, Бельгия

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия
M.baribal@gmail.com

Селективные лиганды различных ионных каналов востребованы не только в фундаментальных исследованиях, но и в разработке лекарственных препаратов с минимальными побочными эффектами и средств для борьбы с вредными или болезнетворными организмами. Основой для таких лигандов потенциал-чувствительных каналов, играющих ключевую роль в передаче нервного импульса, могут стать нейротоксины, в частности, α -нейротоксины скорпионов. Эти небольшие белки подавляют инактивацию потенциал-чувствительных натриевых каналов, при этом они могут как селективно воздействовать на каналы млекопитающих (млекотоксины) или насекомых (инсектотоксины), так и быть активными на обе группы каналов (α -подобные токсины). ВеМ9 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* является одним из наиболее изученных α -подобных токсинов.

Мы изучали влияние одной области токсина, участвующей во взаимодействиях с каналом - так называемой "RT-петли" - на селективность ВеМ9. Двойная мутация K8E+Y17G, по нашим предположениям, исходя из сравнения аминокислотных последовательностей разных токсинов, должна была придать ВеМ9 специфичность в отношении каналов млекопитающих. Однако мы увидели обратный эффект: мутант ВеМ9^{EG} потерял активность на каналы млекопитающих, став селективным инсектотоксином. Чтобы объяснить это явление, мы использовали компьютерное моделирование. Выявленные отличия в межмолекулярных ионных связях не позволили объяснить изменение селективности. В результате анализа траекторий молекулярной динамики мы увидели потерю у мутанта ряда гидрофобных и стэкинговых контактов в окрестностях замены Y17G и потерю системы ионных и π -катионных взаимодействий из-за замены K8E. Эти изменения указали на вероятный механизм потери активности ВеМ9 на каналы млекопитающих.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-44-01015).

СЕКЦИЯ 6

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА

6.1. ПЛАСТИЧНОСТЬ НК-КЛЕТОК *IN VITRO*: АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ KIR2DL2/DL3

Алексеева Н.А.^{1,2}, Кобызева П.А.¹, Стрельцова М.А.¹, Ерохина С.А.¹,
Коваленко Е.И.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва
nadalex@inbox.ru

Способность НК-клеток проявлять цитотоксическую активность в отношении опухолевых и зараженных вирусом клеток делает возможным их применение в иммунотерапии. Для приобретения НК-клетками функциональной активности необходима экспрессия ингибирующих рецепторов семейства KIR. С цитомегаловирусной инфекцией (HCMV) ассоциировано высокое содержание клеток NKG2C⁺ и формирование популяций адаптивных НК-клеток.

Данная работа выполнялась с целью исследовать взаимосвязь между степенью дифференцировки НК-клеток, экспрессией в них рецептора NKG2C и изменением экспрессии рецепторов KIR при экспансии *in vitro*. НК-клетки выделяли из мононуклеаров периферической крови (ПВМС) методом магнитной сепарации. ПВМС были предварительно получены методом центрифугирования в градиенте плотности. Анализ фенотипа клеток проводился методом цитофлуориметрии. С помощью клеточного сортировщика проводили клонирование и сортировку по 100 клеток в 96-луночные планшеты субпопуляций НК-клеток различающихся по степени дифференцировки и уровню экспрессии NKG2C. Клетки подвергали стимуляции IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21. Методом иммуноферментного анализа определяли серологический статус HCMV и продукцию НК-клетками IFN γ . Оценку цитотоксической активности клеток определяли по уровню дегрануляции в присутствии клеток-мишеней. В гетерогенных культурах НК-клеток, полученных из 100 клеток, в субпопуляциях KIR⁻, различных по стадии дифференцировки и уровню экспрессии NKG2C, не наблюдалось различий по уровню экспансии. Большая частота возникновения клональных культур наблюдалась в субпопуляциях НК-клеток с более низким уровнем дифференцировки. Во всех исследованных субпопуляциях KIR⁻ стимуляция НК-клеток *in vitro* индуцировала появление клеток KIR⁺. Наблюдалась тенденция к экспрессии KIR с большей вероятностью в субпопуляции KIR⁻CD56^{dim}NKG2C⁺. Клетки полученных клональных культур проявляли цитотоксическую активность. В клональных культурах KIR⁻НК-клеток, в которых появились KIR⁺ клетки, была снижена продукция IFN γ в ответ на стимуляцию IL-12 и IL-18, что может быть признаком приобретения этими клетками свойств адаптивных НК-клеток. Таким образом, было показано, что стимуляция НК-клеток может приводить к индукции экспрессии рецепторов KIR *de novo*. Расширение знаний об ответе НК-клеток на стимул важно для применения НК-клеток в иммунотерапии рака.

Данная работа поддержана грантом РНФ № 19-15-00439.

6.2. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ НК-КЛЕТОК, НАПРАВЛЕННАЯ НА УЛУЧШЕНИЕ ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСДУКЦИИ ГЕНА АДАПТОРНОГО БЕЛКА DAP12

Величинский Р.А., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
rodicvelic@gmail.com

DAP12 является активирующим сигнальным адаптером для ряда поверхностных НК-клеточных рецепторов. Неоднократно было показано участие сигнальной молекулы DAP12 в активации НК-клеток, приводящей к повышению их цитотоксичности и продукции цитокинов. Также было отмечено, что DAP12 необходим для трансдукции сигнала от активирующего рецептора NKG2C, характеризующего "адаптивные" НК-клетки.

Цель - с помощью ретровирусной трансдукции получить и изучить варианты генномодифицированных НК-клеток с оверэкспрессией молекулы DAP12.

Выделяли мРНК, после проводили ПЦР в реальном времени. Далее вставляли ген DAP12 в вирусный вектор pBABE-GFP и проводили трансфекцию генов DAP12 и RD-114 в клеточные линии. После получения вирусных частиц проводили трансдукцию DAP12 и RD-114 в активированные первичные НК-клетки. Результаты трансдукции оценивали методом проточной цитометрии. Проводили фенотипический анализ НК-клеток до и после трансдукции.

Двукратное снижение доли НК-клеток, экспрессирующих NKG2C, было отмечено в DAP12-положительных клетках по сравнению с DAP12-негативными. Также у DAP12-позитивных дегранулирующих клеток уровень экспрессии активирующего рецептора NKp44 был выше приблизительно в 1,5 раза по сравнению с DAP12-негативными клетками. Сходная закономерность наблюдалась для рецепторов KIR2DL2/DL3. При этом, повышение уровня экспрессии NKp44 в общей популяции DAP12-позитивных клеток составило лишь 1,14.

Итак, оверэкспрессия белка DAP12 в НК-клетках, по-видимому, приводит к росту их активации, о чем свидетельствует увеличение уровня экспрессии NKp44. Причина снижения экспрессии NKG2C остаётся неизвестной и требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00407.

6.3. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕДУРЫ РЕТРОВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ ГЕНА iCasp9 В НК-КЛЕТКИ С ЦЕЛЬЮ ИХ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ЭЛИМИНАЦИИ

Паламарчук А.И.^{1,2}, Стрельцова М.А.², Коваленко Е.И.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
palanastasia@yandex.ru

Применение НК-клеток в иммунотерапии сопряжено с пониженными, по сравнению с Т-клетками, рисками развития реакции "трансплантат против хозяина". Кроме этого, НК-клетки обладают антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью и врожденной способностью распознавать опухолевые клетки. Недавно возникла возможность контролируемой элиминации адоптивных клеток в организме пациента. Вирусная трансдукция гена индуцируемой каспазы 9 (iCasp9) позволяет при добавлении димеризатора CID (chemical inductor of dimerization) к клеткам за короткое время запускать апоптоз. Целью работы стала оптимизация процесса модификации НК-клеток ретровирусными частицами, содержащими ген iCasp9, для направленной индукции их клеточной смерти.

НК-клетки выделяли из периферических мононуклеаров методом отрицательной магнитной сепарации и стимулировали IL-2 и облученными клетками линии K562-mbIL21, экспрессирующими мембраносвязанный IL-21. Вирусные частицы собирали в трансфицированных с помощью плазмид pMSCV-F-del Casp9.IRES.GFP и RD114 клетках линии Phoenix Ampho. Эффективность трансдукции оценивали по уровню экспрессии GFP. Затем клетки инкубировали с CID для индукции апоптоза, определяемого окрашиванием флуоресцентномеченым Annexin V и Sytox AAD. Фенотип клеток измеряли методом проточной цитометрии.

Показано, что после стимуляции НК-клетки приобретали менее дифференцированный фенотип, благоприятный для эффективной трансдукции. Среди iCasp9-НК-клеток отмечено увеличение доли клеток с более дифференцированным фенотипом и снижение доли таких активирующих рецепторов как CD16, NKp46 и CD2. Эффективность трансдукции достигала 28%. Инкубация iCasp9-НК-клеток в течение 1, 2, 12 и 16 ч с CID (10 нМ, 20 нМ, 100 нМ) приводило к запуску апоптоза. Доля клеток в апоптозе увеличивалась с ростом концентрации димеризатора. Показано, что клетки с меньшим уровнем экспрессии GFP хуже отвечали на CID.

Таким образом, были получены вирусные частицы, несущие ген индуцируемой каспазы 9, и проведена трансдукция НК-клеток с последующим запуском в них апоптоза с помощью димеризатора CID.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-75-00129.

6.4. ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЭНДОЛИЗОСОМАЛЬНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА МАКРОФАГАМИ ЧЕЛОВЕКА

Строкач Н.Н.^{1,2}, Богданов И.В.¹, Финкина Е.И.¹, Зиганин Р.Х.¹,
Овчинникова Т.В.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва
contraton@mail.ru

Изучение молекулярных механизмов, связанных с развитием аллергических реакций, становится с каждым годом всё более актуальной фундаментальной задачей. Антигенпрезентирующие клетки, к которым относятся резидентные и воспалительные макрофаги, тканеспецифичные дендритные клетки, моноциты и др., играют одну из первостепенных ролей в развитии аллергических реакций. Презентации аллергена Т-лимфоцитам предшествует образование коротких пептидов в ходе, так называемой, эндолизосомальной деградации антигена лизосомами антигенпрезентирующих клеток.

Данная работа посвящена изучению процесса эндолизосомального расщепления рекомбинантного белка, содержащего в своем составе главный аллерген пыльцы берёзы Bet v 1, РМА-индуцированными макрофагами линии ТНР-1 человека. Суспензию клеток промоноцитов человека ТНР-1 выращивали в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂) в полной среде RPMI-1640 с β-меркаптоэтанолом. Дифференцировку ТНР-1 в макрофаги фенотипа M0 индуцировали форбол-12-миристат-13-ацетатом (РМА). Спустя 72 часа после добавления РМА макрофаги тщательно отмывали от РМА и добавляли к клеткам питательную среду, содержащую исследуемый рекомбинантный белок.

Спустя 24 и 48 часов клетки тщательно отмывали раствором PBS, открепляли раствором трипсина с EDTA, после чего осаждали центрифугированием. Лизосомальную фракцию выделяли посредством ступенчатого градиентного центрифугирования в градиентах сахарозы и перколлы для последующего анализа субклеточного пептидома с использованием метода жидкостной tandemной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Первичные данные о пептидном составе после LC-MS/MS анализировали с помощью программного обеспечения *Perseus v1.6.14.0*, используя пептидную базу данных UniprotKB *Homo sapiens*. В пробах было идентифицировано около 1700 белковых групп в каждом образце. После проведения GO-анализа было обнаружено, что около 1000 белковых групп соответствуют цитозольному компартменту, около 365 - митохондриальному, около 800 - ядерному, около 100 - лизосомальному. Эндолизосомальная деградация исследуемого белка наблюдалась в динамике, спустя 24 и 48 часов после добавления рекомбинантного белка к макрофагам. Спустя 24 часа было обнаружено 13 пептидных фрагментов, в то время как спустя 48 часов - 25. После соотнесения найденных фрагментов с аминокислотной последовательностью рекомбинантного белка были определены основные сайты расщепления лизосомальными ферментами макрофагов.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 20-45-05002).

6.5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ АНТИГЕН-ПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ ВЕЗИКУЛ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ CAR-T КЛЕТОК

Украинская В.М.¹, Рубцов Ю.П.¹, Габиров А.Г.¹, Масчан М.А.², Степанов А.В.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва

ukrainskaya49@gmail.com

Использование Т клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR-T) доказало свою эффективность при терапии рака. Так, иммунотерапия CAR-T, направленная на антиген CD19, вызывает выраженные клинические ответы у пациентов с лейкемией и лимфомой, включая высокую долю устойчивых полных ремиссий. Несмотря на успех CAR-T-терапии при гематологическом раке, на сегодняшний день она гораздо менее эффективна при солидных опухолях, в связи с агрессивным микроокружением, которое негативно влияет на пролиферацию Т-клеток. Поиск подходов для повышения эффективности терапии в этой ситуации, несомненно, является приоритетным направлением в области иммунотерапии. Одним из возможных решений проблемы может стать реактивация CAR Т-клеток, которые уже находятся в агрессивных условиях опухолевого микроокружения, при помощи антиген-презентирующих искусственных везикул. Наличие опухолевого антигена на поверхности везикул позволяет таргетно стимулировать CAR Т-клетки, без участия дополнительных ко-стимулирующих агентов и Т-клеточного рецептора. Для конструирования искусственных везикул, экспрессирующих антигены CAR, в данной работе был использован цитохалазин В, химический агент, который приводит к отслоению плазматической мембраны и образованию закрытых мембранных структур, нагруженных специфичными антигенами. Данные антиген-презентирующие везикулы оказались эффективны в стимуляции и экспансии CAR-T-клеток и способны к усилению их функциональной активности. Разработанный нами подход также позволил упростить идентификацию, отслеживание и ведение в культуре активированных CAR-T-клеток, пригодных для клинических целей.

6.6. РЕТРОВИРУСНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ ГЕНА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ ПРОХОДИТ НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНО В KIR2DL2/DL3⁺ НК-КЛЕТКАХ

Устюжанина М.О.^{1,2}, Стрельцова М.А.², Коваленко Е.И.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
mashaust1397@gmail.com

Генетическая модификация НК-клеток является перспективным направлением в противоопухолевой иммунотерапии. Было показано, что при дополнительной вставке гена каталитической субъединицы теломеразы (hTERT) увеличивается пролиферативный потенциал НК-клеток, что позволяет проводить с ними длительные исследования. Однако, процесс модификации НК-клеток проходит с разной эффективностью. Поиск субпопуляций НК-клеток, оптимальных для генетической модификации, является актуальной научной задачей. Экспрессия рецепторов KIR2DL2/DL3 отличает более зрелые НК-клетки, как правило, прошедшие процесс "обучения", от менее дифференцированных. Цель данной работы заключалась в проведении сравнительного анализа восприимчивости субпопуляций KIR2DL2/DL3⁺ и KIR2DL2/DL3⁻ НК-клеток к трансдукции с помощью ретровирусных частиц, содержащих ген hTERT.

НК-клетки выделяли с помощью отрицательной магнитной сепарации мононуклеаров периферической крови и культивировали в присутствии IL-2 и клеток K562-mbIL21 в течение 7 дней, после которых проводилась модификация НК-клеток. Сборку ретровирусных частиц проводили в клеточной линии Phoenix ampho, конститутивно экспрессирующей амфотропный белок оболочки вирусной частицы и обратную ревертазу, с использованием кальций-фосфатного набора. Для трансфекции использовали плазмиды xlox(GFP)hTERT и RD114. Было отмечено, что после трансдукции увеличивается доля НК-клеток, содержащих на своей поверхности рецепторы KIR2DL2/DL3. Для дальнейшего исследования на 5-й день культивирования проводили разделение НК-клеток по наличию или отсутствию рецепторов KIR2DL2/DL3 путём клеточной сортировки. Эффективность трансдукции регистрировали по уровню флуоресценции репортерного белка GFP. Процентное содержание клеток GFP⁺ было выше в субпопуляции НК-клеток KIR2DL2/DL3⁺, чем в субпопуляции KIR2DL2/DL3⁻ НК-клеток. Далее в течение 2 месяцев еженедельно проводились повторные измерения уровня экспрессии GFP. Обнаружено, что доля модифицированных НК-клеток в субпопуляции KIR2DL2/DL3⁺ сохранялась на более высоком уровне относительно KIR2DL2/DL3⁻ НК-клеток.

Таким образом, было показано, что наличие рецепторов KIR2DL2/DL3 на поверхности НК-клеток соответствует более эффективной трансдукции гена hTERT.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00407.

6.7. АКТИВАЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ОПРЕДЕЛЯЕТ СПАЕЧНЫЙ ПРОЦЕСС

Царегородцева Д.С.¹, Коновалова М.В.², Коцарева О.Д.²,
Свирицевская Е.В.²

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
tsaregorodtseva.daria@yandex.ru

В настоящее время активно разрабатываются биоматериалы на основе полисахаридов для предотвращения спайкообразования. Известно, что ряд биополимеров частично подавляет формирование спаек при абдоминальных операциях. Для повышения эффективности противоспаечных материалов требуется понимание механизмов спайкообразования. Целью данной работы является исследование механизмов формирования спаечного процесса в мышинной модели. Моделирование спаечного процесса проводили на мышах C57BL/6 путём повреждения участка слепой кишки и прилежащего участка брюшной стенки. Тяжесть спаечного процесса оценивали по 5 балльной системе, где 0 баллов означает отсутствие спаек. Для предупреждения формирования спаек использовали новый препарат на основе карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), который эффективно подавляет спаечный процесс. У мышей со спаечным процессом (3 балла), мышей оперированных с введением КМЦ без спаечного процесса (0 балла), а также интактных забирали фрагменты брюшной стенки (мезотелий) и слепой кишки (эпителий) в зоне повреждения и клетки перитонеального экссудата (иммунные клетки). Из полученных клеток и тканей выделяли РНК, синтезировали кДНК и проводили анализ экспрессии панели из 21 гена (tPA, PAI, MMP1, MMP3, MMP5, MMP7-10, TIMP1-4, Fibrin α , β и γ , tropoelastin, collagen, hyaluronidase, TGF β и IL-6), потенциально вовлеченных в спаечный процесс. Среди всех выявили экспрессию только 7 генов: металлопротеиназ MMP5 и 8, ингибитора TIMP2, фибринов α , β , γ и гиалуронидазы. При формировании спаек экспрессия всех этих генов снижалась по сравнению с интактными мышами в среднем в 10 раз в клетках перитонеального экссудата, не менялась в мезотелиальных клетках (0,9-1,1 раз) и незначительно ($p=0,061$) повышалась в клетках слепой кишки (1,3-2,4 раза). Введение геля КМЦ предупреждало формирование спаек, что сопровождалось повышением экспрессии всех семи генов в 27-183 раза в клетках перитонеального экссудата и не влияло на клетки мезотелия и слепой кишки (в среднем снижалась в 0,7 и 0,8 раз соответственно).

Полученные данные показали, что в процессе образования спаек участвуют, главным образом, иммунные клетки, а не поврежденные клетки мезотелия и слепой кишки.

6.8. ЭФФЕКТ ЧАСТИЦ ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА НА АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ

Чудаков Д.Б.¹, Коновалова М.С.¹, Царегородцева Д.С.², Фаттахова Г.В.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва
boris-chudakov@yandex.ru

Введение. В повсеместном росте числа аллергических заболеваний не последнюю роль играют различные аэрополлютанты, в том числе частицы дизельного топлива (ЧДТ), образуемые при неполном сгорании последнего, в особенности их фракции имеющие размер менее 2,5 мкм.

Целью работы была проверка способности ЧДТ разного размера стимулировать продукцию специфических IgE и IgG антител на интраназально вводимый аллерген.

Методы. В качестве аллергена использовали овальбумин (OVA), вводимый интраназально в течении 9 недель в дозах 0,3; 3; 30 мкг/иммунизацию. 2 раза в неделю мышам линии BALB/c. OVA вводили без частиц или вместе со стандартизованными частицами SRM1650B (средний размер 0,18 мкм, доля фракции частиц с $d < 0,1$ мкм 2%) или SRM2786 (средний размер 2,8 мкм, доля фракции частиц с $d < 0,1$ мкм 16%) в двух дозах - 30 или 150 мкг/иммунизацию.

Результаты. Достоверная продукция специфического IgE наблюдалось только при совместном введении OVA высокой дозы (150 мкг) частиц SRM1650B ($p=0,003$; 0,007; 0,004 для низкой, средней и высокой доз OVA соответственно) и частиц SRM2786 ($p=0,033$; 0,117; 0,044). Адьювантный эффект частиц SRM1650B в группах OVA 3 и 30 мкг на продукцию IgG1 был достоверен только при их введении частиц в дозе 150 мкг ($p=0,023$ и 0,031), а при использовании дозы OVA 0,3 мкг - как в высокой (150 мкг), так и низкой (30 мкг) дозе ЧДТ ($p=0,005$ в обоих случаях).

Выводы. ЧДТ стимулировали продукцию IgE и IgG1 при попадании в легкие в высоких дозах независимо от дозы OVA и размера частиц. Таким образом, частицы дизельного топлива провоцируют формирование аллергического ответа на респираторные аллергены.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-05-50064.

6.9. ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИОКСИДОНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ МЫШЕЧНОЙ СТАДИИ ТРИХИНЕЛЛЕЗА

Шитова А.А., Медведева В.С., Стрельникова И.А., Россохин Д.С.

Кировский государственный медицинский университет, Киров
alinashitova15@gmail.com

Цель исследования - оценить эффективность азоксимера бромид (полиоксидония) по реакции лимфоидной ткани селезенки (периферический орган кроветворной и иммунной систем) при трихинеллезе. Трихинеллез - опасный паразитоз человека и животных, вызываемый гельминтами: *Trichinella spiralis (spiralis)* и *Trichinella pseudospiralis*, протекает остро и хронически. При экспериментальном пероральном заражении 20 мышей личинками трихинелл (штамм ВИГИС) с завершенным циклом развития в организме одного хозяина, установлено, что половозрелая стадия локализуется в тонком отделе кишечника, личиночная - в поперечно-полосатой мышечной ткани, персистируя длительное время (2 месяца), 10 мышей составили контрольную группу. Полиоксидоний в дозе 0,01 мкг на животное, вводили 2-кратно до и после заражения. Животных выводили из опыта через 90 дней, в соответствии с Хельсинской Декларацией. (1988). Во время наблюдения за зараженными животными отмечали мышечную скованность и малоподвижность, у животных, получавших полиоксидоний данные симптомы были не выражены. При гистологическом и морфометрическом исследовании селезенки, окрашенной гематоксилин-эозином установлено, что она составляет более 7% объема, в норме этот орган 5-7% от массы тела. Белая пульпа (совокупность лимфоидной ткани, образованная лимфатическими узелками (В-зависимые зоны) и лимфатическими периартериальными влаглищами (Т-зависимые зоны) при макроскопическом изучении срезов селезенки обнаруживалась в виде светло-серых округлых образований, составляющих в норме 20% органа, а при трихинеллезе увеличивалась до 90%, у животных, получавших полиоксидоний до 95%. В обеих группах мышей лимфоидные узелки распределяются диффузно по всей площади среза. Также обнаружено преобладание молодых форм клеток у животных, получавших полиоксидоний, и активных макрофагов в центрах размножения лимфатических узелков красной и белой пульпы, что свидетельствует о высоком уровне лимфоцитопоза на фоне иммуностимулирующего влияния, вышесказанное обусловлено тем, что краевая зона лимфатических узелков является местом формирования иммунного ответа. Таким образом, белая пульпа селезенки мышей активно реагирует на трихинеллезную инвазию, и эта реакция более выражена в условиях иммуностимуляции полиоксидонием. Полученные результаты свидетельствуют о высокой степени реактивности лимфоидной ткани опытных животных в ответ на введение иммуностимуляторов, что является маркером протективной эффективности.

СЕКЦИЯ 7

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

7.1. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ БЕЛКОВ СПЛАЙСОСОМЫ В МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ И РАЗВИТИИ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Баймуханова Ж.Ж., Иванова О.М., Шнайдер П.В., Семенов И.А., Шендер В.О.

ФНКИ физико-химической медицины ФМБА, Москва
mrblack8754@gmail.com

Клетки злокачественных опухолей находятся в постоянном динамичном общении друг с другом и со своим микроокружением. Известно, что погибающие под действием химиотерапии (ХТ) раковые клетки способны секретировать во внеклеточное пространство различные сигнальные молекулы и, тем самым, способствовать выживанию соседних опухолевых клеток, многократно повышая их устойчивость к последующей ХТ. Ранее нашей группой было показано, что погибающие опухолевые клетки способны специфически секретировать во внеклеточное пространство белки сплайсосомы [Shender et al.//MCP, 2014; Pavlyukov et al.//Cancer Cell, 2018; Anufrieva et al.//Genome Medicine, 2018]. Однако дальнейшая судьба секретлируемых сплайсосомных белков неизвестна. Мы предположили, что белки сплайсосомы способны проникать в реципиентные опухолевые клетки, и приводить к формированию химиорезистентности.

На первом этапе работы с помощью ко-трансфекции опухолевых клеток двумя плазмидами, кодирующими белок сплайсосомы (SRSF4), слитый с флуоресцентным белком RFP, и один из белков стрессовых гранул (TIA-1), слитый с флуоресцентным белком EGFP, методами флуоресцентной микроскопии было показано, что под действием цисплатина SRSF4 перемещается из ядра в цитоплазму клеток, секретруется во внеклеточное пространство и далее проникает в реципиентные опухолевые клетки в составе внеклеточных везикул.

Далее, с применением лентивирусных конструкций была получена клеточная линия SKOV3 со стабильной сверхэкспрессией белка SRSF4. С помощью МТТ-теста было показано, что повышенная представленность этого белка в опухолевых клетках способствует приобретению их устойчивости к действию цисплатина.

Таким образом, была показана возможность транспорта белка сплайсосомы SRSF4 от погибающих под действием химиотерапии опухолевых клеток к микроокружению опухоли в составе внеклеточных везикул. Полученные данные подтверждают предположение о важной роли белков сплайсосомы в формировании химиорезистентности опухолей.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-10123.

7.2. ДЕГИДРОГЕНАЗА D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ПИРУВАТА

Басс Д.Ю., Потехина Е.С., Белоусов В.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
bass.dina2014@yandex.ru

Нарушения транспорта пирувата в митохондриях и его окисления наблюдаются при многих типах рака. Стимуляция окислительного метаболизма часто замедляет рост опухолей. Чтобы оценить влияние внутримитохондриальной концентрации пирувата на раковые клетки, мы разрабатываем инструмент для её регуляции на основе дегидрогеназы D-аминокислот (DadA) из *Pseudomonas aeruginosa*. Этот FAD-зависимый фермент окисляет D-аланин до пирувата и аммиака. Поскольку D-аланин практически отсутствует в клетках млекопитающих, активность DadA контролируется добавлением субстрата извне.

Для повышения растворимости DadA и наблюдения за её локализацией *in vivo* получили химерные конструкции из DadA и флуоресцентных белков mRuby и EGFP с сигналом митохондриальной локализации. Конструкции mRuby-DadA и EGFP-DadA имели ту же активность, что фермент дикого типа. При экспрессии в клетках HeLa Kyoto химерные белки, в отличие от DadA дикого типа, не образовывали агрегатов и локализовались в митохондриях. Также получили неактивный вариант DadA, заменив на остатки аланина консервативные аминокислотные остатки Tyr17 и Tyr18, предположительно связывающие FAD. Мутантный вариант DadA использовался во всех экспериментах в качестве контроля.

При добавлении раствора D-аланина к клеткам, экспрессирующим mito-EGFP-DadA, мембранный потенциал митохондрий возрастал по сравнению с исходным значением и с контролем. Было показано, что активность DadA способна компенсировать падение мембранного потенциала при ингибировании митохондриального переносчика пирувата α -циано-4-гидроксикоричной кислотой. При ингибировании комплекса I ротеноном активность DadA не повышала мембранный потенциал митохондрий, что указывает на решающую роль пирувата и продукта его окисления, NADH, в этом эффекте. Также было показано, что активность DadA не приводит к накоплению пероксида водорода или изменениям pH в матриксе митохондрий.

Полученные данные позволяют предположить, что используемые конструкции активны в экспериментальных условиях, а образуемый ими пируват способен усиливать окислительный метаболизм митохондрий. В то же время экспрессия и активность DadA не приводят к развитию видимых патологических процессов в митохондриях.

7.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НОКАУТА ГЕНА *insrr*, КОДИРУЮЩЕГО РЕЦЕПТОР IRR, НА РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ

Гавриленкова А.А.^{1,2,3}, Ганцова Е.А.^{1,3}, Деев И.Е.^{1,3}, Серова О.В.^{1,3}, Петренко А.Г.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

³Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи
alycat1008@gmail.com

Рецепторная тирозинкиназа IRR, принадлежащая к семейству рецептора инсулина, участвует в регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме. В отличие от своих близких гомологов рецепторов IR и IGF-IR, которые экспрессируются в широком спектре тканей и клеток, экспрессия IRR специфична. IRR обнаружен в почках, поджелудочной железе, желудке, мозге, ганглиях спинного мозга. Кроме того, экспрессия IRR обнаруживается уже на стадии одноклеточного эмбриона и максимальна на эмбриональной стадии развития E14.5, где он экспрессируется в симпатических ганглиях, в поджелудочной железе и почках, что предполагает роль рецептора в развитии организма.

Для исследования роли рецептора IRR в развитии эмбрионов мы использовали Mouse Embryo Assay (MEA-тест). У самок мышей дикого типа и нокаутных по гену рецептора IRR стимулировали суперовуляцию, подсаживали их на ночь к самцам, затем у оплодотворенных самок извлекали эмбрионы на стадии зиготы. Деление эмбрионов анализировали каждые сутки в течение 120 часов с момента оплодотворения. Оценку развития осуществляли с помощью индекса выхода бластоцист - процента образования бластоцист из общего количества извлеченных эмбрионов. Результаты этих экспериментов показали, что выход бластоцист у нокаутных по IRR животных значительно ниже, чем у животных дикого типа, 9% от общего количества извлеченных клеток у нокаутных животных и 42% у животных дикого типа. Также у нокаутных животных наблюдалось большее количество дефектных яйцеклеток. Полученные данные свидетельствуют о роли рецептора IRR в развитии организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, гранты №№ 19-04-01042, 19-34-90177.

7.4. ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА *insrr* НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКОВ ПОЧКИ МЫШИ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Ганцова Е.А.^{1,2}, Серова О.В.^{1,2}, Можяев А.А.^{1,2}, Деев И.Е.^{1,2}, Петренко А.Г.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи
gantsova@mail.ru

Рецептор, подобный рецептору инсулина (ИРР) - одна из рецепторных тирозинкиназ, входит в минисемейство рецептора инсулина. ИРР активируется слабощелочной внеклеточной средой и экспрессируется в поджелудочной железе, нервной системе, а также в почках, в β -интеркалирующих клетках дистального канальца. Функцией этих клеток является секреция бикарбоната, таким образом, почки мышей могут стать новой моделью для изучения рН-чувствительных рецепторов. Ранее нами была получена уникальная линия мышей на базе линии C57BL/6 с нокаутом гена *insrr*. Для изучения влияния нокаута гена *insrr* на профиль экспрессии белков в почке, были взяты две группы мышей (дикий тип и нокаутный) и осуществлено широко-масштабное секвенирование почек. Дополнительно сравнивали данные секвенирования в условиях экспериментального алкалоза (в воду для питья животных добавляли 250 мМ NaHCO₃). После обсчета данных с помощью биоинформатических методов были получены четыре набора генов, экспрессия которых значительно изменялась в разных генотипах. Гены были сгруппированы по уровню изменения экспрессии, аннотированы и среди них были выбраны те, которые являются потенциально рН-чувствительными. Для подтверждения полученных результатов секвенирования, был выбран метод ПЦР в реальном времени. Для проверки были выбраны следующие гены: *slc51b*, *slc26a4*, *rps7*, *aqp6*, *slc5a2*, *plcd1*. В качестве референсного гена, основываясь на литературных данных, выбрали *ap3d1*, так как экспрессия стандартного гена *gapdh* сильно изменялась в сравнении дикого типа и нокаутного по данным NGS. В качестве матрицы использовали кДНК, полученную для РНК из почек мышей методом обратной транскрипции. В результате данного эксперимента получили подтверждение достоверных изменений экспрессии генов *slc26a4*, *rps7*, *aqp6*, *plcd1*, *slc5a2* для дикого типа и нокаутных мышей и при нейтральном рН, критерий значимости $p\text{-value} < 0,05$. Результаты подтвердили данные, ранее полученные при помощи секвенирования. Таким образом, почки регулируют ионный обмен за счет изменения экспрессии этих генов, вызывая компенсаторный механизм защиты организма от нарушений кислотно-щелочного баланса у мышей, нокаутных по *insrr*.

Работа выполнена в рамках грантов РФФИ №№ 19-34-90177, 19-04-01042, 19-34-51034, 18-04-01369, 20-04-0959.

7.5. ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА SLURP-1 НА РОСТ И МИГРАЦИЮ КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ ЛИНИЙ МЕЛАНОМЫ

Кириченко А.В.^{1,2}, Бычков М.Л.², Шлепова О.В.^{1,2}, Шуленко М.А.^{1,3},
Люкманова Е.Н.^{1,2,3}

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва
bittert@mail.ru

Меланома является быстроразвивающейся опухолью кожи, часто не отвечающей на химиотерапию, в связи с чем необходим поиск новых таргетных препаратов, действующих на важные для развития неоплазии мишени. Известно, что активация $\alpha 5$, $\alpha 7$ и $\alpha 9$ -nAChR стимулирует пролиферацию и миграцию опухолевых клеток посредством запуска митогенных сигнальных путей. Таким образом, ингибиторы nAChR, и $\alpha 7$ -nAChR, в частности, могут стать перспективными прототипами новых таргетных препаратов для лечения меланом. Трехпетельный секретируемый эндогенный белок человека SLURP-1 является аллостерическим ингибитором $\alpha 7$ -nAChR и тормозит пролиферацию опухолевых клеток эпителиального происхождения. Целью данной работы являлось изучение влияния rSLURP-1 на первичные линии меланом, полученных от пациентов онкоцентра им. Блохина. Эксперименты проводились на низкодифференцированных клеточных линиях: mel Cher, mel Gi, mel Kor, mel H и умереннодифференцированной линии меланомы mel P.

При помощи ПЦР в реальном времени было показано, что все исследуемые линии экспрессируют ген *SLURP-1*, гены структурных гомологов SLURP-1 *SLURP-2* и *LYNX1*, а также гены, кодирующие $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ субъединицы nAChR и ген *CHRFAM*, гибрид гена *CHRNA7* и гена *FAM*, модулирующий работу $\alpha 7$ -nAChR. Наибольшая экспрессия *CHRNA7* и *SLURP-1* наблюдается в клетках mel H, mel Kor и mel Cher. С помощью теста WST-1 было показано, что rSLURP-1 не влияет на пролиферацию клеток mel Kor, mel Cher, mel Gi и mel P, но тормозит рост клеток mel H до ~ 50% относительно контроля при 48-часовой инкубации. Известно, что потребление никотина способствует прогрессии многих типов опухолей, поэтому нами было изучено влияние никотина на рост клеток mel H. Показано, что при постоянном культивировании клеток mel H с 100 нМ никотина, уровень экспрессии $\alpha 7$ -nAChR на поверхности клеток увеличивается. При этом, rSLURP-1 ингибирует пролиферацию клеток mel H, культивированных с 100 нМ никотина, до ~ 55% по сравнению с клетками, необработанными rSLURP-1. С помощью конфокальной микроскопии было показана частичная со-локализация функционально-активного $\alpha 7$ -nAChR и флуоресцентно-меченного rSLURP-1 в клетках исследуемых линий.

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

7.6. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ SYK И FLT3 В ВЫЖИВАНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА И РАКА ЛЕГКИХ

Мухеева А.М.¹, Лебедев Т.Д.², Ваганова Э.Р.^{1,2}, Прасолов В.С.^{1,2}

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

²Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва
mikheeva.am@phystech.edu

Ферменты семейства SYK - это нерецепторные цитоплазматические тирозинкиназы человека, которые участвуют в регуляции иммунного ответа. Одной из наиболее изученных ролей SYK является передача сигнала от Т-клеточных рецепторов и рецепторных тирозинкиназ, таких как FLT3, в гемопоэтических клетках.

Повышенная экспрессия FLT3 и её мутации выявляются в основном в клетках лейкозов, и было показано, что при совместном ингибировании SYK и FLT3, гибель лейкозных клеток значительно увеличивается. Однако высокая экспрессия данных киназ наблюдается в клетках и других злокачественных образований. Но роль SYK и FLT3 в выживании злокачественных клеток не лейкозной природы остаётся мало изученной.

В ходе данной работы методом ПЦР в реальном времени нами был проведен анализ экспрессии SYK и FLT3 в клетках колоректального рака (HCT-116, HT-29, SW-480), рака молочной железы (SK-BR-3, MCF-7) и немелкоклеточного рака легких (H1299, A549). Так же нами была проведена оценка чувствительности данных клеточных линий к ингибитору SYK и FLT3 - R406 и ингибитору FLT3 - Quizartinib.

На данном этапе работы нами было отмечено, что киназы SYK и FLT3 в разных типах злокачественных клеток экспрессируются независимо друг от друга, что предположительно может указывать на то, что они выполняют независимые друг от друга функции. Было установлено, какие клеточные линии являются наиболее чувствительными к данным ингибиторам.

7.7. ОЦЕНКА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО УРОВНЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА, ИНДУЦИРОВАННОГО КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМОЙ MnClTPP/АК

Моллаева М.Р.^{1,2}, Никольская Е.Д.^{1,2}, Сокол М.Б.^{1,2}, Фомичева М.В.^{1,2}, Яббаров Н.Г.^{1,2}

¹Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
mollaevamariia@gmail.com

Методы лечения опухолевых заболеваний, основанные на формировании активных форм кислорода (АФК), представляют большой исследовательский интерес. Значительное повышение внутриклеточных уровней АФК приводит к окислительному стрессу и последующей гибели опухолевой клетки. Одним из перспективных индукторов формирования АФК является каталитическая пара металлопорфирина/аскорбиновая кислота (АК), которая повреждает ДНК опухолевых клеток в результате образования супероксид анион радикала. В данном исследовании использовали $MnCl_3$ -тетрафенилпорфирин ($MnClTPP$), поскольку он обладает высокой каталитической активностью, вследствие чего требуются более низкие концентрации $MnClTPP$, а также малые соотношения с АК. Однако, высокая гидрофобность $MnClTPP$ и короткий период полураспада в плазме ограничивают его биологическое применение. Для повышения растворимости и увеличения стабильности $MnClTPP$ включили в носитель - сополимер молочной и гликолевой кислот (ПМГК). Полученные частицы и субстанцию исследовали на способность индуцировать сильный окислительный стресс в комбинации с АК в отношении клеток линии MCF7 (аденокарцинома молочной железы человека). В качестве маркера окислительного стресса был использован 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (ДХФ). Было показано, что комбинация АК и частиц с $MnClTPP$ при одних и тех же концентрациях, индуцировала сильный окислительный стресс посредством образования АФК в 2 раза быстрее в сравнении с $MnClTPP$ /АК. Полученные данные коррелировали с результатами исследования цитотоксической активности комбинаций АК и полимерной формы $MnClTPP$ (IC_{50} 0.98 μM) и $MnClTPP$ /АК (IC_{50} 2.67 μM) в отношении клеток линий MCF7. Таким образом, комбинация $MnClTPP$ и АК представляется перспективной системой для терапии опухолевых заболеваний, а включение $MnClTPP$ в полимерную матрицу не только не влияет на его каталитические свойства, но и повышает активность комбинации $MnClTPP$ /АК *in vitro*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-09022\19.

7.8. TRPA1 КАНАЛ КУРИЦЫ КАК ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТЬЮ НЕЙРОНОВ И АСТРОЦИТОВ

Мухаметшина Л.Ф.^{1,2}, Солюс Г.М.², Мальцев Д.И.², Подгорный О.В.^{2,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва
mukhametchinal@gmail.com

Термогенетика - метод активации клеток, экспрессирующих термочувствительные катионные каналы семейства TRP (Transient receptor potential), с помощью нагревания. Отличительной особенностью термогенетики является то, что активация осуществляется за счет поступления двухвалентных катионов в клетки, в основном, кальция. Кальций выполняет роль универсального инструмента активации внутриклеточных процессов. Метод термогенетической активации нервных клеток хорошо зарекомендовал себя на таких объектах, как дрозофила и *Danio rerio*. Однако, термогенетика пока еще не получила широкого распространения на млекопитающих из-за узкого спектра термочувствительных каналов, пороговая температура активации которых лежала бы в узком диапазоне между 37 и 41-42°C. Например, канал TRPV1 человека, являющийся наиболее перспективным каналом для термогенетики на млекопитающих, имеет температурный порог активации около 43°C. При длительном нагреве клеток до такой температуры происходят деструктивные процессы, ведущие к их гибели. Поэтому необходимы другие каналы со схожей проводимостью, но пороги активации которых должны находиться в более безопасных температурных диапазонах. Перспективным кандидатом является TRPA1 канал курицы, температурный порог активации которого составляет 40°C. В этой связи мы клонировали открытую рамку считывания TRPA1 канала курицы в экспрессионный вектор. Исследуемый канал был помещен в одну рамку считывания с репортерным флуоресцентным белком tdTomato через последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид p2A. Далее мы провели тестирование термо- и хемочувствительности TRPA1 курицы при его экспрессии в клетках линий HeLa и HEK293. Ответ клеток регистрировали с помощью флуоресцентного кальциевого сенсора GCaMP6s. При нагревании клеток более 40°C и при добавлении аллил изотиоцианата, химического агониста TRPA1 каналов, мы наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора GCaMP6s в клетках, экспрессирующих tdTomato. Полученные нами результаты показывают, что рекомбинантный TRPA1 канал курицы проявляет функциональную активность при его гетерологичной экспрессии в клетках линий HeLa и HEK293 и может быть использован для термогенетической активации клеток млекопитающих.

7.9. ИНГИБИТОР СИНТЕЗА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ 4-MU КАК МОДУЛЯТОР ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА В АСТРОЦИТАХ

Никольская А.И.¹, Чистяков Д.В.², Сергеева М.Г.²

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
arnikol31@gmail.com

Введение. Астроциты - глиальные клетки мозга, играющие важную роль в регуляции системы врожденного иммунитета центральной нервной системы (ЦНС) и связанных с этой системой воспалительных процессов. Одним из основных компонентов системы врожденного иммунитета являются Толл-подобные рецепторы (TLR), способные отвечать как на экзогенные, так и на эндогенные стимулы. Гиалуроновая кислота (HA), ключевой компонент внеклеточного матрикса, способна активировать TLR4. Известно, что 4-метилумбеллиферон (4-MU), ингибитор синтеза гиалуроновой кислоты, влияет на воспалительный ответ разных типов клеток, однако его действие на клетки ЦНС не изучено.

Цель. Изучение противовоспалительных свойств 4-MU при активации TLR4 астроцитов.

Материалы и методы. Первичные астроциты выделяли из мозга новорожденных крысят. Клетки инкубировали 30 минут с ингибитором синтеза HA 4-MU (10, 100 и 400 μ M), затем стимулировали агонистом TLR4 липополисахаридом (LPS, 100 ng/ml) в течение 4 или 24 часов. Методом ПЦР в реальном времени оценивалась экспрессия генов маркеров воспаления (iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, C3, IL-10). Концентрация HA в супернатанте и количественное содержание TNF- α , IL-1 β , IL-6 измерялись методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Стимуляция LPS индуцирует экспрессию провоспалительных генов (iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, C3) и противовоспалительного гена интерлейкина IL-10. Ингибитор 4-MU в концентрации 400 μ M снижает LPS-индуцированную экспрессию TNF- α , IL-6, не оказывает влияние на экспрессию генов C3 и iNOS, повышает экспрессию IL-10. Для TNF- α , IL-10 и IL-6 изменение экспрессии на уровне мРНК подтверждено изменениями на уровне белка. Показано также, что стимуляция LPS приводит к накоплению HA во внеклеточной среде, причем эффект зависит от длительности стимуляции. При обработке 4-MU наблюдается снижение концентрации HA, зависящее от концентрации ингибитора.

Выводы. На уровне клеточного ответа астроцитов обнаружена противовоспалительная активность 4-MU. Это позволяет оценить ингибитор 4-MU как перспективный препарат для лечения заболеваний ЦНС, сопровождаемых развитием воспалительных процессов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-10298.

7.10. ИЗМЕНЕНИЕ ЯДЕРНОЙ ЛАМИНЫ ПРИ СИНДРОМЕ КОККЕЙНА

Ноздрачева А.В.^{1,2}, Плескач Н.М.², Куранова М.Л.²

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

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
shurupchi@mail.ru

Ядерная ламина является важным элементом клеточного ядра, который участвует в организации хроматина и подстилает ядерную мембрану. Она участвует в дезинтеграции ядерной оболочки во время митоза и других клеточных процессов, таких как апоптоз и аутофагия. При физиологическом и ускоренном старении происходят изменения в состоянии ядерной ламины и её утончение.

Методом непрямой иммунофлюоресценции нами было исследовано состояние ядерной ламины в пяти клеточных линиях дермальных фибробластов пациентов с синдромом Коккейна (CS4SP, CS5SP, CS6SP, CS7SP и CS8SP) 7, 13, 2, 8 и 3 лет соответственно, для которого характерно ускоренное старение клеток, задержка нервного развития и светочувствительность. В качестве контрольной группы использовались клеточные линии дермальных фибробластов здоровых доноров 5 и 10 лет. Все линии были от пациентов мужского пола. Все клеточные линии были получены в лаборатории радиационной цитологии Института цитологии РАН. Клеточные линии окрашивались антителами LMNA A/C (Abcam, Великобритания). Микроскопию проводили при помощи конфокального микроскопа Leica Microsystems.

В качестве оценочных параметров ядерной ламины рассматривали наличие одновременно блеббов и инвагинаций, которые считаются признаком старения клетки, а также фрагментированных частей ламины, позволяющих судить о начале процесса аутофагии. Также оценивалась степень истончение ядерной ламины, то есть наличие характерного ободка. В каждой клеточной линии было проанализировано 300 клеток.

Результаты работы показали, что во всех линиях пациентов с синдромом Коккейна наблюдалось утончение ядерной ламины и был детектирован характерный ободок. В клетках здорового донора истончение ламины не наблюдалось. Доля клеток с наличием инвагинаций и блеббов одновременно была самой высокой в линии CS8SP (16,7%), CS6SP (14%) и CS7SP (13,3%). В клетках здоровых доноров 5 и 10 лет доля инвагинаций и блеббов составляла 3,8% и 2,6% соответственно, в линиях пациентов CS5SP и CS4SP - 4% и 2,9%. В некоторых клетках линий пациентов CS6SP и CS8SP наблюдались необычные образования в ядерной ламине, напоминающие сквозные тоннели сквозь всё ядро. Возможно, это были клетки с начинавшимся процессом аутофагии клетки, так как в этих же линиях наблюдался самый высокий процент клеток с признаками аутофагии - 5,1% и 5,8%.

7.11. УСТОЙЧИВОСТЬ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ; РОЛЬ ГЛОБАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ

Падий Д.А.^{1,2}, Шевченко Н.А.², Чурсина М.А.², Плюта В.А.¹

¹Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

padydarya@gmail.com

Летучие органические соединения (ЛОС), синтезируемые микроорганизмами, имеют различные биологические функции. Их роль в жизнедеятельности организмов и возможности практического использования стали причиной повышенного интереса ученых к этим соединениям в последние десятилетия. Механизмы действия летучих веществ на клетки, в частности генетические детерминанты бактерий, вовлеченные в регуляцию ответа к действию ЛОС, изучены мало.

В данной работе была определена устойчивость штамма *Escherichia coli* AB1157 при совместном действии наночастиц серебра (НЧС) и ЛОС. Как известно, НЧС обладают антибактериальным эффектом. Ранее было показано, что ЛОС могут усиливать антибактериальное действие некоторых антибиотиков. Было установлено, что при совместном действии исследуемых ЛОС и НЧС выживаемость клеток была существенно ниже по сравнению с выживаемостью при действии ЛОС или наночастиц по отдельности. Полученные данные могут стать основой для дальнейшего практического применения ЛОС совместно с НЧС.

Также была изучена роль трех глобальных регуляторных генов *lon*, *rpoS* и *crp*, контролирующих экспрессию большого количества генов, в том числе отвечающих за устойчивость бактериальной клетки к различным типам стресса, при действии ЛОС с различными химическими структурами (диметилдисульфида, 2-фенилэтанола, изоамилового спирта и 2-октанона). Ген *lon* кодирует протеиназу, играющую важную роль в деградации дефектных и ряда короткоживущих регуляторных белков; ген *rpoS* кодирует σ^S субъединицу РНК-полимеразы; ген *crp* кодирует белок, участвующий в контроле катаболитной репрессии. В качестве модельного организма была выбрана *E. coli*, так как генетические детерминанты стрессового ответа лучше всего изучены у этой бактерии. Было показано, что при действии ЛОС мутация в гене *crp* достоверно ухудшала рост клеток; мутация в гене *lon* не влияла существенно на чувствительность клеток. Инактивация гена *rpoS* и его сверхэкспрессия не оказывали заметного эффекта на динамику роста штаммов при действии ЛОС. Таким образом, из исследованных глобальных регуляторов ответа бактериальной клетки на стресс только ген *crp* играет роль в регуляции устойчивости клеток к действию исследованных ЛОС.

Работа частично финансировалась грантом РФФИ № 18-04-00375-а.

7.12. РАННЯЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ *IN VITRO* СОПРЯЖЕНА С ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ ИММУНОСУБЪЕДИНИЦ ПРОТЕАСОМ

Поденкова У.И.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
uliana.podenkova@gmail.com

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обладают уникальными свойствами: способностью к самообновлению и дифференцировке в различные типы соматических клеток. Благодаря такой "пластичности" ЭСК имеют огромный потенциал использования в различных сферах биомедицины, в частности в регенеративной клеточной терапии. Очевидно, что для поддержания плюрипотентности необходима высокоинтенсивная работа различных систем, защищающих клетки от повреждающих факторов и старения. Одним из главных механизмов является регуляция белкового гомеостаза, по большей части обеспечиваемая убиквитин-протеасомной системой деградации белков. Протеасома является мультиферментным комплексом, который в интактном состоянии содержит каталитически активные субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$. Показано, что при воздействии медиаторов воспаления происходит замена данных субъединиц на индуцибельные LMP2/ $\beta 1i$, MECL1/ $\beta 2i$ и LMP7/ $\beta 5i$, при этом новообразованный комплекс называют иммунопротеасомой (ИП). Ранее предполагалось, что единственной функцией ИП является их участие в MHC-I-опосредованной презентации вирусных антигенов. Однако результаты последних исследований указывают на возможную роль ИП в поддержании клеточной плюрипотентности и в процессе дифференцировки ЭСК. Так, в ЭСК человека показана экспрессия генов иммунопротеасомы, которая постепенно снижалась в процессе дифференцировки. В ЭСК напротив зарегистрирован крайне низкий уровень мРНК иммунопротеасомы, а его повышение наблюдали лишь в процессе дифференцировки. В настоящий момент выделяют следующие устойчивые состояния ЭСК по мере приближения их к терминальной стадии дифференцировки: раннее (наивное), промежуточное и позднее (праймированное). Мы показали, что экспрессия генов иммунопротеасом активируется при переходе ЭСК мыши из наивного состояния в праймированное. Важно отметить, что наши экспериментальные данные подтверждают данные сравнения транскриптомов ЭСК мыши (наивных) и эпибластных стволовых клеток (праймированных) и являются свидетельством участия иммунопротеасом в поддержании праймированной плюрипотентности стволовых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№19-29-04117).

7.13. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ, ХАРАКТЕРНЫЕ ДЛЯ ГАМК-ЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ НОРМАЛЬНОМ СТАРЕНИИ

Разенкова В.А., Коржевский Д.Э.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург
valeriya.raz@yandex.ru

Введение. Основным тормозным медиатором центральной нервной системы (ЦНС) является гамма-аминомаслянная кислота (ГАМК). Поскольку тормозная система оказывает существенное влияние на обеспечение нормального функционирования процессов и реализаций функций ЦНС, а также дезорганизуется в процессе естественного старения, важным представляется изучить происходящие в ней изменения. Поэтому, целью настоящей работы было изучение морфологических характеристик ГАМК-ергической системы головного мозга крыс при старении.

Материалы и методы. Исследование выполнено на половозрелых (5-6 мес) и старых (23 мес) самцах крыс породы Вистар ($n=6$). Для выявления ГАМК-ергических структур головного мозга использовали поликлональные кроличьи антитела к GAD67 (Spring BioScience, США). Анализ и фотографирование препаратов проводили с использованием сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 800 (Carl Zeiss AG, Германия). Анализ полученных изображений проводили с помощью программ ZEN-2012 (Carl Zeiss AG, Германия). Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США).

Результаты. В результате проведенной обработки на препаратах отчетливо выявляются тела и синаптические терминалы ГАМК-ергических нейронов. Было показано, что у взрослых крыс наиболее интенсивно окрашиваются III и V слои коры головного мозга. Синаптические ГАМК-ергические терминалы у взрослых животных в основном сконцентрированы на пирамидных нейронах этих слоев, но также могут образовываться на телах и отростках ГАМК-ергических нейронов (непирамидных). Тела ГАМК-ергических нейронов коры разнообразны по своей морфологии и располагаются во всех слоях коры. На первый взгляд, распределение ГАМК-ергических структур в коре головного мозга у старых животных напоминает таковое у половозрелых крыс. Однако, в первом слое коры головного мозга (моторной и сенсорной) выявлялись тела ГАМК-ергических нейронов, чего не наблюдалось у взрослых животных. Общее количество тормозных нейронов при старении снижается ($p<0,05$, u -test). В первом слое пириформной коры усиливается иммуногистохимическая реакция на GAD67 за счет увеличения скоплений крупных синаптических терминалов.

Выводы. Полученные данные о морфологических особенностях ГАМК-ергической системы у половозрелых и стареющих крыс характеризуют функциональные изменения, происходящие в ЦНС в ходе старения.

7.14. ПОИСК ВОЗМОЖНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ И РАКОВЫХ КЛЕТОК ПРИ КО- КУЛЬТИВАЦИИ В 3D КОЛЛАГЕНОВОМ ГЕЛЕ

Ракитина О.А.^{1,2}, Дидыч Д.А.¹, Алексеенко И.В.¹, Кузьмич А.И.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

rakitinaolga97@gmail.com

Развитие и метастазирование опухолей, а также ответ опухолей на терапию во многом определяются опухолевой стромой. Важным компонентом стромы являются опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) - это рекрутированные в строму опухоли фибробласты, которые активируются раковыми клетками. В результате активации фибробласты приобретают фенотип, характеризующийся, в том числе, экспрессией генов-маркеров ОАФ, активным ремоделированием внеклеточного матрикса (ВМ) и продукцией цитокинов и факторов роста, способствующих метастазированию опухоли. В настоящее время взаимодействия раковых и стромальных клеток, в том числе, ОАФ, активно изучаются. Изучение взаимодействий раковых и стромальных клеток *in vivo* ограничено, поэтому ведется разработка удобных *in vitro* моделей для изучения таких взаимодействий. Целью данной работы было выявить возможные взаимодействия раковых клеток и фибробластов между собой, происходящие при их ко-культивации в трехмерном коллагеновом геле.

Клетки колоректального рака (линии HT29 или SW480) и предварительно окрашенные фибробласты кожи ко-культивировали в коллагеновом геле в течение 5 суток, после чего разделяли с помощью FACS. Из собранных популяций клеток выделяли РНК, которую подвергали RNA-seq анализу, дифференциальная экспрессия генов определялась относительно монокультур раковых клеток и фибробластов, культивируемых в тех же условиях. Анализ данных RNA-seq показал, что в фибробластах из полученных ко-культур наблюдается повышение экспрессии некоторых генов-маркеров ОАФ, а также генов, связанных с биосинтезом и ремоделированием ВМ, что соответствует процессам, происходящим при рекрутировании фибробластов в опухоль. Также, на основе экспрессии генов известных лигандов и рецепторов в ко-культивированных клетках, мы выявили взаимодействия, которые могут существовать между раковыми клетками и фибробластами - 604 в случае HT29 и 702 в случае SW480. Среди найденных взаимодействий, 186 активируются при ко-культивации в обоих ко-культурах, 60 в ко-культуре с HT29 и 127 в ко-культуре с SW480. Таким образом, в ходе работы были найдены и проанализированы потенциально существующие взаимодействия между фибробластами и раковыми клетками.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-00-00194 (17-00-00190).

7.15. ДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА БИОПЛЕНКИ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* И НА QUORUM SENSING СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ

Сидорова Д.Е.¹, Скрипка М.И.^{1,2}, Плюта В.А.¹, Хмель И.А.¹

¹Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный
misenok1@gmail.com

Летучие органические соединения (ЛОС), синтезируемые микроорганизмами, играют важную роль в поддержании популяции бактерий в экологических нишах. Данные вещества могут влиять на активность ферментов, на экспрессию генов других организмов, выполнять роль химических сигналов, действовать на Quorum Sensing (QS) систему регуляцию бактерий и на Quorum Quenching (QQ) - процесс, подавляющий QS бактерий.

Известно, что QS является одним из ключевых факторов в образовании бактериальных биопленок - сложных сообществ клеток на субстрате, заключенных в экзополимерный матрикс. Биопленки обладают высокой устойчивостью к воздействию антибиотиков, бактериофагов и факторов внешней среды. В настоящее время актуальны поиски средств и методов, позволяющих эффективно избавляться от бактериальных биопленок и предупреждать их образование.

Целью настоящей работы является изучение биологической активности ЛОС с различной химической структурой, синтезируемых бактериями разных таксономических групп: спиртов (изоамиловый, 2-фенилэтанол), кетонов (2-бутанон, 2-пентанон, 2-октанон, β -ионон - ненасыщенный кетон), терпенов (лимонен и α -пинен). Изучалось влияние этих веществ на образование биопленок и зрелые биопленки фитопатогенных бактерий *A. tumefaciens* Chry-5 и C58, а также действие ЛОС на QS системы LuxI/LuxR, LasI/LasR и RhII/RhlR типа с помощью специфических lux-биосенсоров.

Агробактерии в составе сформировавшихся биоплёнок были более устойчивыми к токсичному воздействию ЛОС, чем на стадии их образования. Наибольшее ингибирующее действие в обоих случаях оказывали 2-октанон, изоамиловый спирт и 2-фенилэтанол.

Изоамиловый спирт, 2-фенилэтанол и 2-октанон осуществляли QQ у систем всех трёх типов (уменьшение биолюминесценции ~ на 90%) в количествах, не оказывающих значительного бактерицидного действия на клетки lux-биосенсоров. QS система LuxI/LuxR типа была также чувствительна к β -ионону (снижение биолюминесценции ~ на 95%) и в меньшей степени к 2-пентанону (снижение ~ на 60%), однако в случае систем RhII/RhlR и LasI/LasR типа эти соединения не снижали QS.

Работа частично финансировалась грантами РФФИ №№ 18-34-00396-мол_а, 18-04-00375-а.

7.16. ОДНОВРЕМЕННЫЙ МОНИТОРИНГ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО И РЕТИКУЛЯРНОГО КАЛЬЦИЯ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ СЕНСОРОВ

Соколов В.В., Рогачевская О.А.

ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биофизики клетки РАН, Пущино
vlad.sokolov.dem.@gmail.com

Ca^{2+} гомеостаз в цитозоле и ретикулуле имеет решающее значение в поддержании нормального функционирования клеток, и его исследование необходимо для понимания механизмов генерации внутриклеточных Ca^{2+} -сигналов и их роли в физиологии и патофизиологии клетки. Наблюдение за динамикой изменения концентрации ионов кальция осуществляется с помощью оптического мониторинга флуоресцентных Ca^{2+} чувствительных зондов. Широко используемые химические флуоресцентные зонды (Fura2, Fluo-4 и т.д.) обладают различной аффинностью к Ca^{2+} , что принципиально позволяет осуществить мониторинг Ca^{2+} не только в цитоплазме, но и в клеточных компартментах, однако загрузка зондов избирательно в ретикулум невозможна, поскольку она всегда сопровождается нахождением молекул зонда во всей клетке.

Качественный шаг в расширении возможностей детекции внутриклеточной локализации Ca^{2+} сигналов был сделан благодаря появлению генетически кодируемых сенсоров - флуоресцентных белков-индикаторов Ca^{2+} , экспрессирующихся в заданном месте клетки, в частности, в эндоплазматическом ретикулуле. Использование в эксперименте клеток с встроенными флуоресцентными Ca^{2+} чувствительными белками с разными параметрами возбуждения и эмиссии и с разной внутриклеточной экспрессией позволит одновременно регистрировать Ca^{2+} сигналы от разных клеточных компартментов.

В представленной работе осуществлен одновременный мониторинг цитоплазматического и ретикулярного кальция в клетках НЕК293 с помощью генетически кодируемых Ca^{2+} -сенсоров GEM-GECO1 и R-CERIALer соответственно. Для активации внутриклеточных сигнальных каскадов, опосредованных поверхностными рецепторами клетки, был использован ацетилхолин; с помощью ингибитора тапсигаргина оценивалась активность Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулула. Было показано, что увеличение флуоресцентного сигнала в цитоплазме клеток в ответ на аппликацию ацетилхолина ассоциировано с уменьшением такового в Ca^{2+} депо, а ингибирование Ca^{2+} -АТФазы вызывало пассивный выход Ca^{2+} из ретикулула в цитоплазму. Таким образом, при наличии правильно сконструированной системы возбуждения и регистрации флуоресцентного сигнала, Ca^{2+} сенсоры GEM-GECO1 и R-CERIALer дают возможность одновременного мониторинга ионов Ca^{2+} как в цитозоле, так и в эндоплазматическом ретикулуле клетки в нормальных физиологических условиях.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-75-10068.

17.17. УКОРОЧЕННАЯ ВЕРСИЯ КАНАЛА TRPV1 ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКОГО УПРАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТЬЮ КЛЕТОК МОЗГА

Солюс Е.М.^{1,2}, Солюс Г.М.², Мальцев Д.И.², Подгорный О.В.^{2,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва
solyuska@gmail.com

Термогенетика - это метод активации клеток путем повышения внутриклеточного кальция за счет его поступления через термоактивируемые каналы семейства TRP. Благодаря этому термогенетика может быть использована для активации не только нервных клеток, но и астроцитов. Среди разнообразных термочувствительных TRP каналов наиболее перспективным каналом для использования на млекопитающих является TRPV1 человека с пороговой температурой активации чуть выше 40°C. Однако его достаточно большие размеры сильно ограничивают применение такого широко распространенного подхода для доставки генетического материала в клетки мозга как аденоассоциированные вирусные вектора. Большинство нейрональных и глиальных промоторов имеют значительную длину. Например, gfa2, который активируется в астроцитах, имеет длину 1900 п.о., и fPV, который активируется в тормозных нейронах, имеет длину 2400 п.о. С учетом длин гена, кодирующего канал, регуляторных последовательностей и инвертированных терминальных повторов размер получающихся конструкций превышает емкость аденоассоциированных вирусов. В этой связи, целью работы было создать укороченные версии TRPV1 человека и проверить сохранность термочувствительности. Укорачивание TRPV1 проводилось в соответствии со следующей логикой: с N-конца белок TRPV1 имеет 110 аминокислот с неизвестной функцией, а затем шесть анкириновых повторов, имеющих вид петель. Было создано 4 конструкции с укороченным с N-конца каналом: без первых 109 аминокислот (с сохранением старт-кодона), а также без 109 аминокислот и одного, двух и трех первых анкиринов. Исследование функциональности укороченных версий канала в клетках НЕК 293 показало, что версия без первых 109 аминокислот реагирует на нагрев так же хорошо, как интактный канал. Остальные три варианта укороченного канала не отвечают на нагрев, что может объясняться нарушением сборки белка или его субъединиц. Хотя на данном этапе нам не удалось получить существенного выигрыша в длине последовательности TRPV1 человека, полученная укороченная версия канала может быть использована для его экспрессии в астроцитах под промотором gfa2 после доставки с использованием аденоассоциированных вирусных векторов.

7.18. ПОДВИЖНОСТЬ И КЛЕТОЧНОЕ ДЫХАНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЛОДОВОЙ МУШКИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРУЕМОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ

Суконкина А.А., Усик М.А.

ГНЦ РФ - Институт медико-биологических проблем РАН, Москва
aa.sukonkina@gmail.com

Целью данной работы было определение влияния моделируемой микрогравитации в течение 1, 3 и 6 часов на подвижность сперматозоидов плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Определяли скорость движения хвостов сперматозоидов путем видеорегистрации и анализа полученных видеофайлов, содержание белков методом вестрен-блоттинга, клеточное дыхание методом полярографии.

Линейная скорость движения конца хвоста сперматозоидов плодовой мушки *Drosophila melanogaster* увеличивалась на фоне снижения его частоты биения через 6 часов экспозиции в условиях моделируемой микрогравитации (скорость движения увеличивалась на 34% ($p < 0.05$), а частота снижалась на 33% ($p < 0.05$)).

Относительное содержание альфа-тубулина, бета-тубулина, субъединицы 4 комплекса Tcrp1, формирующих аксоному хвоста сперматозоида, не менялось относительно контрольного уровня.

Аналогично не отмечалось изменений в содержании белков, участвующих в генерации АТФ. Не было изменений относительного содержания цитохрома с, цитохром с оксидазы, каталитической субъединицы F1 АТФсинтазы, а также глицеральдегидфосфатдегидрогеназы вплоть до 6 часов экспозиции. Кроме того, изменения скорости клеточного дыхания, в том числе, при использовании ингибиторного анализа, мы не наблюдали.

Таким образом, при моделировании микрогравитации увеличивается подвижность хвостов сперматозоидов плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, при этом отсутствие изменений белкового паттерна и клеточного дыхания позволяют предположить, что изменение скорости может быть связано с регуляцией фосфорилирования моторных белков, что требуют дальнейшего изучения.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ - ИМБП РАН.

7.19. ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРУЕМОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ И ГИПЕРГРАВИТАЦИИ

Усик М.А.^{1,2}

¹ГНЦ РФ - Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

²Первый Московский государственный медицинский университет имени

И.М. Сеченова, Москва

usik.maria@mail.ru

Целью данной работы являлась оценка подвижности, структуры цитоскелета и экспрессии генов, кодирующих цитоскелетные белки сперматозоидов мышей в условиях моделируемой гипер- и микрогравитации. В течение 1, 3 и 6 часов сперматозоиды, выделенные из каудального эпидидимиса, подвергали моделируемой микрогравитации (группа 0g) с помощью машины случайного позиционирования и гипергравитации с использованием центрифуги (группа 2g), результаты сравнивали со статическим (CS) и динамическим контролем (CD).

Снижение скорости в условиях 2g наблюдается уже через 1 час, а через 3 часа начинает снижаться и число подвижных клеток. При этом в условиях моделируемой микрогравитации скорость движения относительно соответствующих по времени культивирования контролей не меняется, но число подвижных сперматозоидов достоверно снижается через 6 часов.

Через 1 час пребывания в гипергравитационных условиях снижается относительное содержание бета-тубулина, являющегося одной из субъединиц тубулинового гетеродимера микротрубочек, а через 3 часа начинает снижаться и содержание второй субъединицы - альфа-тубулина. Следует отметить, что снижение содержания цитоскелетных белков, по-видимому, происходит в результате их протеолиза, поскольку содержание соответствующих мРНК снижается позже по сравнению с содержанием белка. Содержание бета-тубулина также падает в условиях микрогравитации, но только через 6 часов - в то же время, когда отмечается снижение числа подвижных сперматозоидов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при кратких изменениях внешнего механического напряжения происходит снижение двигательной активности сперматозоидов мышей и, по-видимому, эти изменения подвижности ассоциированы с изменением структуры цитоскелета и снижением содержания тубулина.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ - ИМБП РАН.

7.20. ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТЕОМА ВЕЗИКУЛ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ ГЛИОБЛАСТОМЫ В ПРОЦЕССЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ТРАНСФОРМАЦИЙ

Чумакова Е.А.^{1,2}, Зиганшин Р.Х.², Шахпаронов М.И.², Павлюков М.С.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
alena.chumakova@student.msu.ru

Одна из причин крайней агрессивности глиобластомы (GBM) - высокая степень внутриопухолевой гетерогенности. Важную роль в возникновении многообразия популяций этих раковых клеток играет альтернативный сплайсинг пре-мРНК. Необходимо отметить, что изменения сплайсинга индуцируются не только эндогенными сплайсосомными белками, но и сплайсинговыми факторами, попадающими в клетки с помощью внеклеточных мембранных везикул.

Данная работа посвящена изучению взаимосвязи между белковым составом внеклеточных везикул (EVs) и фенотипом секретирующих их клеток GBM. Нами были получены первичные культуры нейросфер глиобластомы от 15 различных пациентов. Эти клетки были всесторонне охарактеризованы и использованы для продукции и выделения EVs при нормальных условиях, а также после действия химиотерапии (цисплатина). С помощью дифференциального центрифугирования и последующего LC-MS/MS анализа было идентифицировано 5630 белков, заключённых внутри везикул. Далее, мы провели биоинформатический анализ данных LC-MS/MS. Для этого образцы разбивали на фенотипические группы и определяли белки, содержание которых статистически значимо отличается между группами. Нами впервые было показано, что наибольшая разница между везикулами до и после терапии наблюдается для белков регуляторов сплайсинга. Следующим шагом, мы исследовали возможность определения характеристик опухолевых клеток по белковому составу везикул, продуцируемых этими клетками. Наш анализ продемонстрировал, что протеом везикул, секретируемых после действия терапии, позволяет отличить друг от друга чувствительные и резистентные популяции клеток глиобластомы. Этот результат в дальнейшем может быть использован для мониторинга эффективности действия препаратов, использующихся при лечении пациентов с глиобластомой.

Таким образом, нами было показано, что после терапии клетки глиобластомы секретируют везикулы, обогащенные факторами сплайсинга, а также, что по протеому везикул, секретируемых после терапии, можно различить резистентные и чувствительные фенотипы клеток GBM. Дальнейшая работа будет нацелена на изучение биологического эффекта от везикул, секретируемых различными популяциями клеток GBM.

СЕКЦИЯ 8

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

8.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЙТОВ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ФИБРИНОГЕНА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ БАЗЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА

Азарова Д.Ю.^{1,2}, Гаврилина Е.С.³, Юрина Л.В.¹, Васильева А.Д.¹,
Бугрова А.Е.¹, Кононихин А.С.^{2,4}, Николаев Е.Н.⁵, Розенфельд М.А.¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет), Долгопрудный

³Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии - МВА им. К.И. Скрябина, Москва

⁴Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе
РАН, Москва

⁵Сколковский институт науки и технологий, Московская область
azarovadana@mail.ru

Окисление белков, в том числе и белков плазмы крови, в настоящее время является одним из наиболее перспективных научных направлений в медицине и биологии. Благодаря результатам данного исследования, полученным с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС, можно создать новые методы диагностики в клинической и лабораторной практике, основанные на определении сайтов посттрансляционных модификаций, возникающих в белках при окислительном стрессе.

На текущем этапе исследования были разработаны следующие методы, основанные на иммунопреципитации на магнитных частицах (для фибриногена): 1) иммуноферментный анализ на магнитных частицах для определения количества преципитированного белка; 2) трипсинолиз на магнитных частицах с исключением стадии элюирования для дальнейшего анализа с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии. Разработанные методики трипсинолиза позволили 1) упростить процедуры при работе с большим количеством образцов, 2) сократить общее время анализа, 3) избежать появления окислительных модификаций, возникающих в результате длительной подготовки образца, которые препятствуют анализу результатов.

Развитие таких исследований приведет к большему пониманию роли окислительных модификаций белков в нормальных и патологических условиях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-01313 а. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта РНФ № 16-14-00181.

8.2. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ СОРТАЗЫ А

Антипов А.Д.^{1,2}, Мелихова Т.Д.², Макаров Д.А.², Терешин М.Н.^{1,2},
Тузиков А.Б.², Зинченко А.А.²

¹МИРЭА - Российский технологический университет, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
sanek.antipov2012@yandex.ru

Химическая и ферментативная модификация пептидов и белков является важным инструментом для поиска и создания инновационных биофармацевтических препаратов, получения соединений для биотехнологии и научных исследований, которые невозможно создать с помощью генно-инженерных подходов. Особый интерес представляют ферментативные методы лигирования белков, которые позволяют при получении новых модифицированных молекул селективно объединять полностью незащищенные синтетические и рекомбинантные полипептиды. Одним из перспективных ферментов является сортаза А, способная осуществлять широкий спектр модификаций полипептидов и белков *in vitro* и в живых клетках, и обладающая огромным потенциалом в области белковой инженерии. Фермент может быть использован для белок-белковой конъюгации, циклизации пептидов и белков, получения конъюгатов полипептидов с полисахаридами, липидами и нуклеотидами, для ковалентной иммобилизации белков на различных поверхностях, присоединения меток различной природы к клеточной поверхности, липосомам и т.д. Сортаза А является цистеиновой кальций-зависимой протеазой с транспептидазной активностью и высокоспецифическим сайтом узнавания -LPXT↓G- (где Х-любая аминокислота). Расщепляя пептидную связь между остатками треонина и глицина, сортаза А образует устойчивый ацилфермент с карбонильной группой треонина, который с высокой эффективностью взаимодействует со специфичными нуклеофилами, образуя продукты транспептидации.

В настоящей работе с использованием методов аффинной хроматографии была выделена и охарактеризована описанная ранее рекомбинантная кальций-независимая сортаза А, имеющая в своем составе 7 аминокислотных замен в области субстрат-связывающего сайта нативной сортазы А из *Staphylococcus aureus*. Транспептидазные свойства фермента были подтверждены с помощью рекомбинантных белков, имеющих в С-концевом участке молекулы "сортирующий" мотив (LPETG), в присутствии белков или различных синтетических соединений, модифицированных N-концевыми остатками глицина или другими специфичными для фермента аминокислотными группами. Ход реакций контролировали при помощи ДДС-электрофореза в полиакриламидном геле. Исследовано влияние молярного соотношения компонентов процесса на течение реакции транспептидации, степень модификации и выход конечных продуктов.

8.3. КОЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ β -КОМПОНЕНТА ЛАНТИБИОТИКА ЛИХЕНИЦИДИНА И МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ЕГО ФЕРМЕНТА LchM2 В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Антошина Д.В., Овчинникова Т.В., Баландин С.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
riruka11@mail.ru

Лантибиотики - бактериальные антимикробные пептиды, являющиеся продуктами рибосомального пути биосинтеза и претерпевающие значительные посттрансляционные модификации под действием специфичных модифицирующих ферментов. Отличительной характеристикой данного класса соединений является наличие внутримолекулярных тиоэфирных связей, которые образуются между аминокислотными остатками Cys и дегидратированными остатками Ser или Thr. Посттрансляционно модифицированные остатки определяют антимикробную активность пептида и придают его молекуле устойчивость к протеолизу и термической инактивации. Большинство лантибиотиков малотоксичны для человека и животных, многие из них проявляют высокую антимикробную активность в отношении клинически значимых грамположительных и некоторых грамотрицательных патогенных бактерий, включая антибиотикорезистентные штаммы. Интерес к изучению лантибиотиков связан с возможностью их применения в качестве новых антимикробных агентов в медицине и ветеринарии, а также консервантов в пищевой промышленности. Лихеницидин, продуцируемый бактерией *Bacillus licheniformis*, относится к небольшой группе двухкомпонентных лантибиотиков, синтезируемых в виде двух пептидов (α и β), проявляющих максимальную активность в эквимоллярном соотношении.

В ходе работы получена экспрессирующая система, позволяющая путем коэкспрессии генов β -лихеницидина и модифицирующего его фермента LchM2 синтезировать полностью зрелый (12 дегидратированных остатков, 4 тиоэфирные связи) рекомбинантный β -лихеницидин в клетках *E. coli* BL21(DE3) под контролем T7 промотора. Идентичность структур полученного рекомбинантного пептида и его природного аналога, а также полнота осуществления посттрансляционных модификаций подтверждены методами тандемной масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Антимикробная активность рекомбинантного пептида соответствует активности природного β -лихеницидина. Разработанная система экспрессии позволяет получать мутантные аналоги лихеницидина и расширяет представления о механизме биосинтеза лантибиотиков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00369.

8.4. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ МЕДНО-ЦИНКОВОГО КОНЦЕНТРАТА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ МЫШЬЯКА

Артыкова А.В.^{1,2}, Меламуд В.С.¹, Булаев А.Г.¹

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии
РАН, Москва

²МИРЭА - Российский технологический университет, Москва
alena.artikov@gmail.com

Разработка новых технологических подходов для переработки сульфидных концентратов цветных металлов, содержащих мышьяк, является актуальной задачей, поскольку их зачастую невозможно подвергнуть переработке с помощью пирометаллургических технологий (обжига) из-за токсичности образующихся газообразных оксидов мышьяка. В наших предыдущих работах было показано, что теннантит - сульфидный минерал меди, содержащий мышьяк, - устойчив к биовыщелачиванию. Поэтому для переработки концентратов, содержащих теннантит, должны быть предложены комбинированные подходы, которые позволят повысить эффективность извлечения меди. Выщелачивание в щелочной среде в присутствии сульфид-иона позволяет разрушить теннантит и перевести мышьяк в раствор, при этом в твердой фазе образуется смесь сульфидов CuS и Cu_2S . Целью данной работы была оценка возможности повышения эффективности биовыщелачивания медно-цинкового концентрата с высоким содержанием мышьяка с помощью предварительного сульфидного выщелачивания. Концентрат содержал 5.82% Cu, 7.95% Zn и 1.7% As. Основными минералами, входящими в состав концентрата, были халькопирит, теннантит, сфалерит и пирит. Для деструкции теннантита проводили сульфидное выщелачивание концентрата раствором, содержащим 4М NaOH и 1,5М Na_2S в лабораторном реакторе при плотности пульпы Т : Ж 1 : 5, 90°C в течение 6 ч. Полученный кек, который содержал 6.05% Cu, 7.97% Zn и 0.19% As, также подвергали биовыщелачиванию. Биовыщелачивание проводили в проточном режиме в лабораторных реакторах при температуре от 40°C, плотность пульпы (Т:Ж) составляла 1:10. Выщелачивание в течение 10 сут. позволило извлечь в раствор около 26% меди и 71% цинка из концентрата и 56% меди и 49% цинка из кека. Таким образом, было показано, что щелочное выщелачивание может использоваться как способ предобработки мышьяк-содержащих медных концентратов перед последующим биовыщелачиванием, так как повышает эффективность биовыщелачивания меди.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-24103 МК.

8.5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В БЕЛКЕ DARP_{in} 9_29 НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЕГО СВЯЗЫВАНИЯ С ЦЕЛЕВЫМ РЕЦЕПТОРОМ HER2/neu

Безвинова Е.А., Тишкин Г.В., Фролова А.Ю., Мартынов В.И., Пахомов А.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
lerriuqs@mail.ru

Многочисленные исследования показывают, что повышение экспрессии гена *ErbB2* человеческого рецептора эпидермального фактора роста, типа 2 (HER2/neu), наблюдается в случае целого ряда онкологических заболеваний. Взаимосвязь между гиперэкспрессией HER2/neu и плохим клиническим прогнозом дает основание рассматривать HER2/neu, как важное звено патогенеза развития раковых образований, а также как новую и важную мишень противораковой терапии.

В настоящее время получен целый ряд лигандов к HER2/neu на основе антител, а также искусственных белков на основе анкириновых повторов (Designed Ankyrin Repeat Proteins, DARPins). Последние в настоящее время активно рассматриваются в качестве альтернативных препаратов для таргетной терапии. Существует целый репертуар различных DARP_{in}'ов, имеющих высокую эффективность связывания с различными онкомаркерами. DARP_{in}'ы могут ингибировать сигнальные пути, подавляя пролиферацию клеток, или служить модулями нацеливания для доставки различных агентов: радионуклидов, наночастиц или липосом, фотосенсибилизаторов, белковых токсинов, онколитических вирусов и лимфоцитов с химерным антигенным рецептором.

Адресный флуоресцентный гибридный белок DARP_{in} 9_29-mCherry обладает высокой специфичностью к HER2/neu ($K_d = 4,5$ нМ [1]), что позволяет использовать его для детекции, а также нацеливания на HER2/neu-положительные раковые новообразования. В настоящей работе методом сайт-направленного мутагенеза был получен ряд мутантных вариантов белка с заменами в участках взаимодействия с целевым рецептором. Было изучено влияние аминокислотных остатков в положениях 16, 19, 45, 46, 48 [2] на связывание, и были получены варианты DARP_{in} 9_29-mCherry с разной константой диссоциации для дальнейших исследований и получения препаратов для терапии опухолей, гиперэкспрессирующих HER2/neu.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 18-29-09166.

Литература:

1. Миронова К.Е., Черных О.Н., Рябова А.В., Стрёмовский О.А., Прошкина Г.М., Деев С.М. // Биохимия, 2014, Т. 79, № 12, С. 1698-1704.
2. Jost C., Schilling J., Tamaskovic R., Schwill M., Honegger A., Plückthun A. // Structure, 2013, V. 21, N. 11, P. 1979-1991.

8.6. ИЗУЧЕНИЕ *IN VIVO* ТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ГЕРМАНИЯ

Беляев Я.Б.^{1,2}, Зеленукин И.В.^{1,2}, Деев С.М.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва
iar.belyaev@gmail.com

Создание наноматериалов с низкой токсичностью и способных разлагаться и выводиться из организма спустя небольшое время после выполнения их функции является актуальным направлением в биомедицине. К таким наночастицам могут относиться агенты на основе германия (Ge). Для металла и молекулярных форм Ge известна его низкая резкая и долговременная токсичность [1]. В данной работе была изучена токсичность наноразмерных частиц германия.

Частицы были получены методом фемтосекундной лазерной абляции. Данный метод позволяет получать частицы чистого кристаллического вещества без использования токсичных реагентов, которые могут сорбироваться на поверхность наночастиц в процессе синтеза.

Динамическое светорассеяние показало, что частицы имели размер 100 ± 25 нм. Потенциал кинетического слоя частиц составлял -40 ± 5 мВ. Нами было показано, что предварительная инкубация частиц в сыворотке крови повышает коллоидную стабильность наноагентов в солевых буферах.

Токсичность наночастиц для клеток определялась на эритроцитах с помощью гемолитических и гемагглютинационных тестов. Токсичность *in vivo* изучалась с помощью гистологии, биохимических тестов крови и измерения динамики массы животных.

В целом, частицы германия, полученные методом лазерной абляции, показали низкую токсичность в течение месяца после их введения в дозах до 50 мг/кг, что позволяет использовать их для различных биомедицинских применений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ №19-72-30012.

Литература:

1. Tao S. H., Bolger P. M. Hazard assessment of germanium supplements // Regulatory toxicology and pharmacology. 1997. Т. 25. №. 3. С. 211-219.

8.7. ПРИМЕНЕНИЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО CD19/CD3 АНТИТЕЛА ДЛЯ КОНТРОЛЯ АКТИВНОСТИ Т-КЛЕТОК, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ХИМЕРНЫМ АНТИГЕННЫМ РЕЦЕПТОРОМ CD3e-CAR

Волков Д.В.¹, Калинин Р.С.¹, Степанов А.В.¹, Масчан М.А.², Габитов А.Г.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва
ya.wolf.otl@yandex.ru

Т-клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами (CAR), как средство бурно развивающейся адоптивной иммунотерапии, превратились в один из главных объектов исследования в данной области. Эта разработка совершила значительный скачок от оптимизации структуры химерных антигенных рецепторов (CAR) и доклинических экспериментов с модифицированными клетками до успешного клинического применения - были зарегистрированы препараты Kymriah (Novartis) и Yescarta (Kite Pharma). Изначально развитие CART было сосредоточено на увеличении их активации, экспансии и цитотоксичности. Однако, наряду с впечатляющими результатами был выявлен широкий спектр побочных эффектов: синдром выброса цитокинов, нейротоксичность, и синдром лизиса опухоли. Увеличение специфичности и управляемости CAR, разработка методов контроля экспансии и цитотоксичности CART после введения пациенту - крайне актуальные задачи. Биспецифический адаптер, который одним доменом связывает антиген на поверхности опухолевых клеток, а другим - распознается CAR на Т-клетке, позволит регулировать активность CART в зависимости от своей концентрации, а также перенаправлять такие лимфоциты на другой или несколько антигенов.

Наше исследование основывается на зарегистрированном препарате Blincyto (Amgen). Его действующее вещество - биспецифическая молекула с двумя одноцепочечными вариабельными фрагментами антител к CD19 и CD3ε эпсилон (CD3ε, часть комплекса Т-клеточного рецептора). Благодаря связыванию с CD19 на опухолевых клетках и привлечению Т-клеток за счет их CD3ε, Blincyto способствует формированию иммунологического синапса с последующим лизисом клеток-мишеней. Предполагается, что CD3ε-CAR повысит активацию и специфичность CART, причем взаимодействие между эффектором и мишенью будет подконтрольным концентрации Blincyto. Кроме того, есть потенциал для применения такого CAR при модификации естественных киллеров (NK). NK-клетки обладают потенциальными преимуществами по сравнению с CART. Они проявляют спонтанную цитотоксическую активность и могут вызывать гибель клеток-мишеней независимо от опухолевого антигена, они не провоцируют начало синдрома выброса цитокинов и, как ожидается, исчезнут после истощения их противоопухолевой активности.

8.8. СОЗДАНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО И ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ВЫДЕЛЕНИИ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ COVID-19 AMP

Гончарова Е.А.¹, Долгова А.С.¹, Кассиров И.С.¹, Сбарцалья В.А.¹, Дедков В.Г.^{1,2}

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

²Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый МГМУ имени И.М.

Сеченова, Москва

katerina.burmina@gmail.com

Пандемия COVID-19, вызываемая вирусом SARS-CoV-2, является актуальной проблемой мирового уровня. Для своевременного оказания медицинской помощи и предотвращения дальнейшего распространения вируса необходима точная молекулярно-биологическая диагностика SARS-CoV-2 на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-РВ-ПЦР). Для анализа биологических образцов методом ОТ-РВ-ПЦР необходимо проведение их первичной подготовки в виде экстракции нуклеиновых кислот. В свою очередь, для мониторинга качества экстракции нуклеиновых кислот необходимо создание положительного и внутреннего контролей этапа выделения нуклеиновых кислот.

Целью работы являлось создания контролей выделения нуклеиновых кислот на основе MS2 фага для набора реагентов COVID-19 Amp (НИИ Пастера, Россия) для диагностики SARS-CoV-2.

В качестве положительного (ПКО) и внутреннего (ВКО) контролей выделения были сконструированы частицы на основе MS2 фага, содержащие таргетный участок РНК SARS-CoV-2 (в ПКО) и искусственный участок РНК (в ВКО). Для создания ПКО и ВКО использовались таргетный и искусственный участки, которые были лигированы в линейаризованный плазмидный вектор, содержащий ген белка оболочки MS2 фага. Далее полученные рекомбинантные плазмиды секвенировали по методу Сенгера для подтверждения их нуклеотидной последовательности и трансформировали в *E. coli* (штамм B21) с последующей индукцией экспрессии белка изопропил-L-тио-D-галактопиранозидом. Затем лизировали клетки и полученную смесь очищали центрифугированием в градиенте CsCl. Концентрации ПКО и ВКО измеряли с помощью системы droplet-digital ПЦР QX100 (Bio-Rad) с использованием набора One-step ddPCR Supermix for Probes (BioRad) и праймеров и зондов набора COVID-19 Amp в соответствии с инструкциями производителей.

По результатам работы были разработаны положительный (ПКО) и внутренний (ВКО) контроли выделения, позволяющие эффективно отслеживать качество биологических образцов, которые анализируются методом ОТ-РВ-ПЦР при помощи набора реагентов COVID-19 Amp.

8.9. ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ *IN VITRO* КЛОНОВ ТОПОЛЯ К ВОЗДЕЙСТВИЮ СОЛЕВОГО СТРЕССА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ И СЕРЕБРА

Гродецкая Т.А., Федорова О.А., Евлаков П.М.

Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, Воронеж
tatyana.pokusina@yandex.ru

Одним из возможных путей борьбы с обеслесением, а также интенсификации производства древесины является плантационное разведение с использованием селекционно-улучшенных быстрорастущих древесных пород, таких как тополь. Усовершенствование технологии *in vitro* культивирования растений, в том числе, с использованием наноматериалов, в перспективе позволит ускорить получение качественного посадочного материала ценных генотипов древесных культур для плантационного лесовыращивания.

Целью работы являлось изучение влияния наночастиц оксида меди (CuO) и серебра (Ag) на экспрессию генов стрессоустойчивости *ASR3* (ABA-stress-ripening), *ICDH* (isocitrate dehydrogenase), *PR-1* (pathogenesis-related), *PR-10*, *DREB2* (dehydration-responsive element binding) у *in vitro* клонов тополя черного (*Populus nigra*) сорта 'Пирамидально-осокоревый Камышинский' ('ПОК') в условиях воздействия солевого стресса.

Полученные результаты выявили значительное увеличение относительного уровня транскриптов генов *PR-10*, *ASR3*, *ICDH* и *DREB2* при воздействии 3% NaCl у контрольной группы микроклонов (на среде без наночастиц), что свидетельствует о развитии у них механизмов адаптации к воздействию солевого стресса. Однако активации исследуемых генов при влиянии засоления у микроклонов тополя, культивируемых на средах с наночастицами CuO и Ag установлено не было, кроме гена *PR-1*, показавшего значительное увеличение экспрессии у микроклонов на среде с наночастицами Ag. Нами также было выявлено снижение количества укорененных эксплантов тополя при использовании наночастиц в среде культивирования, что может свидетельствовать об их ингибирующем действии на микроклоны и обуславливает снижение экспрессии стрессовых генов в ответ на воздействие солевого стресса. В то же время, введение наночастиц в среду культивирования увеличивало интенсивность корнеобразования у эксплантов тополя. Сниженная по сравнению с контрольной группой экспрессия генов устойчивости у микроклонов на среде с наночастицами может быть обусловлена накопительным характером адаптации к неблагоприятным абиотическим факторам среды и фитопатогенам.

8.10. МЕТАЛЛ-ОРГАНИЧЕСКИЕ КАРКАСНЫЕ СТРУКТУРЫ ТИПА MIL-101 (Fe) ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ПРЕПАРАТОВ В ЛЕГКИЕ

Грязнова О.Ю.^{1,2}, Зеленукин И.В.^{1,2}, Деев С.М.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва
olgayugryaznova@yandex.ru

Одним из вызовов современной медицины является лечение и диагностика рака легкого, т.к. он является наиболее часто встречающимся раковым образованием, а также находится на первом месте среди онкозаболеваний по количеству смертей в год. Используемые в химиотерапии лекарственные вещества воздействуют не только на раковые клетки, но и на здоровые ткани, в связи с чем встает вопрос о создании и применении средств адресной доставки препаратов в легкие. Одним из претендентов на эту роль являются наночастицы (НЧ) металл-органических каркасных структур типа MIL-101 (Fe) из-за их высокой сорбционной ёмкости, а также биосовместимости, биodeградируемости и низкой токсичности [1].

В данной работе НЧ MIL-101 (Fe) были получены сольвотермальным методом. Было показано, что данные частицы разрушаются в изотоническом натрий-фосфатном буфере pH 7,4, а также была изучена кинетика деградации НЧ с помощью оптоакустического метода. Также была исследована сорбционная ёмкость НЧ для молекул различной природы.

In vivo эксперименты по биораспределению НЧ MIL-101 (Fe) показали, что частицы накапливаются в легких. Также было показано, что НЧ MIL-101 (Fe), нагруженные доксорубицином, можно использовать для терапии метастаз в легких. На модели меланомы было показано, что такое лечение уменьшает количество опухолевых узлов, а также размер онокообразований по сравнению с лечением доксорубицином.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 19-72-30012.

Литература:

1. Horcajada, P., Chalati, T., Serre, C. et al. Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nature Mater* 9, 172-178 (2010).

8.11. ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ НА БИООКИСЛЕНИЕ СУЛЬФИДНОГО КОНЦЕНТРАТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Ёлкина Ю.А.^{1,2}, Булаев А.Г.¹

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
yollkina@mail.ru

Биогидрометаллургические технологии, основанные на окислении сульфидных минералов железом и сероокисляющими ацидофильными микроорганизмами, используются для извлечения благородных металлов из сульфидных концентратов. Данные ацидофильные микроорганизмы могут быть авто-, гетеро- и миксотрофами, поэтому актуальным является изучение влияния на биоокисление сульфидных минералов различных источников углерода. Целью данной работы было изучение влияния органических субстратов (дрожжевой экстракт (ДЭ) и меласса) на процесс биоокисления пирит-арсенопиритного сульфидного концентрата. Для эксперимента использовали ацидофильные штаммы *Acidithiobacillus caldus* MBC-1, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* SH-1 и *Acidiplasma* sp. MBA-1. Объектом исследования был сульфидный концентрат, содержащий 48% пирита и 9% арсенопирита. Биоокисление проводили в колбах со 100 мл минеральной питательной среды и 2 г концентрата на роторном шейкере в течение 30 суток при температурах от 40 до 55°C. В вариантах с внесением органического вещества в среду добавляли 0.02% ДЭ или мелассы. В контрольных вариантах среда не содержала органических субстратов (автотрофные условия). Органические субстраты повлияли на биоокисление при 55°C. В автотрофных условиях pH был значительно выше, а Eh и концентрации Fe³⁺ и As в среде были значительно ниже, чем при температурах 40-50°C. В опытах с органическими субстратами повышение температуры до 55°C в меньшей степени сказывалось на активности биовыщелачивания. Это объясняется тем, что автотрофный штамм *A. caldus* MBC-1 не активен при 55°C и не мог обеспечить миксо- и гетеротрофные штаммы *S. thermosulfidooxidans* SH-1 и *Acidiplasma* sp. MBA-1, окисляющие железо, органическим источником углерода. В автотрофных условиях активность биоокисления при 40-50°C, при которых *A. caldus* MBC-1 активен, была почти такой же высокой, как и в вариантах с присутствием органических субстратов, а при 55°C активность биоокисления сильно зависела от внесения органических веществ. Таким образом, результаты данной работы показывают, что добавление органических питательных веществ может быть перспективным подходом для увеличения скорости биоокисления сульфидных минералов и стабилизации активности микробной популяции при высоких температурах, при которых автотрофные микроорганизмы не могут обеспечивать миксо- и гетеротрофов органическими субстратами.

8.12. КЛЕТОЧНАЯ БЛОКИРОВКА СИСТЕМЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ

Зелепукин И.В.^{1,2,3}, Никитин М.П.^{1,2}, Деев С.М.^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

³Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва
zelepukin@phystech.edu

Наночастицы в организме быстро распознаются макрофагами и выводятся из кровотока, при этом лишь малая доля наноагентов достигает терапевтической мишени, а большая часть аккумулируется в печени и селезенке. Эта проблема компрометирует использование любых наночастиц для терапии и диагностики заболеваний.

В данной работе мы предложили метод клеточной блокады макрофагов организма для продления времени циркуляции наночастиц в кровотоке и их терапевтической эффективности. Мы показали, что введение небольшой дозы (12-25 мкг) аллогенных антител против эритроцитов (клон 34-3C, IgG2b) приводило к падению гематокрита у мышей на 5%, но при этом повышало время циркуляции различных частиц более чем на порядок [1]. На модели изолированных интерперитонеальных макрофагов, мы определили, что повышенное поглощение красных кровяных телец фагоцитами коррелировало со снижением их активности к эндоцитозу. *In vivo* исследования показали, что супрессия опсопинов, в том числе белков комплемента, также частично объясняет наблюдаемый эффект.

Токсичность метода была определена с помощью гистологических исследований, анализа профиля воспалительных цитокинов, уровня гематокрита, показателей гемотоксичности и биохимических анализов крови. Введение антител вызывало фагоцитоз эритроцитов, но их значение полностью восстанавливалось в крови через 5 дней. Кроме того, мы наблюдали повышенную активность MCP-1 белка, ответственного за хемотаксис моноцитов.

Эффективность метода была продемонстрирована с помощью ряда применений наноагентов. Во-первых, мы показали, что при клеточной блокаде макрофагов возможно осуществление активного нацеливания частиц на CD4+ клетки в кровотоке животных, с той же эффективностью, как и в *in vitro* экспериментах. Затем мы показали, что метод может быть использован для МРТ-контрастирования опухолей повышением доставки магнитных наночастиц. Метод показал высокую универсальность, увеличение доставки наблюдалось для опухолей любой природы, как аллографтов, так и ксенографтов. Кроме того, мы показали, что с использованием клеточной блокады наблюдается повышенный отклик на терапию с использованием липосомальных форм доксорубина.

Таким образом, клеточная блокада макрофагов является универсальным инструментом, способным вывести многие эффективные *in vitro* наночастицы на уровень организма для терапии и диагностики заболеваний.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 19-72-30012.

Литература:

1. Nikitin, M. P., Zelepukin, I. V., Shipunova, V. O., et al. Enhancement of the blood-circulation time and performance of nanomedicines via the forced clearance of erythrocytes. *Nature Biomedical Engineering*, 4(7), 717-731 (2020).

8.13. СЕЛЕКЦИЯ АУТОРЕАКТИВНЫХ В-КЛЕТОК ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ

Ишина И.А., Ломакин Я.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
iraishina94@gmail.com

Определение пептидных лигандов, способных селективно связываться с В-клеточными рецепторами, является важной задачей для выяснения этиологии различных аутоиммунных патологий, таких как рассеянный склероз (РС). В-клетки играют немаловажную роль при развитии РС, что подтверждается успешным применением анти-CD20 антител при лечении заболевания. Разработка эффективной платформы для определения и отбора антиген-специфичных В-клеток поможет не только охарактеризовать В-клеточный репертуар антител, участвующих в развитии заболевания, но и послужит инструментом для создания терапевтических препаратов нового поколения. Метод фагового дисплея в сочетании с проточной цитофлуориметрией позволяет одновременно тестировать десятки и сотни тысяч пептидных лигандов, отбирая популяции антиген-специфичных В-клеток. Ранее нами была показана возможность отбора до 97% антиген-специфичных В-клеток, с использованием системы биоконъюгатов бактериофагов, полученных на основе фagemидного вектора и метода проточной цитофлуориметрии. Данная система была значительно улучшена благодаря созданию конструкций бактериофагов на основе фагового вектора fADL-1e, не требующего гиперфага-помощника для экспрессии, что повысило специфичность, снизило стоимость и упростило экспериментальный процесс. Использование системы на основе фагового вектора fADL-1e показало большую эффективность отбора антиген-специфичных В-клеток, по сравнению с фagemидным вектором. Бактериофаги, полученные при помощи фагового вектора fADL-1e позволили отобрать до 98,5% В-клеток, с уровнем ложноположительного сигнала 0,2%. Дальнейшая проверка системы подтвердила возможность отбора антиген-специфичных В-клеток при избыточном добавлении нерелевантных бактериофагов. Полученные результаты показывают возможность применения системы на основе фагового вектора fADL-1e для поиска и отбора пептидных лигандов антиген-специфичных В-клеток, участвующих в развитии РС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ), грант №18-74-10079.

8.14. КОНТРОЛИРУЕМЫЕ Т-КЛЕТКИ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ХИМЕРНЫМИ АНТИГЕННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ, НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА БАРНАЗА-БАРСТАР ДЛЯ АДОПТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА

Калинин Р.С.¹, Черников И.В.², Зенкова М.А.², Шипунова В.О.¹, Шульга А.А.¹, Деев С.М.¹, Степанов А.В.¹, Габитов А.Г.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Roman.Kalinin.93@yandex.ru

В борьбе с опухолевыми заболеваниями наиболее перспективным направлением персонализированной медицины является иммунная клеточная терапия с применением Т-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR-T). CAR-T терапия позволила добиться впечатляющих результатов в борьбе с гематологическими онкологическими заболеваниями. Однако широкое применение CAR-T терапии затруднено из-за осложнений, ассоциированных с неконтролируемой гиперактивацией и неспецифической цитотоксичностью. В результате чего возникает риск развития опасных для жизни побочных эффектов, таких как "цитокиновый шторм" и синдром лизиса опухоли. Поэтому сохранение возможности контролировать терапевтические клетки в режиме реального времени является крайне актуальной задачей.

Для создания контролируемых CAR-T нами была изменена основная парадигма адоптивной клеточной терапии, которая подразумевает непосредственный контакт опухолевой клетки и CAR-T клетки. Новизна технологии заключается в применении третьего компонента, который является промежуточным звеном между раковыми и терапевтическими клетками. Модульность такого подхода также позволит расширить диапазон антигенов при использовании одних и тех же CAR-T клеток. Нами выбрана молекула-посредник в состав которой входит дарпин-миметик антитела, распознающий раковый антиген HER2 нео, и слитую с ним барназу (бактериальная РНКазы), которая специфически связывается со своим природным ингибитором - барстаром, он в свою очередь входит в распознающий домен CAR. Мы показали работу нашего подхода на репортерной клеточной системе на основе линии Jurkat с NFAT промотором, под которым стоит ген люциферазы, а также на настоящих CAR-T показали дозозависимую цитотоксичность. Стоит заметить, что без молекулы-посредника CAR-T анергичны, что в дальнейшем позволит сделать безопасную и контролируемую CAR-T терапию. Далее планируется провести эксперименты *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 17-74-30019).

8.15. РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЕКТИНОВ В ОБРАЗОВАНИИ БИОПЛЕНОК

Клементьев С.В., Кобелев А.В., Сироткин А.С.

Казанский национальный технологический университет, Казань

slava_klementev3715@mail.ru

В процессах биологической очистки сточных вод микробиоценоз очистных сооружений может быть представлен взвешенной биомассой - активным илом или прикрепленной биомассой в виде биопленки. В составе биопленки формируется сообщество микроорганизмов, закреплённых на различных абиотических и биотических поверхностях. Лектины играют важную роль в образовании биопленок. Так, лектины - это белки, которые способны связывать углеводные остатки на поверхности клеток, не изменяя их ковалентной структуры, тем самым, вызывая агглютинацию клеток [1].

Цель работы заключалась в оценке влияния лектинов на образование микробных биопленок. Объекты исследования являлись бактериальные культуры *Acinetobacter* sp., *Bacillus subtilis*. В качестве питательной среды использовали мясо-пептонный бульон (МПБ).

Экспериментальные исследования проводились в пробирках Эппендорфа объемом 1,5 мл согласно следующей схеме:

- 1) Контроль: 1мл МПБ + 100 мкл суспензии *Acinetobacter* sp.;
- 2) Опыт с нативным раствором *Bacillus subtilis*: 1мл МПБ + 100 мкл суспензии *Acinetobacter* sp. + 100 мкл нативного раствора *Bacillus subtilis*.
- 3) Опыт с *Bacillus subtilis*: 1мл МПБ + 50 мкл суспензии *Acinetobacter* sp. + 64,8 мкл суспензии *Bacillus subtilis*.

Образцы термостатировали при 37°C в течение 48 часов. После культивирования суспензию сливали, образцы обрабатывали согласно стандартной методике оценки способности к образованию биопленки [2]. Согласно полученным результатам при добавлении нативного раствора *B. subtilis* в среду культивирования *Acinetobacter* sp. наблюдается процесс увеличения количества биопленки в среднем на 15% относительно контроля. Одновременно с этим выявлено, что при добавлении в среду культивирования *Acinetobacter* sp. суспензии клеток *B. subtilis* наблюдается более интенсивное развитие биопленки, в среднем на 60% по сравнению с контролем. Было показано, что взаимодействие клеток различных культур сопровождается биосинтезом большего количества лектинов, что, как следствие, приводит к более активному формированию биопленки.

Литература:

1. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Луцкий А.Д. Лектины. Львов: Вища школа, 1981. С. 156.
2. Рахманкулова З.Ш., Кирилина Т.В., Сироткин А.С. Оценка способности нитрифицирующих микроорганизмов к образованию биопленок // Вестник Казанского технологического университета. 2016. Т. 19. № 16. С. 152-154.

8.16. ПОЛУЧЕНИЕ СВОБОДНОГО ОТ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА SARS-CoV-2 В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ

Колесов Д.Э.¹, Синегубова М.В.¹, Орлова Н.А.¹, Воробьев И.И.^{1,2}

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
52ru111@mail.ru

Нуклеопротеин бетакоронавирусов (нуклеокапсид, NP) является иммунодоминантным и наиболее обильно экспрессируемым в цитоплазме клеток вирусным белком. Он состоит из двух плотно свернутых доменов N1b и N2b, отвечающих за связывание РНК и димеризацию NP, соответственно, а также окружающих их коротких неструктурированных участков N1a, N2a и В/N3. Нуклеопротеин является единственным цитоплазматическим белком коронавируса, целенаправленно захватываемым отделяющимися от зараженных клеток вирусными частицами. Нуклеопротеин пандемического вируса SARS-CoV-2 не содержит существенных для его функций пост-трансляционных модификаций и поэтому может быть получен в бактериальной системе экспрессии в функциональном состоянии и использован для определения уровня антител к вирусу у лиц, предположительно прошедших инфицирование SARS-CoV-2. Заметная часть используемых в настоящий момент в мире тест-систем на антитела к вирусу SARS-CoV-2 содержит в качестве антигена NP или его фрагменты, однако существенно различающийся уровень чувствительности и специфичности определения антител для данных тест-систем заставляет предположить, что антигенные свойства NP могут меняться в зависимости от способа его культивации, выделения и очистки.

Для получения NP SARS-CoV-2 в больших количествах в преимущественно растворимой форме в цитоплазме *E. coli* нами был использован ранее разработанный плазмидный вектор rHYP, содержащий локус пост-сегрегационного контроля Hок-Sок и не содержащий элемента контроля копияности плазмид Rop. Экспрессируемый NP содержал С-концевой декагистиридиновый кластер для очистки целевого белка методом металлохелатной хроматографии. Было установлено, что выделяемый NP остается в комплексе с нуклеиновыми кислотами при концентрации NaCl до 300 мМ и может быть освобожден от этого вида примесей только при промывке адсорбированного на хроматографическом сорбенте белка раствором, содержащим 1,5 М NaCl. Для очищенного таким образом белка на небольшом числе образцов сывороток крови было продемонстрировано специфическое связывание антигена для лиц с подтвержденной по ПЦР инфекцией SARS-CoV-2. Полученный нами NP SARS-CoV-2 также преимущественно находится в гомодимерном состоянии по данным гель-фильтрации в неденатурирующих условиях и может быть использован для проведения иммунотестирования в качестве одного из нескольких антигенов SARS-CoV-2.

8.17. СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА АДРЕСНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ СВЕТОИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРТЕРМИИ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Комедчикова Е.Н.^{1,2}, Шипунова В.О.^{1,3,4}, Прошкина Г.М.¹, Деев С.М.^{1,2,3,4}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

⁴Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва
komedchikova@mail.bio.msu.ru

Адресная терапия является одним из перспективных методов лечения онкологических заболеваний, так как за счёт своего направленного действия на опухолевые клетки позволяет сократить побочные эффекты для здоровых клеток организма, а также сконцентрировать действующий препарат в самой опухоли. Использование наночастиц в качестве модулей для адресной доставки обладает рядом преимуществ, поскольку позволяет инкапсулировать несколько различных веществ в структуру частиц и тем самым совместить несколько эффектов в одном препарате. К многообещающим методам терапии, которые можно реализовать на основе наночастиц, относится светоиндуцированная гипертермия, основанная на нагревании веществ при облучении их светом определённой длины волны.

В данной работе представлены результаты по разработке адресных полимерных наночастиц, распознающих раковые клетки с гиперэкспрессией ERBB-2 рецептора и имеющих способность к фототермическому нагреву при облучении лазером с длиной волны, находящейся в диапазоне окна прозрачности биотканей. Частицы были нагружены двумя флуоресцентными красителями, которые при совместном действии вызывали наибольший нагрев частиц, а также придавали частицам диагностические свойства благодаря флуоресценции. В состав частиц был включён химиотерапевтический препарат иринотекан, который является ингибитором топоизомеразы I. В качестве адресного модуля был выбран трустузумаб - моноклональное антитело, с высокой специфичностью распознающее ERBB-2 рецептор. Была показана избирательная цитотоксичность наночастиц при воздействии на раковые клетки с гиперэкспрессией ERBB-2 рецептора и облучения лазером с длиной волны 805 нм.

Таким образом, были синтезированы адресные полимерные наночастицы с терапевтическими и диагностическими свойствами и обладающие цитотоксичностью в отношении ERBB-2-гиперэкспрессирующих раковых клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-14-00112.

8.18. ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛ-β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА СВЯЗЫВАНИЕ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Копнова Т.Ю., Скуредина А.А., Якупова Л.Р., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва

kopnovataty@gmail.com

Разработка новых антибактериальных препаратов (АБП) и их клинические испытания занимают длительное время и требуют дорогостоящих исследований. Сейчас более актуальной задачей фармакологии является создание и исследование систем доставки для улучшения свойств уже разработанных АБП. Большой интерес в качестве систем доставки представляют β-циклодекстрины (ЦД) - макроциклы, состоящие из семи D-глюкопиранозных остатков. ЦД могут образовывать нековалентные комплексы с различными лекарственными молекулами в том числе и с АБП ципрофлоксацином (ЦФ) [1]. Образование нековалентных комплексов с ЦД приводит к увеличению растворимости и биодоступности ЦФ, что позволяет снизить вероятность проявления побочных эффектов [2]. Комплексообразование также может приводить к изменениям во взаимодействии АБП с белками плазмы крови. Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) - наиболее распространенный белок плазмы крови человека, отвечающий за связывание и перенос различных веществ, в том числе и лекарственных молекул. Изучение влияния ЦД на связывание АБП с ЧСА является актуальной задачей, так как именно связывание с белками считается одной из важнейших физико-химических характеристик лекарственных средств, поскольку влияет на их распределение и терапевтическую эффективность [3].

Данная работа посвящена исследованию влияния метил-β-ЦД (М-β-ЦД) на связывание ЦФ с ЧСА. Методом флуоресцентной спектроскопии показано, что связывание ЦФ с ЧСА приводит к выраженному тушению флуоресценции белка. Образование комплексов ЦФ-М-β-ЦД (ЦМ) снижает эффективность тушения альбумина почти в 3 раза: константы Штерна-Фольмера $K_{ШФ}$ (ЦФ+ЧСА) = $(287 \pm 3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ и $K_{ШФ}$ (ЦМ+ЧСА) = $(99 \pm 2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Такой эффект может быть связан с изменением сайта связывания ЦФ в ЧСА или с блокированием связывания ЦФ в сайте связывания ЧСА за счет включения в комплекс с М-β-ЦД. Методом кругового дихроизма установлено, что при взаимодействии ЧСА с ЦФ изменения во вторичной структуре ЧСА более выражены, чем в случае взаимодействия ЧСА с комплексом, что согласуется с данными, полученными методом флуоресцентной спектроскопии.

Литература:

1. Davis M.E., Brewster M.E. // Nature Reviews Drug Discovery. 2004. Т. 3, № 12. С. 1023-1035.
2. Skuredina A.A. et al. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2020. Т. 75, № 4. С. 218-224.
3. Varshney A. et al. // Cell Biochem. Biophys. 2014. Т. 70, № 1. С. 93-101.

8.19. КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ

Котельникова П.А.¹, Шипунова В.О.^{1,2,3}, Деев С.М.^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

³Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва
kotelnikova@phystech.edu

Применяемые сегодня в клинике методы лечения онкологических заболеваний часто связаны со значительными побочными эффектами и повреждением здоровых тканей, а также с вероятными рецидивами и резистентностью опухолей. На основе наночастиц различной природы и направляющих молекул, в том числе антител и скаффолдовых белков, можно получать специфичные терапевтические агенты с несколькими механизмами противоопухолевой активности.

Резонансное рассеивание и поглощение света наночастицами серебра позволяет использовать их для визуализации и терапии опухолей. При облучении светом такие частицы могут не только нагреваться, но и способствовать генерации в клетке активных форм кислорода, выделять токсичные ионы серебра и усиливать действие традиционных фотосенсибилизаторов. При этом серебряные частицы проявляют собственную цитотоксичность, например, вызывая повреждение митохондрий и ДНК, окислительный стресс или нарушение клеточного цикла. Таким образом, серебряные наночастицы могут убивать раковые клетки разными путями, что может быть полезно в терапии резистентных опухолей.

В данной работе мы предлагаем использовать биолуминесценцию люциферазы для облучения и визуализации наночастиц, что позволит воздействовать на глубинные опухоли, проникновение света к которым ограничено. В качестве направляющего белка мы использовали моноклональное антитело трастузумаб. В ходе работы были получены конструкции, специфично связывающиеся с раковыми клетками, сверхэкспрессирующими онкомаркер HER2/neu. Была показана возможность реализации фотодинамической терапии без внешнего источника света с применением биолуминесценции. Также нами была исследована зависимость цитотоксических свойств серебряных частиц от их размера и покрытия. Полученные результаты могут быть полезны для борьбы с опухолями, устойчивыми к традиционным методам лечения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-34-90029 (культивирование клеток, тесты по исследованию цитотоксичности) и гранта РНФ № 17-74-20146 (синтез наночастиц).

8.20. ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИХ НАНОАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК

Кочарян А.Г.^{1,2}, Яременко А.В.^{1,2}, Никитин М.П.^{1,2}

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
kocharyan.ag@phystech.edu

Наночастицы являются относительно новыми инструментами науки, но за счет своих уникальных свойств они быстро нашли применение в самых разных областях биомедицины [1]. Углеродные квантовые точки (УКТ) являются маленькими наночастицами (размер ~5 нм) с флуоресцентной активностью, высокой фотостабильностью, низкой токсичностью и многими другими преимуществами. Такие наночастицы часто используются в качестве флуоресцентной метки для визуализации клеток и тканей, переносчиков лекарств и многофункциональных тераностических систем [2]. Несмотря на огромное количество разнообразных УКТ, нужны новые типы частиц, в которых совмещаются свойства УКТ и других наночастиц.

Данная работа посвящена созданию наночастиц из УКТ и несущих наночастиц, с целью совмещения всех полезных свойств используемых частиц. В ходе исследования разными методами были синтезированы УКТ, суперпарамагнитные и парамагнитные наночастицы из оксидов и оксигидроксидов железа, управляемые с помощью магнитных полей. Для визуализации оптическими методами синтезированных наночастиц из оксидов и оксигидроксидов железа, на их поверхности сорбировали УКТ. Далее для получения больших флуоресцентных белковых наноагентов, УКТ были инкапсулированы в наночастицы из бычьего сывороточного альбумина.

В будущем полученные наночастицы за счет своих уникальных свойств могут применяться в разных областях биомедицины. Их можно применять в оптической томографии опухолей, а их магнитные свойства помогут при лечении гипертермией. УКТ, в отличие от стандартных флуорофорных меток, имеют более длительное время циркуляции, что позволяет отслеживать движение лекарства в кровотоке. Кроме того, конъюгированные с антителами УКТ могут быть использованы в разделении клеток, иммуноокрашивании и диагностике многих заболеваний, в том числе злокачественных опухолей.

Литература:

1. Prasad G. L. Biomedical applications of nanoparticles //Safety of nanoparticles, Springer, New York, NY, 2009, P. 89-109.
2. Du J. et al. Carbon dots for in vivo bioimaging and theranostics //Small, 2019, V. 15, No. 32, P. 1805087.

8.21. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ СУПЕРПАРАМАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И КОНЦЕНТРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Красавина Д.А., Бобков Д.Е., Шатрова А.Н., Шевцов М.А., Юдинцева Н.М.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
dasha.krasavina2012@yandex.ru

В последние годы активно развиваются наномедицина и нанофармация, разрабатывающие механизмы доставки лекарственных веществ, новые методы лечения на наноразмерном уровне. Особое место среди наноразмерных материалов, применяемых для диагностических и терапевтических целей, занимают суперпарамагнитные наночастицы оксида железа. Оценка их влияния на клетки является особенно важной вследствие наноразмерности действующих агентов, которые непосредственно воздействуют на клеточные структуры. В настоящее время цитотоксичность наночастиц определяют преимущественно с помощью МТТ-теста, позволяющего оценить специфическую гибель клеток. В то же время показатели функционального состояния митохондрий, отражающих адекватность энергопродукции для поддержания нормального метаболизма клеток, и активность генерации активных форм кислорода (АФК), как показатель выраженности патологических процессов в клетке, остаются недостаточно изученными.

Целью данной работы является оценка влияния различных концентраций суперпарамагнитных наночастиц оксида железа на уровни митохондриального потенциала и АФК в клетках линии мезенхимальные стромальные клетки костного мозга эмбриона человека (FetMSCs) в условиях *in vitro*. Клетки, находящиеся в состоянии монослоя, культивировали в течение 24 часов в среде, содержащей наночастицы в различной концентрации (50, 100, 150 и 300 мкг/мл). Митохондриальный потенциал и уровень АФК определяли с использованием флуоресцентных красителей TMRE (Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate) и CM-H2DCFDA (General Oxidative Stress Indicator), соответственно. Интенсивность флуоресценции определяли с использованием проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, USA) и программы Cytexpert (version 2.0).

Было обнаружено, что с ростом концентрации наночастиц происходит снижение митохондриального потенциала. Уровень АФК с ростом концентрации наночастиц снижается в диапазоне концентраций 50 - 150 мкг/мл, но при использовании концентрации 300 мкг/мл резко возрастает. Можно предположить, что наблюдаемое увеличение АФК не связано с активностью митохондрий, а вызвано другими факторами, требующими дальнейшего изучения.

Работа выполняется при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-58-55001.

8.22. МАКРОПОРИСТЫЕ ХИТОЗАНОВЫЕ ГУБКИ С ПАМЯТЬЮ ФОРМЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЗАДАЧ

Крупкин Е.А.¹, Сочилина А.В.², Акасов Р.А.^{2,3}, Вихров А.А.²

¹МИРЭА - Российский технологический университет, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Москва

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

sorb9@yandex.ru

В последние годы наблюдается стремительный прогресс в использовании биосовместимых биodeградируемых материалов на основе полимеров в различных медико-биологических областях. Одним из таких полимеров является полусинтетический полисахарид, хитозан, проявляющий также антибактериальную, гемостатическую и другие активности. Однако большинство изделий из хитозана хрупкие и несжимаемые, что ограничивает их применение. Эластичные губчатые монолитные криогели привлекают большое внимание в качестве носителей для тканевой инженерии, гемостатических, ранозаживляющих материалов в хирургии и т.п.

Нами была разработана новая методика получения монолитных криогелей хитозана. Оригинальность методики заключается в том, что криообработке подвергается не кислый раствор хитозана с последующей обработкой раствором щелочи, а водная дисперсия агрегатов молекул хитозана при pH 9,0 - 9,5. При этом формируется эластичный губчатый материал (без использования дополнительных сшивающих агентов) с взаимосвязанной системой макропор ($d_{\text{пор}}$ от 60 до 500 мкм), которая позволяет воде свободно течь при сжатии, не повреждая его структуру (20 циклов сжатия/расширение). При этом губки характеризуются быстрым расширением после сжатия ($\tau < 5\text{с}$) с эффектом восстановления формы при контакте с водой. Разработанная методика позволяет получать криогели больших размеров в различных формах, что может способствовать расширению области их практического применения, а также сократить время их производства.

Результаты определения жизнеспособности клеток НерG2 с использованием стандартных МТТ-тестов продемонстрировали, что губчатые криогели не оказывают значительного цитотоксического действия. Расширение губок при контакте с суспензией клеток обеспечивает их равномерное распределение по внутреннему объему материала, при этом хитозановый матрикс обеспечивает хорошую адгезию, рост и пролиферацию клеток и при культивировании в течение 7 дней клетки занимают всю внутреннюю поверхность губок. Таким образом высоко эластичные криогели с быстрым восстановлением формы могут найти применение для решения различных медико-биологических задач, например, в качестве инъекционных расширяемых гемостатов, носителей для тканевой инженерии, органоподобной модели для тестирования лекарственных средств и т.п.

8.23. РАЗРАБОТКА ПИЛОТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СУБСТАНЦИИ ТЕРИПАРАТИДА

Крюкова А.В., Степаненко В.Н., Макаров Д.А., Воробьёва Т.В., Соколова И.В., Терешин М.Н., Мягких И.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
anna_krukova.2011@mail.ru

Терипаратид - N-концевой фрагмент (1-34) эндогенного человеческого паратиреоидного гормона, выделяемого околощитовидными железами и являющегося основным регулятором кальциевого и фосфорного метаболизма в костях и почках.

Основным эффектом паратиреоидного гормона является увеличение концентрации кальция и понижение фосфора в сыворотке крови за счет усиления всасывания кальция в кишечнике и активации его усвоения организмом. Таким образом, терипаратид обладает анаболическим эффектом, заключающимся в стимуляции образования костной ткани вследствие пролиферации остеобластов. При дефиците данного гормона происходит извлечение кальция и фосфора из костной ткани в кровь, а при его избытке в крови - отложение кальция в костях.

Способность терипаратида к восстановлению и наращиванию костной ткани делает его ценным лекарственным соединением при лечении такого заболевания, как остеопороз. Препарат на его основе хорошо зарекомендовал себя при терапии остеопороза у женщин в постменопаузальном периоде и входит в перечень ЖНВЛП. Таким образом, разработка эффективной технологии его получения является важной и актуальной задачей.

Ранее в ИБХ РАН на опытном производстве был создан штамм-продуцент, способный к продукции гибридного белка, состоящего из тиоредоксина, сайта узнавания протеиназы вируса гравировки табака (TEV-протеиназы) и терипаратида. Масштабирование и оптимизация стадии культивирования штамма-продуцента, в ходе которых использовался ферментёр с рабочим объемом 200 л, привело к многократному увеличению выхода биомассы с 1 л культуральной жидкости по сравнению с качалочными колбами. Гибридный белок продуцировался в растворимой форме, что позволило нам разработать простой способ его очистки за 2 хроматографические стадии. Также нами были подобраны оптимальные условия ферментативного гидролиза гибридного белка TEV-протеиназой, при которых выход составил более 85%. Для выделения целевого белка из реакционной смеси использовали ионообменную хроматографию с окончательной очисткой на ОФ ВЭЖХ с последующей лиофилизацией. Разработанная нами, легко масштабируемая пилотная технология позволяет получить 70 мг активной фармацевтической субстанции терипаратида с чистотой более 98% с 1 л культуральной жидкости.

8.24. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НИКОТИНОВОГО РЕЦЕПТОРА ТИПА $\alpha 7$ В КЛЕТКАХ HEK293

Кукушкин И.Д.^{1,2}, Бычков М.Л.², Шуленко М.А.², Евдокимова А.О.^{1,2},
Шлепова О.В.^{1,2}, Люкманова Е.Н.^{1,2}

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Pya23kuku@gmail.com

Никотиновый рецептор ацетилхолина типа $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChR) является пентамерным лиганд-зависимым ионным каналом, который экспрессируется во всех отделах мозга и играет важную роль в когнитивных процессах и мышлении. Многие психические и неврологические заболевания часто связаны с изменениями в работе ионных каналов, в том числе и $\alpha 7$ -nAChR. Перспективным способом лечения заболеваний, связанных с дисфункцией $\alpha 7$ -nAChR, может быть создание препаратов, имитирующих свойства природных лигандов, однако, для успешного дизайна новых лекарственных препаратов необходимы знания о пространственной структуре $\alpha 7$ -nAChR. Все данные о структуре рецептора в настоящий момент получены с использованием модельных химерных белков, содержащих участки внеклеточного домена $\alpha 7$ -nAChR и ацетилхолин-связывающего белка моллюска *Lymnaea stagnalis*. Получение пространственной структуры полноразмерного функционального $\alpha 7$ -nAChR является важной задачей современной структурной биологии и фармакологии.

В рамках данной работы разработана система экспрессии полноразмерного функционального $\alpha 7$ -nAChR в клетках эукариот. Для этого использовалась транзientная трансфекция клеток линии HEK293-GnTi-(S) плазмидой pLVT/ $\alpha 7$ -nAChR и плазмидой, кодирующей ген шаперона $\alpha 7$ -nAChR NACHO (pVAX/NACHO), при помощи которого происходит встраивание $\alpha 7$ -nAChR в мембрану и сборка функционального пентамера рецептора.

Мы показали, что наиболее подходящими средами для наработки $\alpha 7$ -nAChR является среда DMEM с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (ПанЭко) и бессывороточная среда ESF SFM (Expression Systems). Следует отметить, что в бессывороточной среде ESF SFM клетки HEK293-GNTi-(S) росли медленнее в среднем на ~25%. Также была выявлена оптимальная плотность клеток для трансфекции, составившая 1 млн клеток в 1 мл питательной среды. При данной плотности количество клеток удваивается в среднем за 24 часа, и культура может прожить в течение 72 часов без пересева.

При помощи проточной цитофлуориметрии с флуоресцентно-меченным α -bungarotoксином (специфическим лигандом функционального $\alpha 7$ -nAChR) было показано, что наибольшая экспрессия функционального $\alpha 7$ -nAChR на поверхности клеток происходит через 48 часов после ко-трансфекции клеток HEK293 плазмидами pLVT/ $\alpha 7$ -nAChR и pVAX1/NACHO в молярном соотношении 1 : 3.

Конфокальная микроскопия с флуоресцентно-меченным а-бунгаротоксином выявила, что в норме клетки HEK293-GNTi-(S) не экспрессируют функциональный $\alpha 7$ -nAChR. Однако, через 48 часов после трансфекции клеток плазмидами, кодирующими $\alpha 7$ -nAChR и NACHO, наблюдалось значимое накопление функционального $\alpha 7$ -nAChR рецептора на поверхности клеточной мембраны.

Был разработан протокол очистки $\alpha 7$ -nAChR из клеток HEK293-GNTi-(S). Для этого клетки лизировали при помощи ультразвука, рецептор солюбилизировали в детергенте DDM и очищали с помощью аффинной хроматографии при помощи смолы, конъюгированной с анти-FLAG моноклональными антителами. Дополнительную очистку и выделение пентамерной фракции рецептора осуществляли с помощью гель-фильтрации. Чистоту полученного препарата проверяли при помощи Вестерн-блоттинга.

Таким образом, впервые в клетках эукариот получен полноразмерный $\alpha 7$ -nAChR для дальнейших структурно-функциональных исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-74-20163.

8.25. СУПРАМОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА НА ОСНОВЕ МЕЛАМИНА И ЦИАНУРАТА ДЛЯ ИНКАПСУЛЯЦИИ ДНК

Куракина Т.А.^{1,2}, Дубовиченко М.В.¹, Кацуба К.Е.¹, Колпащиков Д.М.^{1,3}, Скорб Е.В.¹

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

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

³ University of Central Florida, Orlando, USA

tkurakina.isc@gmail.com

В последние несколько лет в биотехнологии появляется множество новых наноматериалов, основанных на ДНК [1]. Данные разработки имеют множество прикладных значений: от направленной доставки лекарств [2] до разработки ДНК компьютера [3,4].

Меламин и цианурат - малые органические молекулы, обладающие способностью к самосборке в супрамолекулярные структуры благодаря водородным связям [5]. Также, они обладают уникальной молекулярной структурой: она сходна со структурой азотистых оснований аденина (А) [6] и тимина (Т) [7]. Такие уникальные свойства позволяют им взаимодействовать с нуклеотидами ДНК, что приводит к образованию сложных структур. Например, Li et al. создали поли(Т)-меламин дуплекс [7]. В другом исследовании Avakyan et. al. получили поли(А)-цианурат волокна [6].

Целью нашей работы является создание нового типа супрамолекулярных структур (частицах) на основе меламина и циануровой кислоты с инкапсулированной ДНК. Данная разработка предоставит новую базу для фундаментальных исследований нуклеиновых кислот (ДНК и РНК); механизма того, как отдельные нуклеотиды организовались в нуклеиновые кислоты в процессе эволюции. В нашем исследовании мы доказали возможность образования микроскопических супрамолекулярных структур из биоорганических молекул, что дает возможность для развития новых ДНК-биотехнологий и синтетической биологии. В дальнейших исследованиях планируется запуск искусственных каскадов ДНК в полученных частицах.

Литература:

1. Seeman N.C. & Sleiman H.F. DNA nanotechnology. Nat. Rev. Mater. 3, (2017).
2. Hu Q., Li H., Wang L., Gu H. & Fan C. DNA Nanotechnology-Enabled Drug Delivery Systems. Chemical reviews, vol. 119, 6459-6506 (2019).
3. Seelig G., Soloveichik D., Zhang D.Y. & Winfree E. Enzyme-free nucleic acid logic circuits. Science (80-.). (2006) doi:10.1126/science.1132493.
4. Yurke B., Turberfield A.J., Mills A.P., Simmel F.C. & Neumann J.L. A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. Nature (2000) doi:10.1038/35020524.
5. Seto C.T. & Whitesides G.M. Molecular Self-Assembly through Hydrogen Bonding: Supramolecular Aggregates Based on the Cyanuric Acid-Melamine Lattice. J. Am. Chem. Soc. 115, 905-916 (1993).
6. Avakyan N. et al. Reprogramming the assembly of unmodified DNA with a small molecule. Nat. Chem. 8, 368-376 (2016).
7. Li Q. et al. A poly(thymine)-melamine duplex for the assembly of DNA nanomaterials. Nat. Mater. 19, 1012–1018 (2020).

8.26. РАЗРАБОТКА И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКОАФФИННЫХ АГЕНТОВ НА ОСНОВЕ СКАФФОЛДОВЫХ РАСПОЗНАЮЩИХ БЕЛКОВ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Макаров А.Д.^{1,2}, Шипунова В.О.², Прошкина Г.М.², Деев С.М.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова, РАН, Москва
alexiscreeper@gmail.com

В основе данной работы лежит использование эффекта плазмонного усиления биолюминесценции для создания агентов онкотераностики. Механизм усиления биолюминесценции поверхностным плазмонным резонансом (ППР) подразумевает усиление биолюминесценции в системе "субстрат-люцифераза" при нахождении активной возбужденной формы субстрата вблизи наноструктур, обладающих свойством ППР. В данной работе в качестве биолюминесцентной пары "субстрат-люцифераза" будет использоваться современная популярная система на основе люциферазы NanoLuc, а именно, "NanoLuc - фуримазин", а акцептором электромагнитного излучения будут выступать коллоидно стабильные наночастицы, обладающие ППР. Биолюминесцентная платформа на основе генно-инженерной люциферазы NanoLuc и синтетического субстрата фуримазина в современной молекулярной биологии широко применяется как для оптического имиджинга, так и для терапии опухолей глубоких тканей. Для придания адресных свойств коллоидным плазмонным наночастицам, они будут дополнительно модифицированы HER2-распознающими белками, что подразумевает создание генетической конструкции, кодирующей химерный белок из люциферазы NanoLuc и адресной молекулы - скаффолдового белка дарпина 9.29, селективно распознающего онкомаркер HER2, а также последующие выделение и очистку данного белка. Полученные в ходе реализации проекта высокоаффинные агенты на основе наночастиц и данного адресного биолюминесцентного белка позволят проводить как прижизненный мониторинг, так и неинвазивную терапию HER2-положительных опухолей.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ №17-74-20146 (культивирование клеток млекопитающих) и РФФИ № 20-34-70136 (синтез наночастиц).

8.27. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТА И ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТА ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТ ГИДРОЛАЗЫ *IDEONELLA* *SAKAIENSIS*

Макарова Анна В.^{1,2}, Макарова Алёна В.², Болдинова Е.О.², Шилкин Е.С.²

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

²Институт молекулярной генетики НИЦ "Курчатовский институт", Москва
anya_makarova_98@bk.ru

Благодаря уникальным свойствам синтетические пластики заменили многие природные материалы, но их высокая стойкость в окружающей среде бросает вызов экологической безопасности. Разработка подходов ферментативного биоразложения пластиков на основе ферментов, открывает новые возможности переработки синтетических материалов.

Полиэтилентерефталат (ПЭТ) является одним из самых распространенных полимеров в мире. В недавних исследованиях были обнаружены ферменты, которые могут разрушать высококристаллический ПЭТ. Ферментом, наиболее эффективно разрушающим ПЭТ, является полиэтилентерефталат гидролаза (ПЭТаза), обнаруженная в бактериях *Ideonella sakaiensis*. В нашем исследовании была создана генетическая конструкция для регулируемой продукции ПЭТазы *I. sakaiensis* в клетках *E. coli*, осуществлена продукция ПЭТазы с N-концевым 6xHIS тагом и частичная очистки белка с помощью аффинной хроматографии из клеток бактерий. Тестирование на пленке из ПЭТ проводилось в течение недели в фосфатном буфере при pH=7.0 и температуре 30°C.

8.28. СОЗДАНИЕ БРЕТ-КОНЬЮГАТОВ ЛЮЦИФЕРАЗЫ И КВАНТОВЫХ ТОЧЕК С ЦЕЛЬЮ УЛУЧШЕНИЯ БИОВИЗУАЛИЗАЦИИ

Маркелова Е.Е.¹, Сизиков А.А.¹, Волкова Е.А.², Рынгач А.¹, Яременко А.В.^{1,3}, Никитин М.П.^{1,3}

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

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
markelova.ee@phystech.edu

Конъюгаты квантовых точек и люциферазы - класс биоконъюгатов квантовых точек, которым не нужен внешний свет для перехода в возбуждённое состояние. Вместо этого их световое излучение зависит от биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) с присоединённой молекулы фермента. Фермент получает эту энергию в результате взаимодействия со своим субстратом. BRET-конъюгаты квантовых точек сочетают в себе преимущества флуоресценции квантовых точек, такие как высокий квантовый выход и фотостабильность, а также более высокую чувствительность биолюминесцентной визуализации. Тем самым, BRET позволяет улучшить биовизуализацию глубоких тканей *in vivo*.

Необходимость данной работы обусловлена тем, что, несмотря на успешность использования BRET, в литературе мало данных об оптимальных условиях для построения и применения системы из субстрата и комплекса фермент-квантовая точка. В рамках настоящей работы была оптимизирована реакция конъюгации люциферазы NanoLuc и квантовых точек, различных по строению и свойствам, с целью распространения данной реакции на другие квантовые точки. Был разработан универсальный способ взаимодействия между молекулами люциферазы и квантовыми точками, основанный на карбодимидном методе. В результате этой работы было найдено 2 пары люциферазы с квантовыми точками, показывающие особенно перспективные результаты. Полученные системы позволили перейти от световых волн длиной 450 нм, излучаемых в процессе реакции неконъюгированной люциферазы NanoLuc с субстратом - коэлектрантином h, к волнам длиной около 680-700 нм. Полученные конъюгаты интересны для высокоэффективной *in vivo* биовизуализации раковых опухолей. В перспективе, использованные структуры из люциферазы и квантовой точки можно дополнить другими высокомолекулярными составляющими. Планируется проведение ряда экспериментов по добавлению пары молекул антиген-антитело между люциферазой и квантовой точкой с целью получения системы, саморазбирающейся в присутствии определённого вещества (имеющего большее сродство к антителу). Так можно будет получить систему для биосенсоринга, которая будет производить длинноволновые световые волны в собранном состоянии и коротковолновые - в разобранном.

8.29. БЛОКИРОВКА СИСТЕМЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ НАНОАГЕНТАМИ В РАЗЛИЧНЫХ ИММУННЫХ СОСТОЯНИЯХ

Миркасымов А.Б.^{1,2}, Зелепукин И.В.^{1,2,3}, Никитин П.И.^{3,4},
Никитин М.П.^{1,2,4}, Деев С.М.^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

³Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва

⁴Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва
mirkasymov@phystech.edu

Различные наночастицы широко применяются в биомедицинских исследованиях для диагностики и терапии злокачественных опухолей. Некоторые из них были допущены для использования в клинике. Однако многие разрабатываемые умные наноконструкции быстро выводятся из кровотока вследствие интенсивного неселективного поглощения клетками системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), в основном макрофагами печени и селезенки. Для продления циркуляции функциональных наноагентов в кровотоке и более целенаправленного их воздействия на мишень в организме нами изучается метод блокировки СМФ. Метод заключается во временном ингибировании способности макрофагов к фагоцитозу за счет поглощения малотоксичных нефункциональных агентов (блокаторов).

В данной работе с помощью библиотеки синтезированных нами магнитных наночастиц, покрытых оксидом кремния, была изучена эффективность метода СМФ блокады для продления циркуляции в кровотоке 50, 100 и 200-нм частиц. Действенность метода была также проверена в различных иммунных состояниях - в модели хронического патологического состояния, вызванного развитием привитой опухоли (меланома B16-F1, рак молочной железы ЕМТ6/Р), а также в модели острого воспаления, вызванного введением липополисахарида кишечной палочки.

Блокировка клеток СМФ *in vivo* проводилась 500-нм частицами из оксида кремния. Концентрация магнитных наночастиц в кровотоке мыши измерялась неинвазивно в режиме реального времени с помощью МРQ-технологии [1].

В результате было показано, что метод СМФ блокады можно эффективно применять для продления циркуляции в кровотоке частиц различного размера, причем не только в нативном состоянии организма, но и в присутствии развивающейся опухоли, а также при остром воспалительном процессе. Таким образом, проведенное исследование демонстрирует практическую значимость метода СМФ блокады для наномедицины, нередко сталкивающейся с подобного рода пациентами.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 17-74-20146).

Литература:

1. Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Yuryev M.V., Mirkasymov A.B., Sokolov I.L., Deyev S.M., Nikitin P.I., Nikitin M.P. Fast processes of nanoparticle blood clearance: Comprehensive study. *Journal of Controlled Release*. 2020 Oct 10; 326:181-191.

8.30. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ТРУДНООБОГАТИМЫХ ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКИХ РУД

Нечаева А.В.^{1,2}, Меламуд В.С.¹, Булаев А.Г.¹

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²РГУ Нефти и Газа (НИУ) им. И.М. Губкина, Москва
nechaevasasha709@gmail.com

Одной из проблем горно-металлургического комплекса является исчерпание богатых и легкообогащаемых руд, что вынуждает вовлекать в переработку некондиционные и бедные руды. При этом запасы руд с низким содержанием цветных металлов велики, но в настоящее время их переработка с помощью обычных технологий обогащения и пирометаллургии зачастую экономически неэффективна. Поэтому очевидно, что актуальным является разработка и внедрение подходов, позволяющих эффективно перерабатывать труднообогащаемые и бедные руды. Одним из перспективных методов для переработки бедных и труднообогащаемых сульфидных руд является кучное биовыщелачивание, которое применяется для получения меди и других металлов.

Целью данной работы являлась проведение лабораторных испытаний для определения целесообразности переработки медно-цинковых руд биогидрометаллургическими методами. Объектами исследования являлись пробы руды медно-цинковых руд Узельгинского месторождения. Основными минералами руд были кварц, халькопирит, сфалерит, пирит. Проба 1 содержала 0.96% меди, 2.72% цинка, 36.1% серы; проба 2 содержала 2.10% меди, 3.18% цинка, 36.8% серы. Биовыщелачивание проводили в перколяционных установках, которые используются для моделирования процессов кучного выщелачивания. Перколяционные установки для биовыщелачивания состояли из колонок (в них помещались пробы руд), куда с помощью перистальтических насосов подавался выщелачивающий раствор, а также емкостей для сбора продуктивных растворов. В каждый перколятор загружали по 1000 г руды, объем выщелачивающего раствора составлял 1000 мл, в выщелачивающий раствор также вносили инокулят, который представлял собой консорциум ацидофильных микроорганизмов, окисляющих сульфидные минералы, сформировавшийся в процессе биовыщелачивания отходов обогащения, а также штаммы *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* Sh 10-1, *Acidithiobacillus caldus* MBC, и *Acidiplasma* sp. MBA-1. За 290 сут из руды 1 было выщелочено 4.8% меди и 73.1% цинка в колонках. Из руды 2 было выщелочено 4.6% меди и 32.1% цинка в колонках. Результаты проведенных экспериментов показывают, что исследуемые руды могут быть успешно переработаны с помощью биогидрометаллургических методов, однако достижение высокой степени извлечения металлов с помощью кучного биовыщелачивания может потребовать большой продолжительности процесса.

8.31. АДРЕСНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Никольская Е.Д.^{1,2}, Сокол М.Б.^{1,2}, Моллаева М.Р.^{1,2}, Фомичева М.В.^{1,2},
Яббаров Н.Г.^{1,2}

¹Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения,
Москва

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
ElenaNikolskaja@gmail.com

В последние годы адресная доставка лекарств в опухолевые клетки стала эффективной стратегией в лечении различных онкологических заболеваний. Пролонгированная, контролируемая и направленная доставка противоопухолевых препаратов увеличивает их терапевтическую эффективность, снижая при этом риск возникновения побочных эффектов, связанных с токсичностью лекарственного препарата. Данный подход может быть осуществлен включением препаратов в наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) с модификацией их поверхности векторными молекулами. Альфа-фетопrotein человека (AFP), а также его С-концевой (3-й) домен (AFP3D), способны связываться с рецепторами AFP, находящимися на поверхности многих опухолевых клеток и практически полностью отсутствующих на нормальных клетках, что делает их перспективными векторными молекулами для адресной доставки препаратов.

Были получены наночастицы PLGA, содержащие дактиномицин, даунорубицин или паклитаксел. Был разработан и оптимизирован метод конъюгации гAFP и гAFP3D с поверхностью полимерных частиц. Средний диаметр полученных конъюгатов был менее 200 нм, дзета-потенциал составлял -18 мВ, индекс полидисперсности был менее 0,2. После проведения конъюгации белковые молекулы сохраняли свою функциональную активность.

Синтезированные конъюгаты обладали высокой цитотоксической активностью в отношении различных линий опухолевых клеток (остеосаркомы человека MG-63, карциномы шейки матки человека HeLa, лимфолейкоза мыши P388, аденокарцинома молочной железы человека MCF-7 и аденокарциномы молочной железы мыши линии Ca755) и не проявляли при этом значительной активности в отношении контрольных клеток (лимфоциты периферической крови человека). Эксперименты *in vivo* показали высокий уровень противоопухолевой активности конъюгатов по таким показателям как торможение роста опухоли (ТРО) и увеличение средней продолжительности жизни, также наблюдался дозозависимый характер ТРО.

Экспериментальные данные подтверждали высокую противоопухолевую эффективность полученных адресных систем доставки, наличие пролонгированного эффекта при снижении неспецифической токсичности. Полученные результаты могут способствовать значительному повышению клинической эффективности при существенном снижении частоты введения и выраженных побочных эффектов.

8.32. ЭФФЕКТ МАКРОЭЛЕМЕНТОГО СОСТАВА СРЕДЫ СОДЕРЖАНИЯ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Обозина А.С.¹, Симоненко С.Ю.¹, Исатаева Д.², Дегтярёвская Т.Ю.¹,
Ларина С.Н.¹, Шидловский Ю.В.^{1,3,4}, Былино О.В.³

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва

²Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана, Москва

³Институт биологии гена РАН, Москва

⁴Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи
anastasiya.obozina@gmail.com

Drosophila melanogaster - модельный организм, используемый для изучения широкого спектра биомедицинских дисциплин. Культуры дрозофилы остаются незаменимой моделью для фундаментальных исследований благодаря их короткому жизненному циклу, лёгкому и недорогому содержанию в лабораторных условиях, маленькому размеру генома. Однако содержание корма для культивирования *D. melanogaster* в различных лабораториях значительно варьирует.

Целью данной работы являлось изучение влияния добавочных количеств макроэлементов (C, N, O, S, Cl, Na, K, Ca, Mg) на скорость развития (% вылетевших к определенному дню мух) и общую продуктивность корма (общее число мух). Исследование было выполнено с использованием классической изогенной линии дикого типа Canton-S, стандартного оборудования генетической лаборатории. Линии выращивались при 25°C в стеклянных пробирках объёмом 30 мл. Отобраны были одновозрастные мухи (возраст: 3-4 дня), которые засевались по 5 самцов и 5 самок на контрольные и экспериментальные среды. По истечении суток родители подсчитывались и удалялись, а пробирки оставались на 10 дней до появления потомства. Подсчёт вылетевших мух проводился на 11 день - с начала лёта первой пробирки и до последнего лёта.

Показано увеличение вылета мух к 11-му дню эксперимента при добавлении к корму 1 г/л Mg^{2+} в виде хлорида на 273,8% ($p < 0,05$) и в виде сульфата на 85,4% ($p < 0,2$) относительно контроля, взятого за 100%. Установлено, что общую продуктивность среды повышают почти все исследованные макроэлементы при добавлении их в массовой концентрации 1 г/л относительно контрольной группы.

Результаты подтвердили, что культуры *D. melanogaster* развиваются при дефиците основных макроэлементов, поэтому для ускорения хода экспериментов и повышения продуктивности среды рекомендуется при варке корма добавление в неё неорганических солей, прежде всего, магнийсодержащих.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-34-51003.

8.33. НАПРАВЛЕННАЯ ПРЕЗЕНТАЦИИ ПЕПТИДОВ В СОСТАВЕ ГКГС КЛАССА II С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Овчинникова Л.А., Ломакин Я.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
leyla_ovchinnikova@yahoo.com

Презентация антигена - важнейший процесс корректного функционирования иммунной системы. Существуют отдельные группы заболеваний, связанные с нарушениями в презентации антигена. В первую очередь, это аутоиммунные и онкологические заболевания. Перспективное направление для терапии таких заболеваний связано с направленной доставкой иммунодоминантных антигенов внутрь профессиональных антиген-презентирующих клеток (АПК) - дендритных клеток и макрофагов.

В своей работе для этих целей мы используем генетически кодируемые внеклеточные везикулы (ГКВВ). Данные везикулы состоят из самособирающихся белковых наноконтейнеров, специфически нагруженных пептидным препаратом. ГКВВ отпочковываются от клетки-продуцента за счет гликопротеида VSV-G, этот же гликопротеид обеспечивает их связывание с мембраной клетки-мишени. Преимущество таких везикул в качестве носителя терапевтического препарата - большой потенциал для белково-инженерных манипуляций, в том числе - возможность таргетированной доставки к клеткам-мишеням, и возможность получения ГКВВ, нагруженных желаемыми антигенами белковой природы. Таким образом делается возможным доставка к АПК пептидных антигенов в составе ГКВВ с целью их дальнейшей презентации на главном комплексе гистосовместимости (ГКГС) класса II. Нами была исследована такая возможность.

Для этого нами была создана генетическая кассета, в которой участки, кодирующие пептиды чередуются с участками, кодирующими сайты катепсинов S и L. Конечный белковый продукт данной кассеты способен специфично загружаться внутрь ГКВВ и доставляется внутрь модельных АПК. В данной работе для верификации возможности использования ГКВВ для презентации антигенов нами были использованы методы масс-спектрометрии. Также мы проанализировали протеомный состав получаемых везикул, для того, чтобы определить их уровень загрузки целевым препаратом и балластными белками.

Работа поддержана грантом РНФ № 18-74-10079.

8.34. БЕЛКОВАЯ КОРОНА ЛИПОСОМ - ДРУГ ИЛИ ВРАГ ЭФФЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ?

Онищенко Н.Р., Третьякова Д.С., Водовозова Е.Л.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
natalia@lipids.ibch.ru

Липосомы (липидные везикулы) исследуются в качестве носителей лекарств с начала 1970-х годов. На сегодняшний день в мире одобрено к применению в клинике порядка 20 липосомальных препаратов для системного введения. В кровотоке липосомы, как и любые другие наноразмерные частицы, мгновенно покрываются белками, формируется так называемая белковая корона, которая фактически является первым физиологическим барьером на пути к целевым тканям и клеткам. Корона модифицирует поверхность носителя, определяет его поведение в кровотоке и, в конечном счете, фармакокинетику и биораспределение инкапсулированного лекарства. В свою очередь, структура белковой короны, ее состав определяются физико-химическими свойствами поверхности самого наноносителя. Неудивительно, что концепция белковой короны в последнее время стала одной из центральных в проблематике наномедицины. Накоплен достаточно большой массив данных о взаимодействиях лекарственных липосом с белками плазмы крови. Это и физико-химические исследования взаимодействий индивидуальных белков с различными липидными композициями; и исследования составов белковых корон, образующихся на различных липосомах в разных условиях, и более поздние исследования взаимосвязи состава белковой короны и биологических эффектов *in vitro* и *in vivo*, в том числе уникальные для наномедицинских препаратов данные о составе белковой короны, формирующейся *in vivo* в организме человека. Различия в постановке экспериментов, прежде всего, разные методы выделения липосом-белковых комплексов (наиболее часто используются гель-проникающая хроматография и (ультра)центрифугирование), зачастую приводят к противоречивым результатам. Неразрешенными остаются вопросы влияния белковой короны на взаимодействия липосом с различными видами клеток, а также влияния ПЭГИлирования (покрытия липосом полиэтиленгликольными цепями) на адсорбцию белков на поверхности липосом. Однако несмотря на фрагментарность знания о белковой короне липосом, биоинформатические методы сегодня позволяют делать первые шаги в прогнозировании влияния тех или иных белков короны на функционирование системы доставки в целом. Исследования в этой области позволяют модулировать поведение лекарственных липосом посредством изменения состава белковой короны для повышения эффективности лечения.

Обзорная работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 19-75-00109).

8.35. МИКРОМИЦЕТЫ *ASPERGILLUS RAPERI* И *ASPERGILLUS CANDIDUS* КАК ПРОДУЦЕНТЫ ФЕРМЕНТОВ С АКТИВНОСТЬЮ К БЕЛКАМ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Очнева А.Г., Осмоловский А.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва
aleksochneva@yandex.ru

На сегодняшний день в медицине наблюдается острый недостаток терапевтических средств и диагностических наборов для заболеваний системы гемостаза. Система гемостаза - это одна из систем жизнеобеспечения организма, она отвечает за свертываемость крови, образование тромбов и их своевременный лизис. Работа системы гемостаза обеспечивается факторами крови, которые образуют сложные каскадные пути. Большая часть участников каскадов - сериновые протеазы. Ряд микроорганизмов продуцирует протеазы, обладающие действием белков системы гемостаза или способностью к их активации. Было показано, что многие представители рода *Aspergillus* являются активными продуцентами таких ферментов. Такие протеазы обладают разной специфичностью, сохраняют высокую активность в широком диапазоне pH и при разной температуре. Ввиду недостаточности данных о распространенности таких ферментов среди представителей рода *Aspergillus* необходимо изучать разные штаммы, которые могут оказаться потенциальными продуцентами. Более того, каждый штамм обладает своим собственным набором протеаз со своей субстратной специфичностью. Особенно важной характеристикой является узкая субстратная специфичность ферментов.

Культивирование микромицетов проводили в глубинных условиях с использованием двухстадийного культивирования (наработки биомассы культуры в посевной среде с последующим переносом культуры в ферментационную для наработки продукта). Активность ферментов определяли общую и по отношению к белкам системы гемостаза. Для общей ферментативной активности использовали нативные белки (казеин). Активность фермента определяли как количество свободного тирозина в супернатанте на мг белка в мл среды. Прямую и активаторную активность к белкам системы гемостаза - с помощью хромогенных пептидных субстратов напрямую с ферментами микромицетов и с предшествующей инкубацией смеси с донорской плазмой крови при 37°C, соответственно. В данном случае активность фермента определяли как количество свободного пара-нитроанилина в растворе на мг белка в мл сред.

Было показано, что общая протеолитическая активность *A. raperi* и *A. candidus* - 9,2 мкмоль Туг/(мл×мг×мин) и 41 мкмоль Туг/(мл×мг×мин), соответственно. Были также получены данные по активности к белкам системы гемостаза: *A. raperi* обладает высокой прямой тромбиноподобной ($8,9 \times 10^{-3}$ мкмоль рНА/(мг×мл×мин)), плазминоподобной ($7,54 \times 10^{-3}$ мкмоль рНА/(мг×мл×мин)) и прямой активностью к плазминогену по урокиназному типу ($6,37 \times 10^{-3}$ мкмоль рНА/(мг×мл×мин)), а *A. candidus* обладает высокой прямой тромбиноподобной ($8,7 \times 10^{-3}$ мкмоль рНА/(мг×мл×мин)), плазминоподобной (7×10^{-3} мкмоль рНА/(мг×мл×мин)) и активаторной к калликреину активностью ($6,1 \times 10^{-3}$ мкмоль рНА/(мг×мл×мин)).

В связи с тем, что ферменты штаммов *A. raperi* и *A. candidus* обладают высокой активностью к ферментам гемостаза, но низкой к нативным белкам, они могут быть перспективными штаммами-продуцентами. Такие ферменты могут быть использованы в терапии и диагностике заболеваний системы гемостаза, а именно тромбозов или гемморагий различной этиологии.

8.36. ПОДБОР ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ ДЛЯ СТИМУЛИРОВАНИЯ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПОДЗЕМНЫХ ВОД ПРИ *IN SITU* БИОРЕМЕДИАЦИИ

Попова Н.М., Сафонов А.В.

Институт физической химии и электрохимии им А.Н. Фрумкина РАН,
Москва
missis_96@mail.ru

Работа предприятий радиохимической промышленности приводит к загрязнению близлежащих территорий тяжелыми металлами, радионуклидами и анионами минеральных кислот. Загрязнение подземных водоносных горизонтов особенно опасно по причине длительной неконтролируемой миграции загрязнителей и рисками их попадания в водозаборы и источники питьевой воды. Биоремедиация - это эффективный, простой и малозатратный способ очистки подземных вод с использованием метаболического потенциала подземной микрофлоры при инжектировании растворимых органических субстратов. Важным условием эффективности *in-situ* биоремедиации в условиях экстремально высоких концентраций загрязнителей является развитие микробных биопленок - устойчивых сообществ различных функциональных групп микроорганизмов, расположенных в матриксе из полисахаридов. Полисахаридный матрикс обеспечивает постоянство внутренней среды в сообществе, создание микро-аэрофильных или анаэробных условий, что, в свою очередь, является ключевым моментом при биоремедиации вод от тяжёлых металлов и радионуклидов а также обеспечивает коммуникацию внутри сообщества и защищает от воздействия загрязнителей.

Целью данного исследования был поиск недорогих и эффективных субстратов, стимулирующих развитие микроорганизмов в биопленках. Основное внимание уделялось сложным субстратам: отходам молочного, пивоваренного, спиртового и сахарного производства (молочная сыворотка, молочная кислота, дрожжевой гидролизат, спиртовая барда). Ранее нами была показана высокая эффективность молочной сыворотки при очистке водоносного горизонта [1]. Объектом данного исследования был верхний водоносный горизонт в районе Электролизно-химического завода в районе г. Зеленогорск, Красноярского края. В результате добавления всех изучаемых органических субстратов наблюдался рост бактерий семейства *Burkholderiaceae* и *Comamonadaceae* (Acidovorax), характеризующихся устойчивостью к тяжёлым металлам и способностью к их удалению [2].

Литература:

1. A. Safonov et al. (2018). Microbial Community and *in situ* Bioremediation of Groundwater by Nitrate Removal in the Zone of a Radioactive Waste Surface Repository. *Frontiers in Microbiology*. 9. doi 10.3389/fmicb.2018.01985.
2. M.L.S. Suhadolnik et al. (2017). Novel arsenic-transforming bacteria and the diversity of their arsenic-related genes and enzymes arising from arsenic-polluted freshwater sediment. *Sci Rep* 7, 11231. doi 10.1038/s41598-017-11548-8.

8.37. ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ КОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ НАЦЕЛЕННОЙ ДОСТАВКИ МОКСИФЛОКСАЦИНА К АЛЬВЕОЛЯРНЫМ МАКРОФАГАМ ЛЕГКОГО

Рокосовина В.В., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва
viktoria.rokosovina@gmail.com

На сегодняшний день возможность эффективного нацеливания является актуальной задачей для лечения многих заболеваний, в том числе, туберкулёза. Манноза - специфический маркер для альвеолярных макрофагов. Многие активные молекулы, такие как моксифлоксацин (МФ), обладают невысокой биодоступностью в целевых тканях и низкой растворимостью, поэтому важна разработка липосомальных наноконтейнеров для доставки таких препаратов. Липосомы - липидные везикулы, напоминающие клеточные мембраны, поэтому биосовместимы и, благодаря своему строению, могут служить контейнерами для водорастворимых и нерастворимых лекарств. Однако липосомы - нестабильные коллоидные системы. Хитозан - природный полисахарид, представляющий собой частично деацелированный хитин. Он стабилизирует липосомы, а при модификации маннозой может обеспечить нацеленную доставку МФ в липосомальных наноконтейнерах.

Целью настоящей работы является изучение строения липосомальных наноконтейнеров, а также устойчивости комплекса липосомальная форма МФ - маннозилированный хитозан в зависимости от липидного состава. Исследования были проведены с использованием метода светодинамического рассеяния и ИК-Фурье спектроскопии.

Изучено влияние длительности предварительной инкубации при 37°C на устойчивость комплекса липосомальной формы МФ с маннозилированным хитозаном с массой хитозана 90 кДа (ХитМан90). Полученные данные для анионных липосом, содержащих в составе дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) и 20% по массе кардиолипина (КЛ) хорошо линейаризуются в координатах Скетчарда и позволяют сделать вывод о том, что с увеличением длительности инкубирования устойчивость комплексов повышается. Таким образом, нагрев в течение 15 минут позволяет наблюдать константу величиной $9,0 \times 10^{-5} \text{M}$, а в течение часа - $3,5 \times 10^{-5} \text{M}$, что почти на порядок ниже константы комплекса, не подвергавшегося инкубированию ($1,2 \times 10^{-4} \text{M}$). Аналогичных результатов для нейтральных липосом (содержащих в составе только ДПФХ) не наблюдается, предположительно по причине экранирования фосфатных групп ДПФХ, не способных, таким образом, для взаимодействия с аминогруппами хитозана в полимере. Метод светодинамического рассеяния позволил получить изотермы сорбции полимера на везикулах, а метод ИК-спектроскопии Фурье показал, что ДПФХ-липосомы, связываются с полимером ХитМан90 через карбонильные группы ДПФХ, в то время как связь полимера с анионными липосомами проходит через фосфатные группы КЛ.

В качестве подтверждающего теста на разные механизмы взаимодействия было проведено исследование гидродинамического радиуса и изменение ζ -потенциала липосом при увеличении основомольного избытка полимера на поверхности везикул. Было установлено, что ХитМан90 в 2-4 основомольном избытке, сорбируясь на отрицательно заряженных липосомах, создает вокруг них шубу в среднем 10 нм и приводит к постепенной нейтрализации заряда на поверхности наноконтейнеров в то время, как сорбция полимера на ДПФХ-липосомах не обладает такой явно выраженной динамикой.

Таким образом, в работе установлен электростатический характер взаимодействия анионных липосом с полимером ХитМан90 и неспецифическая сорбция полимера на поверхности бислоя нейтральных липидных везикул.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-33-00134.

8.38. ПОЛУЧЕНИЕ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ШИПОВИДНОГО БЕЛКА SARS-CoV-2 В СТАБИЛЬНО ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ЛИНИИ CHO

Синегузова М.В.¹, Орлова Н.А.¹, Ковнир С.В.¹, Воробьев И.И.^{1,2}

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Москва
mvsineg@gmail.com

Поверхностный шиповидный белок коронавирусов является вторым по числу копий компонентом вирусной частицы, выполняет функцию прикрепления вирусов к мембране заражаемых клеток, интернализации и покидания эндосом. Шиповидный белок пандемического вируса SARS-CoV-2, в целом сходный по пространственной структуре с шиповидными белками других коронавирусов млекопитающих, обладает достаточно оригинальным рецептор-связывающим доменом (RBD), обеспечивающим образование плотного комплекса тримеризованного S-белка и двух молекул рецептора ангиотензин-превращающего фермента 2. RBD SARS-CoV-2 может быть использован в качестве весьма специфичного минимального антигена для иммунодиагностических тестов. Корректный фолдинг и, соответственно, корректное экспонирование антигенных детерминант для RBD SARS-CoV-2 могут быть реализованы только при экспрессии его гена в клетках животных, что связано с необходимостью вести N-гликозилирование двух сайтов в составе RBD и, предположительно, O-гликозилирование нескольких сайтов. На базе ранее разработанного в нашей лаборатории вектора p1.1, содержащего регуляторные последовательности гена фактора элонгации трансляции китайского хомячка, получено два варианта конструкций, кодирующих RBD SARS-CoV-2 - RBDv1 (319 - 541 по QIS60558.1) и RBDv2 (320 - 537), снабженные разными вариантами лидерного пептида, с-мус-эпитопом для облегчения детекции, и гексагистидиновым (в случае RBDv1) или декагистидиновым тагом (в случае RBDv2) для очистки методом металлохелатной хроматографии. Были получены клетки CHO DG-44, стабильно трансфицированные этими конструкциями, проведено несколько раундов амплификации генетической кассеты в геноме. Для варианта RBDv2 с заметно большей удельной продуктивностью было проведено получение клональных линий-продуцентов.

Разработана процедура очистки, белки охарактеризованы методами ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающихся условиях и гель-фильтрации, для белка RBDv2 содержание мономерной формы превышало 90% для нескольких серий. Также было проведено дегликозилирование и масспектрометрический анализ. Разработанный нами вариант белка RBDv2 может быть использован в качестве антигена в иммунодиагностических тестах и обладает высокой специфичностью при проверке на небольшом числе образцов сывороток крови, полученных от доноров ранее декабря 2019 г. и от лиц, прошедших заражение SARS-CoV-2 по данным ПЦР-диагностики.

8.39. ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

Скрипка М.И.¹, Сон Л.В.^{1,2}, Кудрявцев Д.С.², Кашеверов И.Е.²,
Цетлин В.И.²

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова, РАН, Москва
mariya2010_14@mail.ru

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) - это лиганд-управляемые ионные каналы, состоящие из пяти субъединиц, трансмембранные сегменты которых образуют катион-селективную ионную пору. Синтетические лиганды этих рецепторов используются в качестве инструментов исследования, рассматриваются в качестве перспективных лекарственных веществ для создания препаратов против симптомов болезни Альцгеймера, шизофрении, патологических воспалительных процессов. Такие синтетические лиганды nAChR, как атракуриум, рапакурионий, панкурониум и другие аналогичные им вещества, широко применяются в хирургии в качестве миорелаксантов. Однако наиболее широко (в денежном и в натуральном выражении) синтетические лиганды nAChR применяются в сельском хозяйстве в качестве инсектицидов и акарицидов. Для рационального конструирования и последующего исследования различных синтетических лигандов nAChR необходимы надежные и масштабируемые тест-системы, которые позволят отбирать наиболее перспективные вещества. Одним из путей создания таких тест-систем является использование флуоресцентной детекции изменения цитоплазматической концентрации различных ионов. В настоящей работе была установлена активность в отношении человеческого nAChR $\alpha 7$ подтипа новых синтетических веществ, предварительно отобранных в процессе нескольких раундов виртуального скрининга и радиолигандного анализа с применением ацетилхолинсвязывающих белков *Lymnaea stagnalis*, *Aplisia californica* и их мутантных форм. Применение разработанной тест-системы позволило сделать выводы о дальнейшем направлении рационального конструирования синтетических лигандов nAChR, степени их селективности и биобезопасности. Система тестирования была валидирована с использованием коммерчески-доступного лиганда nAChR PNU 282987, продемонстрировавшего активность активатора nAChR $\alpha 7$ подтипа с характерным значением EC50 = 1,27±0,13 мкМ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №18-74-10088).

8.40. ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ ПОЛИМЕРОВ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ *E. COLI*

Скuredина А.А., Тычинина А.С., Голышев С.А., Белогурова Н.Г.,
Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва
anna.skuredina@yandex.ru

С целью увеличения эффективности антибактериального действия лекарственных препаратов можно использовать различные полимерные носители на основе β-циклодекстринов (ЦД), которые обладают высокой растворимостью и сорбционной емкостью, а также позволяют разработать адресные системы доставки [1,2].

В работе исследована адсорбция полимерных носителей лекарственных препаратов фторхинолонов на основе сульфобутилового эфира ЦД на двух штаммах *E. coli*. Методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) было показано, что штаммы различаются морфологией поверхности: у штамма JM109 есть белковые выросты - фимбрии, а у штамма MN1 фимбрии отсутствуют.

Установлено, что полимеры формируют наночастицы со средним гидродинамическим диаметром 200 нм и обладают отрицательным ζ-потенциалом ($-18,7 \pm 1,1$ мВ). Поверхность клеток *E. coli* также характеризуется отрицательным зарядом $-46,5 \pm 1,3$ мВ вне зависимости от наличия фимбрий. Несмотря на электростатическое отталкивание между бактериями и частицами, при инкубировании полимеров с клеточной суспензией наблюдался рост ζ-потенциала клеток на 5-9 мВ, что указывает на адсорбцию частиц на поверхности клеток. Адсорбция частиц на бактериях также была подтверждена с помощью ТЕМ.

При количественном исследовании адсорбции носителя на клетках было обнаружено, что возможна адсорбция до 60 мкг/мл полимера для MN1 и до 280 мкг/мл для JM109. Важно отметить, что наличие фимбрий обуславливает усиление адсорбции отрицательно заряженных частиц более чем в 4 раза. Полученные результаты важны для разработки новых полимерных носителей лекарственных препаратов с улучшенной антибактериальной активностью.

Литература:

1. Li J. NPG Asia Mater. 2010. Vol. 2, № 3. P. 112-118.
2. Skuredina A.A. et. al Colloid J. 2018. Vol. 80, № 3. P. 312-319.

8.41. ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ БИМОДАЛЬНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Согомонян А.С.^{1,2}, Шипунова В.О.^{1,2}, Деев С.М.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва
annasogomonyan2012@mail.ru

Тераностика является относительно новым направлением в биомедицине, которая подразумевает объединение двух функций в одном препарате - диагностической и терапевтической. Для создания таких препаратов, в частности, применяют полимерные наночастицы, загруженные активными веществами, позволяющими диагностировать и лечить онкозаболевания. В данной работе были получены полимерные наночастицы из поли-лактид-ко-гликолида (PLGA), загруженные ксантеновым красителем Rose Bengal (RB). RB интересен тем, что включает в себе свойства флуоресценции и способности к выработке активных форм кислорода, которые вызывают гибель раковых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*.

Для направленной доставки наночастиц к раковым клеткам использовалось полноразмерное антитело - трастузумаб, применяемое для лечения рака молочной железы и одобренное FDA. Исследование цитотоксичности наночастиц показало, что они вызывают гибель HER2-сверхэкспрессирующих раковых клеток BTNLuc только при воздействии лазерного излучения при длине волны, соответствующей максимуму возбуждения RB. Предварительный эксперимент по визуализации глубинных опухолей у мышей показал недостаточный уровень флуоресценции синтезированных наночастиц. Поэтому для усиления флуоресценции в структуру наночастиц при синтезе был загружен дополнительный краситель - Nile Blue. При объединении этих красителей происходил резонансный перенос энергии: облученные частицы при длине волны 530 нм, флуоресцировали при 660 нм, что не входит в диапазон эмиссии RB. Данная длина волны флуоресценции входит в окно прозрачности биоткани, поэтому полученные наночастицы являются перспективными агентами для *in vivo* диагностики. Бимодальные частицы флуоресцируют только внутри клетки, что было продемонстрировано на клетках BTNLuc с использованием конфокальной микроскопии (что связано с липофильным микроокружением красителей внутри клетки). Исследование интенсивности флуоресценции в биоткани показало, что флуоресценция данных наночастицы сохраняется в течение длительного времени.

Таким образом, в ходе данного исследования были получены наночастицы, обладающими диагностическими (при облучении светом в ИК-диапазоне) и терапевтическими (при облучении 530 нм) свойствами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ №17-74-20146.

8.42. МЕХАНОИНДУЦИРУЕМАЯ КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ, ВЫЗВАННАЯ НИЗКОЧАСТОТНЫМ ВЫСОКОГРАДИЕНТНЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ

Соловьев В.Д.^{1,2}, Шипунова В.О.^{1,2}, Зеленукин И.В.^{1,2}, Деев С.М.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва
soloviev-1@yandex.ru

В настоящий момент раковые заболевания являются одними из лидирующих по показателю смертности среди заболевших. В связи с этим, существует необходимость поиска новейших терапевтических подходов с использованием последних достижений бионанотехнологий. Одним из таких подходов является использование низкочастотного высокоградиентного магнитного поля для механоиндуцируемой гибели раковых клеток. Уже существующий более простой метод с применением вращения клеток в ротаторе и одновременного воздействия на них постоянного магнитного поля не дает возможности в дальнейшем экстраполировать полученные данные, а так же, затрудняет создание физических установок, которые необходимы для дальнейшего развития данных типов методик и их *in vivo* применения.

Цель данного исследования заключалась в изучении воздействия низкочастотного магнитного поля на раковые клетки-мишени и усовершенствовании методологии посредством создания контролируемых экспериментальных условий. В качестве первичного усовершенствования было решено использовать пару соленоидов в конфигурации колец Гельмгольца и микроконтроллер (Arduino), что позволило контролировать условия эксперимента и изучать поведение клеток с магнитными наночастицами (МНЧ) в магнитных полях с индукцией до 2 Тл и частотой до 1 кГц. На установке в описанной выше конфигурации были проведены первичные исследования, с использованием модифицированных ТАТ-пептидом (фрагмент оболочечного белка вируса иммунодефицита человека) магнитных наночастиц, что позволило этим частицам проникать через липофильный клеточный барьер и осуществлять доставку больших и малых молекул, и клеток-мишеней аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, которые показали работоспособность данной методики для механоиндуцированной клеточной гибели.

В настоящее время работа направлена на улучшение всех аспектов методики: модификация установки, эксперименты с различными размерами МНЧ, подготовка к проведению *in vivo* экспериментов и комбинация данного подхода с другими терапевтическими подходами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ №17-74-20146 (синтез и модификация наночастиц) и РФФИ №19-29-04012 (культивирование клеток млекопитающих, тесты по цитотоксичности).

8.43. ПРОИЗВОДНЫЕ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СОСТАВЕ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Сохранева В.А.^{1,2,3}, Яббаров Н.Г.^{2,3}, Труфанова А.А.², Гроза Н.В.¹, Моллаева М.Р.^{2,3}, Сокол М.Б.^{2,3}, Фомичева М.В.^{2,3}, Никольская Е.Д.^{2,3}

¹МИРЭА - Российский технологический университет, Москва

²Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

³Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
sokhraneva.v@mail.ru

Перспективным направлением при создании пролекарств является разработка препаратов на основе природных соединений. Было установлено, что некоторые из ненасыщенных жирных кислот (НЖК) проявляют цитотоксическую активность благодаря метаболитам, в частности, гидропероксипроизводным. Полиненасыщенные жирные кислоты могут оказывать регуляторное воздействие на процесс метастазирования, инвазии и подвижность опухолевых клеток. Наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) в качестве систем доставки препаратов позволяют контролировать фармакокинетику, сохранять стабильность препаратов, увеличивать их биодоступность, а также уменьшать неспецифическую токсичность благодаря пассивной доставке таких систем. Создание полимерной формы с инкапсулированием фенольных производных ПНЖК представляется актуальным и обладает новизной.

Были использованы конъюгаты производных фенола и НЖК:

ПРОК – 2,6-диизопропилфенилолеат, ЭТОК – 2-изопропил-5-метилфенилолеат, ПРЛК – 2,6-диизопропилфениллинолеат и ТЛК – 2-изопропил-5-метилфениллинолеат, которые были инкапсулированы в наночастицы PLGA с помощью метода одинарных эмульсий. Полученные частицы обладали средним диаметром не более 300 нм, дзета-потенциалом -15 мВ, степенью включения 55% и общим содержанием действующего вещества 13%.

Цитотоксическую активность наночастиц исследовали *in vitro* в отношении клеток K562 (эритробластный лейкоз человека), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека) и SKOV-3 (аденокарцинома яичника человека). Наибольшую активность проявили производные олеиновой и линолевой кислоты с 2,6-пропофолом в составе наночастиц (НЧ-ПРОК и НЧ-ПРЛК): IC₅₀ 593 нМ и 10,5 мкМ, для клеточной линии K562; IC₅₀ 2,15 мкМ и 6,1 мкМ для клеточной линии MCF-7; IC₅₀ 772,3 нМ и 33,9 мкМ для клеточной линии SKOV-3, соответственно.

Было установлено, что в свободной форме конъюгаты производных фенола и ПНЖК проявляют цитотоксическую активность при гораздо больших концентрациях, следовательно, было продемонстрировано, что включение данных соединений в состав полимерных частиц способствует эффективной интернализации веществ в опухолевые клетки и увеличивает биодоступность соединений.

8.44. РАЗРАБОТКА БИОКОМПЗИТНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ТРОМБОВ

Супрунчук В.Е., Денисова Е.В.

Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь
vsuprunchuk@ncfu.ru

Современная антитромботическая терапия требует создания эффективных антикоагулянтных и тромболитических препаратов с высокой селективностью действия. Самым распространенным подходом в тромболитической терапии является использование тканевого активатора плазминогена (tPA). Однако для своевременного восстановления кровотока требуются высокие терапевтической дозы tPA. А вследствие опосредованного действия tPA на интактный фибрин [1], высокие дозы могут привести к геморрагическим осложнениям, которые в клинической практике встречаются в 20% случаев [2]. Использование вспомогательной терапии с применением, например, Аннексина А2[3] оставляет не решенным вопрос безопасности применения tPA. Поэтому проблема локального повышения концентрации фермента с очаговой активацией тромболитической активности непосредственно в месте фибринового сгустка является актуальной.

При создании носителя нами был использован полимер природного происхождения и наночастицы магнетита, для осуществления локальности действия и эффективности нацеливания такой системы. В качестве биополимера был выбран фукоидан, представляющий собой высокосульфатированный гетерополисахарид, основным источником которого являются бурые водоросли. Такие особенности полисахарида как высокая доступность его источника и широкий спектр действия (обладает противомикробной, противовоспалительной, антикоагулянтной, противовирусной, иммуномодулирующей активностью), определяет перспективность исследований в направлении внедрения фукоидана в клиническую практику.

Разработанные нанокомпозиты могут быть применены как магнитоуправляемые системы доставки лекарственных веществ локального действия, повышающих эффективность лечения, с контролируемым биораспределением наночастиц. В этом исследовании, наночастицы фукоидан/магнетит были приготовлены простым способом с помощью высокоинтенсивного низкочастотного ультразвукового воздействия с последующей иммобилизацией tPA и исследованием морфологии, размера и магнитных свойств созданного биокompозита.

Литература:

1. Gurewich V. Why so little progress in therapeutic thrombolysis? The current state of the art and prospects for improvement / V. Gurewich // Journal of Thrombosis and Thrombolysis. - 2015. - Vol. 40. - № 4. - P. 480-487.
2. Chung T.W. Accelerating thrombolysis with chitosan-coated plasminogen activators encapsulated in poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles / T.W. Chung, S.S. Wang, W.J. Tsai // Biomaterials. - 2008. - Vol. 29. - № 2. - P. 228-237.
3. Annexin A2 combined with low-dose tPA improves thrombolytic therapy in a rat model of focal embolic stroke / H. Zhu [et al.] // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. - 2010. - Vol. 30. - № 6. - P. 1137-1146.

8.45. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФТОРХИНОЛОНА С ЛИПОСОМАМИ И КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНОЙ

Тычинина А.С., Скуреедина А.А., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва

Tychinina.a@yandex.ru

Многие инфекционные заболевания требуют сложных и длительных схем приема лекарств. Для улучшения эффективности лекарственных препаратов используются циклодекстрины (ЦД), которые обладают рядом преимуществ, такие как высокая растворимость, разнообразные способы введения в организм, создание систем с адресной доставкой.

В работе исследовали влияние типа и природы заместителя в производном ЦД (метильный $-\text{CH}_3$, гидроксипропильный $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, сульфобутиловый эфир $-(\text{CH}_2)_4-\text{SO}_3^-$) на проявление дефектов в липосомальной мембране. Обнаружено, что все производные ЦД вызывают дефекты в бислое при физиологических условиях (рН 7.4, $t=37^\circ\text{C}$). Причем данный эффект наиболее выражен для гидроксипропил- β -циклодекстрина (ГП-ЦД), по-видимому, за счет образования большего количества водородных связей с фосфатными группами липидов.

Кроме того, было исследовано влияние образования комплекса ЦД с лекарственной молекулой левофлоксацином (ЛВ) на взаимодействие препарата с липидным бислоем и клеточной мембраной *E.coli*. С помощью метода кругового дихроизма установлено, что образование комплексов ЛВ-ЦД приводит к усилению взаимодействия лекарства с бислоем, что может способствовать увеличению его биодоступности. Стоит отметить, что для М-ЦД и ГП-ЦД наблюдается больший эффект, чем для СБ-ЦД, что скорее всего это обусловлено отталкиванием отрицательно заряженного заместителя СБ-ЦД от отрицательно заряженных фосфатных групп липидов.

Исследование адсорбции ЛВ-ЦД на клетки *E.coli* проводили методом УФ спектроскопии. Было показано, что все ЦД способствуют усилению адсорбции ЛВ на поверхности бактериальных клеток, по сравнению со свободным ЛВ.

Литература:

1. Chadha R., Kashid N., Saini A. Account of analytical techniques employed for the determination of thermodynamics of inclusion complexation of drugs with cyclodextrins. *J. Sci. Ind. Res. (India)*, 2004, 63, 211-229.

8.46. ПОЛИМЕРНЫЕ PLGA НАНОЧАСТИЦЫ, ЗАГРУЖЕННЫЕ ПЛАЗМОННЫМИ ЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА И МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АДРЕСНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ ДЛЯ ДОСТАВКИ К HER2-СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИМ РАКОВЫМ КЛЕТКАМ

Фирулева П.А.^{1,2}, Шипунова В.О.¹, Деев С.М.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва
polia.firuliova2017@yandex.ru

По оценкам специалистов, общий уровень смертности от рака снизился на 6% среди мужчин и 4% среди женщин в период с 2014 по 2019 год (M.Malvezzi et al., Annals of Oncology, 2019). Такие показатели были достигнуты за счёт увеличения эффективности как диагностирования, так и лечения злокачественных образований. Несмотря на столь оптимистичные прогнозы, на сегодняшний день активно продолжается разработка новых и совершенствование существующих методов борьбы с опухолевыми заболеваниями. Перспективными объектами для создания терапевтических агентов являются наночастицы различной природы, обладающие широким спектром уникальных характеристик: малый размер, высокое отношение поверхности к объему, способность образовывать комплексы "наночастица-лиганд". Среди большого разнообразия наноструктур особого внимания заслуживают полимерные наночастицы, в частности, из поли-лактид-ко-гликолида (PLGA) ввиду их биodeградируемости и низкой системной токсичности, а также возможности загрузки нерастворимыми соединениями и другими наночастицами.

Данная работа нацелена на синтез и модификацию полимерных PLGA наночастиц, загруженных наночастицами серебра, обладающих свойством локализованного поверхностного плазмонного резонанса и светоиндуцированного нагрева для реализации локальной гипертермии раковых клеток. Синтезированные наночастицы были модифицированы скаффолдовыми полипептидами, селективно распознающими HER2. Рецептор HER2 - клинически значимый онкомаркер, сверхэкспрессирующийся в приблизительно 30% случаев рака молочной железы человека. Разработанные супрамолекулярные плазмонные наноструктуры обладают рядом диагностических и терапевтических свойств, таким образом являясь эффективными агентами для онкотерапии HER2-сверхэкспрессирующих опухолей.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ №17-74-20146 (культивирование клеток млекопитающих) и РФФИ № 20-34-70136 (синтез наночастиц).

8.47. НАНОЧАСТИЦЫ С ДАУНОРУБИЦИНОМ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Фомичева М.В.^{1,2}, Моллаева М.Р.^{1,2}, Сокол М.Б.^{1,2}, Яббаров Н.Г.^{1,2}, Никольская Е.Д.^{1,2}

¹Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
fom.marg@mail.ru

Даунорубицин (ДНР) относится к группе антрациклиновых антибиотиков и используется при химиотерапии лейкозов, нейробластом, неходжкинских лимфом, хронического миелолейкозе и др. ДНР обладает низкой избирательностью действия, в связи с чем, возникает ряд побочных эффектов. Другой проблемой при клиническом использовании ДНР является первичная и индуцированная лекарственная устойчивость (ЛУ), вырабатываемая опухолевыми клетками.

Для решения данных проблем была разработана полимерная форма ДНР в виде частиц из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) для селективной доставки препарата в клетки-мишени. Получение частиц проводили методом двойного эмульгирования. Размер частиц составлял не более 200 нм, дзета-потенциал -25,3 мВ и общее содержание ДНР 3,1 масс. %.

В экспериментах *in vitro* на линиях опухолевых клеток K562 (эритробластный лейкоз человека) и MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), выявлена схожая специфическая активность, а на резистентных к антрациклиновым препаратам клеточных линиях K562^{Adr} и MCF-7^{Adr}, наблюдалось увеличение активности в 1.6 и 3.4 раза, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о частичном преодолении ЛУ опухолевых клеток.

В экспериментах *in vivo* при изучении противоопухолевой активности ДНР в составе полимерных частиц на самках мышей линии DBA/2 с привитой солидной опухолью лимфолейкоза мыши линии P388 было показано увеличение эффективности полимерной формы в 1.4 раза (по значениям торможения роста опухолей) в сравнении с группами, лечение которых проводили субстанцией даунорубицина. Средняя продолжительность жизни животных в группах с частицами ДНР превосходила контрольную в 1,5 раза, а также наблюдалось увеличение средней продолжительности жизни на 45%.

Таким образом, была продемонстрирована эффективность использования наночастиц с включенным в них ДНР для повышения его противоопухолевой активности, частичного преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, а также снижения неспецифической токсичности препарата.

8.48. ПОЛУЧЕНИЕ ХИТИН- И ХИТОЗАН-МЕЛАНИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ МУХИ ЧЕРНАЯ ЛЬВИНКА

Хайрова А.Ш., Лопатин С.А., Варламов В.П.

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

adelya15@mail.ru

На сегодняшний день эффективное использование биоресурсов является одним из наиболее важных глобальных направлений развития, так как ожидается, что к 2050 году численность мирового населения превысит 9 миллиардов. Муха черная львинка *Hermetia illucens* (*H. illucens*) - уникальное насекомое, личинки которого способны перерабатывать широкий спектр органических отходов (Müller et al., 2017). Важно отметить, что помимо утилизации органических отходов, насекомые служат источниками белка, жира и других ценных биологически активных веществ, к которым относятся хитин и меланин.

Хитин и хитозан, получаемый реакцией дезацетилирования хитина, представляют собой природные биополимеры с уникальными свойствами, включая высокую биологическую и сорбционную активности. Меланин считается природным фото- и радиопротектором. В зависимости от источника и метода выделения меланин обладает различными физико-химическими свойствами, которые могут усиливать свойства хитозана и использоваться для решения важных научных и практических задач. Насекомые являются относительно мало изученными природными источниками хитин-меланиновых комплексов. В этом исследовании на примере подмора *H. illucens* была разработана технология получения этого природного конъюгата, на основе которого было получено его дезацетилированное производное, хитозан-меланиновый комплекс. Стоит подчеркнуть, что на каждой стадии проводился контроль примесей (белка, жира, золы).

Получение хитин-меланинового комплекса осуществлялось через стадии обезжиривания, деминерализации и депотеинирования (С.А. Лопатин, А.Ш. Хайрова, В.П. Варламов, И.В. Соколов, Патент РФ № 2728458). После этого хитин-меланиновый комплекс был дезацетилирован до хитозан-меланинового комплекса. Содержание меланина было определено с помощью электронного парамагнитного резонанса и как для хитин-, так и для хитозан-меланиновых комплексов составляло около 14%. Это еще раз подтверждает, что в отличие от других промышленно разводимых насекомых, например, подмора пчел (Н.В. Погарская, М.И. Селионова, 2008), подмор *H. illucens* является уникальным сырьем для получения ковалентно связанного хитозан-меланинового комплекса.

8.49. АСПЕКТЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ФОСФОРА В МИКРОБНОЙ ДЕФОСФОТАЦИИ СТОЧНЫХ ВОД

Хасанова А.А., Хабибуллина А.Р., Вдовина Т.В., Перушкина Е.В., Сироткин А.С.

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
Казань

hasanovaaigyl@mail.ru, aida_khabibullin@mail.ru

Особое значение в настоящее время приобретает экологическая проблема загрязнения мирового океана биогенными элементами. Удаление фосфатов из сточных вод в процессе биологической очистки осуществляется преимущественно фосфатаккумулирующими микроорганизмами (ФАМ), входящими в сообщество активного ила. К ним относят представителей родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (Асонов Н.Р., 1997).

Фосфатаккумуляция представляет собой процесс бактериального внутриклеточного накопления фосфатов (Жмур Н.С., 2003) в виде полифосфатных гранул различной природы (Кулаковская Т.В., 2014). Для успешного протекания рассматриваемого процесса необходимо чередование режимов аэрации следующим образом: аэробная зона, анаэробная зона, аэробная зона. Установлено, что исследуемые ФАМ высоко чувствительны к воздействию внешних факторов технологического процесса: составу и концентрации питательных веществ, pH, степени насыщения кислородом сточной воды. Для контроля эффективности дефосфатации сточных вод и выбора эффективного технологического решения необходим надежный метод мониторинга биологической активности указанных бактерий.

Согласно расчетам технологических параметров процесса микробного удаления фосфора посредством фосфатаккумуляции было замечено, что потребление клеткой фосфатов на энергетический и конструктивный обмен составляет 12% от общего количества фосфатов в среде культивирования. Необходимо отметить, что конструктивный обмен подразумевает синтез биомолекул (белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот, компонентов клеточной стенки), в том числе фосфолипидных жирных кислот (ФЛЖК). Известно, что ФЛЖК характеризуются высокой специфичностью и содержатся в мембранах только живых организмов, не являются запасным веществом клетки, входят в состав клеточной мембраны, вследствие чего могут реагировать как на окружающие условия, так и на внутриклеточные изменения. На основании перечисленных свойств предлагается их использование в качестве биомаркеров для анализа физиологической активности фосфатаккумулирующих бактерий. Применение метода диагностики фосфолипидных жирных кислот клеточных мембран микроорганизмов позволит идентифицировать бактерии в составе сообщества и оценить влияние стрессирующих факторов на микробиоценоз активного ила, что позволит осуществлять биомониторинг технологического процесса удаления биогенных элементов из сточных вод.

8.50. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД ЭКСТРАКЦИИ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Цветкова Д.В.^{1,2}, Чернышов С.В.¹, Микулинская Г.В.¹

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино

²Пушинский государственный естественно-научный институт, Пущино

dianatzvetckova@yandex.ru

Бактерии рода *Bacillus* активно используются для продукции различных рекомбинантных белков. Толстый (70-80 нм) и прочный слой пептидогликана клеточной стенки этих грамположительных бактерий затрудняет выделение из них ДНК и белков.

Нами были получены пептидогликангидролазы колифагов RB43 и RB49 (EndoRB49 и EndoRB43), специфически разрушающие связь между L-аланином и D-глутаматом бактериального пептидогликана. В данной работе мы применили EndoRB49 и EndoRB43 для выделения геномной ДНК из клеток *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. cereus*. Гомогенные рекомбинантные ферменты EndoRB49 и EndoRB43 получали с помощью продукции в клетках *E.coli* C41(DE3) и дальнейшей хроматографической очистки.

Первоначально был проведен сравнительный анализ различных методов выделения геномной ДНК: физико-химического, химического, химико-ферментативного с неспецифической протеазой, а также вариантов специфического ферментативного гидролиза с помощью яичного лизоцима (HEWL), EndoRB49, EndoRB43 и их коктейлей в присутствии и в отсутствие детергента (SDS). Далее проводили оптимизацию метода выделения путем уменьшения времени инкубации и концентрации ферментов. Депротеинизацию проводили стандартно с использованием фенола и хлороформа.

Все полученные образцы ДНК полностью гидролизировались рестриктазами, имели размер >23 т.п.н., а также служили эффективной матрицей для ПЦР с праймерами, специфичными к гену 16S РНК. Наибольшее количество ДНК из клеток *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* было получено с помощью HEWL, EndoRB49 и их коктейля. При этом в коктейле наблюдается синергизм пептидазы и мурамидазы. Клетки *B. cereus* гидролизу ферментами не подвержены; в их случае наиболее эффективными методами выделения ДНК являются те, в которых присутствует детергент.

HEWL, EndoRB49 и их коктейль оказались эффективны также при выделении клеточных белков, увеличивая их выход до 35% по сравнению с ультразвуковым разрушением.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00492.

8.51. ТЕПЛОВАЯ АГРЕГАЦИЯ ДРОЖЖЕВОЙ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ. ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И (2-ГИДРОКСИПРОПИЛ)- β - ЦИКЛОДЕКСТРИНА

Черников А.М.^{1,2}, Борзова В.А.², Михайлова В.В.², Курганов Б.И.²

¹Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

²ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
chernikov.andrej.mikhailovich@gmail.com

Методами динамического светорассеяния и седиментации изучена кинетика тепловой агрегации алкогольдегидрогеназы (АДГ) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при постоянной температуре 56°C. После предварительного отжига и осаждения дестабилизированной фракции белка, кинетические кривые прироста светорассеяния для АДГ могут быть описаны уравнением: $I = I_{\text{lim}} \{1 - \exp[-k_1(t - t_0)]\}$, где I_{lim} - предельное значение интенсивности светорассеяния, k_1 - параметр, характеризующий начальную скорость агрегации, t_0 - длительность лаг-периода. Параметр k_1 не зависит от концентрации белка в диапазоне 0,15 - 0,5 мг/мл; $k_1 = 0,104 \pm 0,003 \text{ мин}^{-1}$. Сопоставление данного результата с кинетическими кривыми убыли неагрегированного белка, полученными методом седиментации, показывает, что в данной тест-системе скорость-лимитирующей стадией является денатурация нативного белка. Скорость агрегации после замораживания при -20°C возрастает линейно с увеличением концентрации белка. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии показано, что (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрин (2-ГП- β -ЦД) не оказывает влияния на термостабильность очищенной предварительным отжигом АДГ. В присутствии 2-ГП- β -ЦД тепловая агрегация АДГ описывается кинетикой реакции второго порядка с константой скорости $k_{11} = 69 \text{ л}/(\text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1})$. В присутствии 2-ГП- β -ЦД наблюдается смена кинетического режима агрегации, скорость-лимитирующей стадией становится стадия слипания развернутых молекул белка. Количественный анализ кинетических кривых светорассеяния с помощью уравнения $I = v_0(t - t_0) - B(t - t_0)^2$, где v_0 - параметр, характеризующий начальную скорость агрегации, B - константа, показал, что 2-ГП- β -ЦД снижает скорость агрегации АДГ с концентрацией полунасыщения $[L]_{0,5} = 87 \text{ мМ}$. Длительность лаг-периода, t_0 , увеличивается прямо пропорционально повышению концентрации добавленного 2-ГП- β -ЦД. Изучено влияние 2-ГП- β -ЦД на тепловую агрегацию АДГ, подвергавшейся замораживанию -20°C. 2-ГП- β -ЦД подавляет агрегацию АДГ после замораживания-оттаивания ($[L]_{0,5} = 20 \text{ мМ}$), а также после замораживания в присутствии 2-ГП- β -ЦД ($[L]_{0,5} = 34 \text{ мМ}$).

8.52. ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ РАЗЛАГАТЬ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМЕРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Шебанова А.Д.¹, Ренфельд Ж.В.¹, Казакова А.А.², Черных А.М.¹,
Гайдина А.С.¹, Мясоедова Н.М.¹, Коломыцева М.П.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
РАН, Пущино

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва

anneteshebanova@mail.ru

В результате человеческой деятельности нарастающим темпом идет загрязнение почвы и водной среды отходами промышленных изделий из устойчивых к разложению полимерных материалов. Ежедневно среднестатистический россиянин производит 1,134 кг твердых коммунальных отходов, при этом пластик составляет 14,21% от этого количества. На данный момент переработке подвергается только 4% всего российского мусора, еще 6% сжигается, а 90% размещается на полигонах, площадь которых, по данным Росприроднадзора, занимает на данный момент 4 млн га. Основными направлениями решения сложившегося кризиса являются: механическая и термическая утилизация; сбор, обработка и вторичное использование; захоронение и др. Почти все эти решения либо недостаточны, либо они сопряжены с высокими эксплуатационными и энергетическими затратами, а также сопутствующим выделением токсичных соединений. В связи с чем, поиск новых перспективных экологически чистых технологий переработки пластика является особенно актуальным.

Микроорганизмы содержат большое разнообразие гидролаз (липаз, кутиназ, эстераз, в том числе ПЭТаз) - потенциальных кандидатов для расщепления полимерных цепей пластика (Molitor et al., 2019). В настоящей работе проведён широкий скрининг микроорганизмов с гидролазной активностью среди грамположительных почвенных бактерий и грибов в ходе твердофазного и погруженного культивирования. Отобраны наиболее перспективные культуры микроорганизмов, способные разрушать промышленные полимерные соединения. С помощью молекулярно-биологических методов подтверждено наличие генов, кодирующих ферменты с потенциальной ПЭТазной активностью, у трех бактерий рода *Streptomyces*, а также у 10 грибов родов *Rhizoctonia*, *Lentinus*, *Steccherinum*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Fusarium*, *Curvularia* и *Myrothecium*. Впервые для представителей базидиомицетов показано наличие генов, кодирующие ферменты, активные в отношении ПЭТ.

Литература:

1. Molitor, R., Bollinger, A., Kubicki, S., Loeschke, A., Jaeger, K., & Thies, S. (2019). Agar plate-based screening methods for the identification of polyester hydrolysis by *Pseudomonas* species. *Microbial Biotechnology*, 13(1), 274-284. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13418>

8.53. ГИБРИДНЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ ДЛЯ ОНКОТЕРАНОСТИКИ

Шипунова В.О.^{1,2,3}, Деев С.М.^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

³Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва
viktoriya.shipunova@phystech.edu

Бурно развивающаяся область современной биомедицины, тераностика, подразумевает разработку и внедрение мультимодальных структур, способных осуществлять как диагностические, так и терапевтические функции. Наиболее перспективной платформой для создания таких структур являются наночастицы различной природы, которым присущи уникальные свойства, позволяющие максимально эффективно применять их в биомедицине, например: возможность включения в состав низкорастворимых соединений, нагрев под воздействием внешних электромагнитных полей, а также адресная доставка химио- или радиопрепаратов только к определённому типу клеток, например, к раковым.

В докладе представлены результаты серии работ, посвящённых дизайну, синтезу и модификации спектра органических и неорганических наноструктур (магнитных, золотых, серебряных, белковых, кремниевых, гибридных умных структур, а также полимерных [1-3]). Разработанные наноструктуры успешно были модифицированы нацеливающими молекулами самой различной природы: как полноразмерными и мини-антителами, а также скаффолдовыми распознающими белками неиммуноглобулиновой природы - дарпинами и аффибоди. Был разработан ряд методов по эффективному введению данных супрамолекулярных агентов в организм, в том числе, влияющие на время полувыведения из кровотока и улучшающие накопление в ксенографтных опухолях животных. Данные исследования являются шагом на пути к созданию средств биомедицины нового поколения, способных диагностировать заболевание и действовать как терапевтическое соединение в случае необходимости.

Исследования выполнены в рамках грантов РНФ №17-74-20146 (синтез наноконструкций, *in vivo* эксперименты) и РФФИ №20-34-70136 (модификация наноструктур и работа с культурами клеток).

Литература:

1. Shipunova V. et al. MPQ-cytometry: a magnetism-based method for quantification of nanoparticle-cell interactions. *Nanoscale*. 2016.
2. Shipunova V. et al. Versatile Platform for Nanoparticle Surface Bioengineering Based on SiO₂?Binding Peptide and Proteinaceous Barnase*Barstar Interface. *ACS Appl. Mater. Inter*. 2018.
3. Shipunova V. et al. Dual Regioselective Targeting the Same Receptor in Nanoparticle-Mediated Combination Immuno/Chemotherapy for Enhanced Image-Guided Cancer Treatment. *ACS Nano*. 2020

8.54. НАНОКОМПЛЕКС Хлорина e_6 И НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА

Щока Е.В.¹, Суворов Н.В.¹, Никитин А.А.², Миронов А.Ф.¹, Грин М.А.¹

¹МИРЭА - Российский технологический университет, Москва

²Национальный исследовательский технологический университет

"МИСиС", Москва

Schoka.ev@yandex.ru

Метод фотодинамической терапии(ФДТ) онкологических заболеваний основан на введении фотосенсибилизатора(ФС) в организм и облучении светом определенной длины волны зоны интереса. В результате этого происходит выделение активных форм кислорода, обуславливающее разрушение опухолевых тканей. Для противоопухолевой фотодинамической терапии в настоящее время применяются производные природного хлорофилла А. Направленная доставка ФС может быть осуществлена путем пассивного таргетинга, который обусловлен эффектом повышенной проницаемости и удерживания (EPR - эффектом).

Целью данной работы являлось создание наноплатформы на основе наночастиц золота(НЧЗ)с иммобилизованным ФС на их поверхность. Наночастицы золота были получены путем термического разложения тетрахлораурата водорода(HAuCl_4) с последующей ковалентной обшивкой полиэтиленгликолем(ПЭГ), который был модифицирован липоевой кислотой по одному из *ОН*-концов. В качестве ФС был выбран Хлорин e_6 , который в настоящее время активно применяется в клинической ФДТ. Иммобилизацию ФС проводили из его водного раствора. Стабильность полученного наноконъюгата была оценена в различных буферных системах. Смещение пика поглощения ФС в длинноволновую область может свидетельствовать о взаимодействии ФС с поверхностью НЧЗ.

Гидродинамический диаметр частиц по данным динамического рассеяния света составил 68 нм. Сферическая морфология наночастиц была подтверждена с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии(ПЭМ). Диаметр ядра золота по данным ПЭМ составил 13 нм.

Полученный наноконъюгат может быть перспективным таргетным агентом для ФДТ онкологических заболеваний, а также эффективной таргетной платформой для комбинированной терапии.

8.55. НОВЫЕ УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ЛИНКЕРЫ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ АНТИТЕЛ

Яббаров Н.Г.^{1,2}, Сокол М.Б.^{1,2}, Никольская Е.Д.^{1,2}, Моллаева М.Р.^{1,2}, Фомичева М.В.^{1,2}

¹Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
marvint@inbox.ru

Конъюгация моноклональных антител (мАТ) с различными носителями нашла широкое применение в дизайне терапевтических и диагностических препаратов. Боковые цепи цистеина и лизина чаще других используются для конъюгации мАТ с природными и синтетическими молекулами, что приводит к образованию нежелательных гетерогенных продуктов, агрегатов и т. д. Для решения подобных проблем были разработаны различные альтернативные подходы: использование синтетических аналогов аминокислот, введение эпитопов для проведения конъюгации с помощью ферментов, введение дополнительных цистеинов, конъюгация с N-аминогруппой и т.д. Применение этих методов часто может повлиять на биологическую активность и представляет собой многостадийный процесс. Fc-связывающие низкомолекулярные аналоги protein A и G содержащие фотоактивные синтетические аналоги аминокислот, в последнее время привлекли особый интерес исследователей для направленной иммобилизации IgG. В нашей работе был использован схожий подход, однако, для иммобилизации мАТ был разработан пептид, на основе C-DCAWHLGELVWCT-N последовательности, несущей в своем составе реактивный аналог лизина, ковалентное связывание которого с боковыми цепями аминокислот Fc-доменов инициируется в слабо щелочных условиях и не требует УФ-облучения. В качестве модельного носителя были использованы полиамидаминовые дендримеры 4.5-го поколения. Полученный конъюгат характеризовался малым размером ~11 нм, отрицательным поверхностным зарядом (-16±2,2 мВ) и способностью связывать, IgG человека, кролика, мыши и крысы, в т.ч. различные изоформы. Анализ конкурентного связывания с Z-домена подтвердил Fc-ориентированную опсонизацию поверхности дендримера. SPR анализ выявил значения K_d для различных изоформ IgG в пределах 4.6 - 212.7 нМ. MS анализ подтвердил способность пептида ковалентно связываться с Lys248 Трастузумаба. Her2⁺ клетки линии A549, специфически интернализировали несущий Первичные результаты свидетельствуют о том, что подобные носители имеют широкие перспективы для разработки систем доставки лекарственных и диагностических препаратов, биосенсоров и могут быть применены как *in vitro* так и *in vivo*.

Исследование было проведено при поддержке гранта РФФИ №18-29-09022\19.

8.56. TRAIL DR5-B-КОНЬЮГИРОВАННЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛИ

Яголович А.В.¹, Артыков А.А.¹, Гаспарян М.Э.¹, Курбанова Л.А.¹, Марквичева Е.А.¹, Куликов П.П.², Кусков А.Н.²

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

anneyagolovich@gmail.com

Ранее были получены полимерные наночастицы на основе N-винилпирролидона, ковалентно конъюгированные с противоопухолевым цитокином TRAIL DR5-B и имеющие терапевтическую перспективу благодаря селективной индукции апоптоза в опухолевых клетках путем специфического связывания TRAIL DR5-B с рецептором DR5, повышенной стабильности и усилению апоптотического сигнала за счет повышения локальной концентрации цитокина. В настоящей работе исследовано влияние состава частиц на размеры и сорбционную емкость, а также противоопухолевая активность на 2D- и 3D- моделях *in vitro*.

Отмечена закономерность по увеличению сорбционной емкости частиц при увеличении содержания стабилизирующего агента протиионамида в гидрофобном ядре и малеимид-модифицированного полимера в составе частиц. Показано, что размеры частиц зависят от длины полимерных молекул, а комбинация молекул разной длины в составе частицы влияет на стерическую доступность малеимидных групп для молекул белка TRAIL DR5-B/V114C, и, тем самым, на сорбционную емкость.

Цитотоксичность TRAIL DR5-B-конъюгированных полимерных частиц с максимальной сорбционной емкостью была протестирована на 2D-моделях опухолевых клеточных линий и 3D-моделях на основе мультиклеточных опухолевых сфероидов различного происхождения *in vitro*. TRAIL DR5-B-конъюгированные полимерные частицы вызывали гибель TRAIL-чувствительной линии опухолевых клеток колоректальной карциномы HCT116 сопоставимо с со свободным цитокином TRAIL DR5-B и преодолевали резистентность к TRAIL DR5-B опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7. При этом показано отсутствие цитотоксичности по отношению к нормальным мезенхимальным стволовым клеткам линии FRSN.

В результате получен совершенно новый вариант наночастиц для таргетной доставки рецептор-селективного цитокина TRAIL DR5-B в опухоли. После оптимизации полимерного состава, размеров и сорбционной емкости TRAIL DR5-B-конъюгированные полимерные частицы на основе N-винилпирролидона могут быть исследованы на ксенографтных доклинических моделях *in vivo* с перспективой клинического применения для терапии широкого спектра опухолей.

8.57. ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Якупова Л.Р., Копнова Т.Ю., Скурядина А.А., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва

Yakupova.Linara@mail.ru

Антибактериальный препарат левофлоксацин (ЛВ), обладающий широким спектром действия, принадлежит к группе лекарственных средств фторхинолонов [1]. Применение высоких дозировок антибактериального препарата при длительной терапии может вызвать возникновение побочных эффектов. Увеличить биодоступность и снизить токсичность лекарственных веществ можно путем создания систем доставки, в частности на основе β -циклодекстринов и их производных. При разработке систем доставки важно учитывать поведение активной частицы в кровотоке и характер её взаимодействия с основным белком плазмы - человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), который может оказывать существенное влияние на фармакологические параметры препарата [2].

Данная работа посвящена изучению связывания ЧСА с ЛВ, а также исследованию влияния на данное связывание комплексообразования ЛВ с метил- β -циклодекстрином (МЦД) с применением различных спектроскопических методов. Анализ системы ЛВ-ЧСА методом флуоресцентной спектроскопии демонстрирует снижение интенсивности флуоресценции белка на 345 нм при увеличении концентрации ЛВ в растворе (рН 7,4; 37°C). Максимальный эффект тушения наблюдается для комплексов, в которых соотношение концентраций ЛВ:ЧСА составляет 10 : 1, что говорит о насыщении центров связывания белка лекарственными молекулами. Методом динамического светорассеяния зафиксировано изменение ζ -потенциала белка в присутствии ЛВ на 3 мВ, что свидетельствует о наличии электростатических взаимодействий между молекулами в системе. С применением метода УФ-спектроскопии было установлено, что ЧСА способствует замедлению высвобождения ЛВ из модельной диализной мембраны при мольном избытке лекарства равном 5-10 (рН = 7,4; 37°C). Также было показано, что комплексообразование ЛВ с МЦД не вносит существенных изменений в кинетику высвобождения ЛВ в присутствии ЧСА (соотношение концентраций компонентов в комплексах ЛВ+МЦД+ЧСА соответственно равно 1:1:1 и 10:10:1), что свидетельствует об беспрепятственном взаимодействии с белком фторхинолона, связанного с МЦД. Понимание зависимости влияния ЧСА на ЛВ позволит расширить область применения ЛВ, путем создания препаратов с улучшенными свойствами.

Литература:

1. Davis R., Bryson H. Review of Levofloxacin // Drug Evaluation. 1994. V. 47. P. 677 - 700.
2. Fanali G., Di Masi A., Trezza V. Human serum albumin: From bench to bedside// Molecular Aspects of Medicine. 2012 V. 33 P. 209-290.

8.58. БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕДНО-НИКЕЛЕВОЙ РУДЫ

Янишевская Е.С.^{1,2}, Меламуд В.С.¹, Булаев А.Г.¹

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Институт проблем промышленной экологии Севера ФИЦ КНЦ РАН, Апатиты
drygina_es@mail.ru

Для минерально-сырьевой базы Мурманской области характерна проблема исчерпания запасов медно-никелевых руд, пригодных для получения кондиционных сульфидных концентратов, подходящих для пирометаллургической переработки. При этом на территории области существует целый ряд месторождений, в том числе техногенных, которые не эксплуатируются из-за низкого содержания ценных компонентов в рудах, а также из-за небольших запасов. Перспективным подходом для переработки руд таких месторождений является кучное биовыщелачивание, так как данная технология не требует высоких капитальных и эксплуатационных затрат и успешно применяется для извлечения металлов (меди, цинка, никеля, урана) из сульфидных руд. Целью данной работы являлась проведение лабораторных испытаний для определения возможности извлечения металлов из медно-никелевой руды с помощью кучного биовыщелачивания. Образец руды месторождения Нюд II Мончегорского рудного района (Мурманская область) содержал Ni - 0.72 %, Cu - 0.20%, Fe - 14.8%, S_{общая} - 8,1%, S_{сульфидная} - 7.8%. Биовыщелачивание проводили в перколяторах, куда загружали навески руды (1000 г), которые используются для моделирования процессов кучного выщелачивания, объем выщелачивающего раствора составлял 1000 мл. В выщелачивающий раствор также вносили инокулят, который представлял собой консорциум ацидофильных микроорганизмов, окисляющих сульфидные минералы. Испытания проводили при 25, 35 и 45°C, так как для процессов кучного биовыщелачивания характерен саморазогрев рудного штабеля и важно оценить возможность проведения процесса при разных температурах. За 60 сут из руды было извлечено при 25°C - 18% Ni и 2% Cu; при 35°C - 20% Ni и 2.4% Cu; при 45°C - 17% Ni и 0.8% Cu. Результаты проведенных экспериментов показывают возможность проведения длительных процессов биовыщелачивания исследуемой руды для извлечения цветных металлов, при этом больший практический интерес может представлять собой извлечение никеля из-за его более высокой стоимости и более высокой скорости выщелачивания, обусловленной большей устойчивостью минералов меди (халькопирит) к биовыщелачиванию по сравнению с минералами никеля (пентландит, пирротин).

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-35-50073.

8.59. НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕДЕНИЯ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В КРОВОТОКЕ

Яременко А.В.^{1,2}, Зелепукин И.В.^{1,2}, Миркасымов А.Б.^{1,2}, Яременко Т.В.³,
Деев С.М.², Никитин П.И.⁴, Никитин М.П.^{1,2}

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, Москва

³Первый Московский государственный медицинский университет имени
И.М. Сеченова, Москва

⁴Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва
aleksey.yaremenko@phystech.edu

Наночастицы в настоящее время становятся классическим решением для улучшения доставки лекарств *in vivo*. Данная область продолжает свое активное развитие: в доклинических и фундаментальных исследованиях создается огромное количество умных многофункциональных наноструктур, а многие более простые частицы уже были представлены в клинике. Одним из часто представленных в исследованиях типов наночастиц являются суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (SPIONs), используемые как МРТ-контрастные агенты, для сепарации клеток и магнитной доставки различных объектов. Критически важным элементом прохождения доклинических и клинических исследований является качественный анализ фармакокинетики наночастиц, в том числе параметров их циркуляции в кровотоке. К сожалению, существующие методы анализа параметров циркуляции наночастиц имеют существенные ограничения, т. к. большинство из них работают фактически *ex vivo* и требует многократного отбора крови у животного, что накладывает серьезные ограничения на разрешение по времени и само по себе способно влиять на фармакокинетику частиц.

В данной работе мы представляем неинвазивный MPQ (Magnetic Particle Quantification) метод для *in vivo* анализа процессов выведения магнитных частиц из кровотока, в том числе и быстрых, и демонстрируем его возможности. На примере мышей BALB/c и C57Bl/6, а также мышей с опухолями меланомы B16-F1 и EMT6/P мы показываем, что иммунологический профиль и патологические состояния животных могут сильно влиять на поведение наночастиц в кровотоке. Также мы подробно показываем, что различные параметры наночастиц, такие как: доза, размер, заряд, и покрытие также могут оказывать серьезное влияние на циркуляцию.

Мы полагаем, что представленный метод может стать серьезным инструментом для фундаментальных и клинических исследований фармакокинетики наночастиц с магнитными метками и также потенциально может быть применим для клинической диагностики расстройств, связанных с активностью иммунной системы [1].

Литература:

1. I.V. Zelepukin*, A.V. Yaremenko*, M.V. Yuryev, A.B. Mirkasymov, I.L. Sokolov, S.M. Deyev, P.I. Nikitin, M.P. Nikitin. Fast processes of nanoparticle blood clearance: comprehensive study. Journal of Controlled Release, 2020

8.60. ДЕЙСТВИЕ ПЕРСУЛЬФАТОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ И СОДЕРЖАНИЕ КАРОТИНОИДОВ В КУЛЬТУРАХ ДРОЖЖЕЙ

Ячкула А.А., Делеган Я.А., Антипова Т.В., Вайнштейн М.Б.

ПНЦБИ РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино
repinaalenk@mail.ru

Каротиноиды являются биологически важными соединениями, используемыми в пищевых продуктах и кормах. Для их промышленного получения используют дрожжи родов *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* и др. Известно, что каротиноиды по отношению к окислителям и свободным радикалам выступают в роли антиоксидантов. В соответствии с этой биологической ролью дрожжи увеличивают продукцию каротиноидов, если их подвергать окислительному стрессу, что достигается путем увеличения аэрации при культивировании, добавлением перекисных соединений и т.д. В этом отношении интересна возможность увеличения ОВП (окислительно-восстановительного потенциала) и содержания кислорода не только продувкой, но и дополнительным внесением окислителей.

Мы исследовали возможность увеличения содержания каротиноидов в биомассе дрожжей путем внесения в среду персульфатов, которые в растворе разлагаются с выделением активного кислорода. Контроль продолжительности действия персульфатов проводили, определяя ОВП среды после внесения окислителя. В работе исследовали воздействие персульфатов на *Rhodospiridium sphaerocarpum* ВКПМ У-1559. Нами показано, что внесение в среду персульфата в количестве 0,2 г/л и выше приводило к длительному увеличению ОВП среды примерно на 100 мВ и выше, а также к окислению (обесцвечиванию) каротиноидов дрожжей. Внесение в среду меньших количеств персульфатов (0,05-0,10 г/л) приводило к длящемуся до 4 суток увеличению ОВП примерно на 60 мВ и увеличению содержания каротиноидов от 134 до 181 мкг/г сухой биомассы. Добавление персульфатов в среду культивирования является аналогом практикуемого добавления перекиси водорода, но преимуществами сухих персульфатов являются большее удобство в отношении транспортировки, длительности хранения и простоты использования.

Внесение персульфата аммония в аэрируемую среду в количестве 0,15-0,50 г/л обеспечивало в конце лог-фазы прирост содержания каротиноидов по сравнению с контролем в 1,3-1,4 раза без увеличения прироста биомассы. Персульфаты подавляли прирост биомассы, поэтому настоящее исследование ограничено демонстрацией возможности их использования для стимуляции каротинообразования. Рекомендуется двухэтапное культивирование: наращивание биомассы на первом этапе и внесение персульфатов для увеличения содержания каротиноидов на втором.

8.61. ПРИМЕНЕНИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PAENIBACILLUS* ДЛЯ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ СИЛИКАТНЫХ РУД

Ячкула А.А., Яцкив А.А., Быков А.Г., Абашина Т.Н., Вайнштейн М.Б.

ПНЦБИ РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино
perinaalenk@mail.ru

Бактериальное выщелачивание металлов из силикатных минеральных руд следует отнести к перспективным методам обогащения руд, так как данный процесс позволяет увеличить объемы сырьевых ресурсов за счет использования бедных руд и отвалов с низким содержанием металлов. Методы биовыщелачивания экологически более безопасны по сравнению с традиционными пирометаллургическими методами и химическим выщелачиванием.

На сегодняшний день механизм биогенного разрушения силикатов недостаточно ясен: в процессе извлечения металлов из них могут участвовать ферменты, кислоты, хелаторы, сахара.

Нами были изучены состав и возможная роль в процессе выщелачивания биогенных сахаров, синтезируемых клетками "силикатных бацилл" *Paenibacillus mucilaginosus* и *P. edaphicus* - слизиобразующими бактериями, продуцирующими большое количество внеклеточных экзополисахаридов. В качестве выщелачиваемого материала использовали стекловидные шлаки, образующиеся при утилизации отходов электронной промышленности. Анализ полисахаридов проводили с помощью жидкостного хроматографа высокого давления фирмы "ЛКБ" (Швеция) с УФ-детектором переменной длины волны. Установили, что в состав образованных бактериями экзополисахаридов входили моносахара: глюкоза, манноза, раффиноза.

Нами были проведены эксперименты по биохимическому выщелачиванию силикатного минерального сырья отделенной от клеток экзополисахаридной слизью бактерий *P. mucilaginosus* и *P. edaphicus*. Выход никеля в раствор при выщелачивании биогенными экзополисахаридами был выше по сравнению с бактериальным выщелачиванием без сахаров в 100 и более раз. Таким образом, выщелачивание металлов биогенными сахарами/экзополисахаридами может быть одним из эффективных механизмов, реализуемых силикатными бациллами.

СЕКЦИЯ 9

БИМЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ СТЕПЕНИ АКТИВНОСТИ МИОМЫ МАТКИ У ПАЦИЕНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Азадова Г.Я.², Леваков С.А.², Мамедова А.Э.², Павлюков М.С.¹,
Маслякова М.И.¹, Чекова М.Д.¹, Шахпаронов М.И.¹, Антипова Н.В.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва
gullyar.azadova@mail.ru

Миома матки - доброкачественная, моноклональная, хорошо ограниченная, капсулированная опухоль, происходящая из гладкомышечных клеток шейки или тела матки. Она является одной из наиболее распространенных доброкачественных опухолей женской половой системы. В последние годы отмечается тенденция к "омоложению" данного заболевания. Возможно, это связано как с наследственным характером заболевания, образом жизни, так и с внедрением новых, более усовершенствованных методов диагностики. Тем не менее, изучение диагностики миомы матки остается одной из главных проблем гинекологии. Длинные некодирующие РНК имеют длину более 200 нуклеотидов и контролируют транскрипцию, трансляцию, регуляцию экспрессии генов, регуляцию клеточного цикла, апоптоз, пролиферацию и дифференцировку клеток. Они играют непосредственную роль в патогенезе многих заболеваний, поэтому являются одним из новых направлений диагностики. Целью данного исследования было выявить уровень экспрессии длинных некодирующих РНК lincROR и lincSURV у пациенток с миомой матки для диагностики и прогнозирования степени ее активности. В проспективное исследование были включены 18 женщин репродуктивного возраста. Экспрессию lincROR и lincSURV в биоптатах миомы матки определяли методом ПЦР в реальном времени относительно экспрессии длинных нкРНК в биоптатах нормального миометрия. Сформированы 2 группы: I группа 1 - пациентки с установленным диагнозом миома матки, II группа - контрольная группа-миометрий без патологий. В I группе выявлено достоверное понижение уровня РНК lincROR и lincSURV по сравнению со II группой.

Исследование уровня экспрессии lincROR и lincSURV может быть использовано в диагностике и прогнозировании степени активности миомы матки.

9.2. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БОГАТОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ НА КЛЕТКИ ЭНДОМЕТРИЯ КРЫСЫ

Артемова Д.А.^{1,2}, Вишнякова П.А.^{2,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

²Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва

³НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва
artiomova.darya@yandex.ru

Богатая тромбоцитами плазма (PRP) - это плазма с концентрацией тромбоцитов выше среднего количества в норме, обладающая способностью ускорять регенерацию тканей. В настоящее время PRP применяют в клинической практике при терапии тонкого эндометрия. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) - это мультипотентные клетки, обнаруженные во многих тканях организма, в том числе и в эндометрии.

Создание модели на основе МСК эндометрия крысы и исследование механизмов действия аутологичной PRP на полученной культуре являлось целью нашей работы.

После выделения культуры стромальных клеток эндометрия крысы мы доказали ее принадлежность к культуре МСК при анализе типичных МСК маркеров, а также путем индуцированной дифференцировки клеток по трем направлениям: адипогенном, остеогенном, хондрогенном.

Иммуноцитохимическое окрашивание на маркер пролиферации клеток Ki-67 показало, что процент Ki-67+ ядер был выше в культуре клеток после 24 часов инкубации с PRP по сравнению с культурами клеток, инкубируемых с обычной плазмой (ОП) и в полной питательной среде (ППС). Вестерн-блот анализ показал, что маркер стволовых клеток c-kit экспрессируется только в клетках, инкубируемых в ППС. При инкубации с ОП уровень стресс-индуцируемого белка p53 повышался, а при инкубации с PRP оставался на уровне контроля. Продукция антиапоптотического белка Bcl-2 во всех исследуемых группах не изменялась. После инкубации с PRP и ОП значительно увеличилась экспрессия маркера аутофагии белка LC3B, металлопротеиназы 9 (ММР 9), эстрогенового рецептора α (ER α), а также продукция противовоспалительного интерлейкина 10.

Таким образом, PRP стимулирует клеточное самообновления путем индукции аутофагии и усиления пролиферации МСК, ускоряет ремоделирование внеклеточного матрикса, повышает продукцию ER α в стромальных клетках эндометрия, а также PRP оказывает противовоспалительное действие.

Работа поддержана грантом РНФ № 17-15-01419 и грантом РФФИ № 20-04-60027.

9.3. ВЗАИМОСВЯЗЬ КАЛЬЦИЕВОГО ОТВЕТА НЕЗРЕЛЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК В ТИПИЧНЫХ МЕСТАХ РАЗВИТИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА С ЛИПОПРОТЕИДАМИ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

Балацкий А.В., Ожималов И.Д., Балацкая М.Н., Попов В.С., Калинина Н.И.

Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова,
Москва
balatsky@fbm.msu.ru

Введение. Поиск механизмов начала формирования атеросклеротических поражений показал, что в участках сосудистого русла, предрасположенных к развитию атеросклероза располагаются незрелые гладкомышечные клетки (ГМК), экспрессирующие NG2 и CD146. Однако механизмы участия этих клеток в атерогенезе остаются невыясненными. Мы предположили, что незрелые ГМК могут обладать повышенной чувствительностью к известным системным атерогенным факторам: гормону ангиотензину II (AngII) и липопротеидам низкой плотности (ЛПНП).

Методы. В работе использовали аорты мышей линии C57BL/6. Для получения суспензии клеток аорты обрабатывали коллагеназой I. Полученные клетки окрашивали антителами к NG2, CD146 и Т-кадгерину, после чего долю оценивали таких клеток в полученной суспензии при помощи проточной цитометрии, либо высаживали для дальнейшего культивирования. После культивирования NG2+CD146+ клетки отсортировывали и высадили для имиджинга единичных клеток. Кальциевый ответ оценивали при помощи микроскопии с зондом Fluo-8, AngII использовался в конечной концентрации 10^{-7} М, ЛПНП - 100 мкг/мл.

Результаты. При добавлении AngII к незрелым ГМК, вопреки ожиданиям, не было обнаружено кальциевого ответа. Однако мы обнаружили, что популяция NG2+CD146+ ГМК содержит в 2 раза больше клеток, несущих на своей поверхности рецептор ЛПНП Т-кадгерин, чем NG2+CD146-. Из литературы известно, что связывание ЛПНП с Т-кадгерином потенцирует кальциевый ответ на другие гормоны. Действительно, после добавления к клеткам ЛПНП развивался кальциевый ответ на них, а некоторые клетки приобретали способность отвечать на последующее добавление Ang II повышением внутриклеточного кальция.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о наличии в типичных местах развития атеросклероза популяции клеток, особым образом отвечающих на атерогенные стимулы - ЛПНП и AngII. Эти клетки могут играть ключевую роль в атерогенезе и, в частности быть причиной мозаичности атеросклеротических поражений.

Изучение экспрессии Т-кадгерина выполнено в рамках гранта РФФИ № 19-29-04118, исследование кальциевого ответа выполнено в рамках гранта РФФИ № 19-015-00429.

9.4. СЕРЕБРЯНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ФОТОТЕРМИЧЕСКИ-ИНДУЦИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ HER2-СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Белова М.М.^{1,2}, Шипунова В.О.^{1,2,3}, Деев С.М.^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

³Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва
belova.mm@phystech.edu

В настоящее время существует необходимость разработки соединений для направленной терапии, а также тераностики раковых заболеваний, направленных исключительно на трансформированные клетки и ткани. Наночастицы, сочетающие в себе диагностические и терапевтические функции, являются наиболее перспективными структурами для онкотераностики [1]. В частности, металлические наночастицы (НЧ), полученные биобезопасным методом "зеленого" синтеза [2], и обладающие свойством локализованного поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР) обладают набором всех вышеописанных свойств [3].

В данной работе серебряные НЧ были получены методом "зеленого" синтеза с использованием вторичных метаболитов лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.). Было показано, что НЧ являются коллоидно стабильными и обладают оптимальным для онкотераностики размером (36.4 ± 1.6 нм). Показано, что НЧ обладают цитотоксическими свойствами по отношению к линии аденокарциномы молочной железы (SK-BR-3) и яичника (SKOV3-1ip) человека, а также, что данные НЧ также могут быть использованы для локальной гипертермии. При облучении клеток SKOV3-1ip, меченых НЧ, синим светом ($\lambda = 465$ нм, мощность = 95 мВ/см²) наблюдалось снижение их пролиферативной активности *in vitro*. Также была исследована противораковая эффективность полученных НЧ *in vivo* на моделях ксенотрафтных опухолей лабораторных мышей. При лечении мышей линии BALB/c Nu/Nu внутриопухолевыми инъекциями НЧ, модифицированных аффибоди $Z_{HER2:342}$, в сочетании с внешним облучением опухоли синим светом была продемонстрирована полная ремиссия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов РФФ № 17-74-20146 (синтез наночастиц, *in vivo* эксперименты) и РФФИ № 20-34-70136 (*in vitro* эксперименты).

Литература:

1. Shipunova V. O. et al. Versatile Platform for Nanoparticle Surface Bioengineering Based on SiO₂-Binding Peptide and Proteinaceous Barnase*Barstar Interface // ACS applied materials & interfaces. - 2018. - Т. 10 - №. 20. - С. 17437-17447.
2. Belova M. M. et al. "Green" synthesis of cytotoxic silver nanoparticles based on secondary metabolites of *Lavandula angustifolia* Mill. // Acta Naturae. - 2019. - Т. 11. - № 2 (41). - С. 47-53.

9.5. ОТСУТСТВИЕ ХАРАКТЕРНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПОПУЛЯЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

*Вавилова Ю.Д., Бойко А.А., Стрельцова М.А., Ерохина С.А.,
Коваленко Е.И., Сапожников А.М.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, Москва
JuliaTeterina12@gmail.com

Болезнь Паркинсона (БП) - нейродегенеративное заболевание, для которого характерно хроническое воспаление в головном мозге - нейровоспаление. В развитие нейровоспаления вовлечены не только резидентные клетки центральной нервной системы, но и мигрирующие в головной мозг клетки периферической иммунной системы (ПИС). Есть вероятность, что клетки ПИС, в частности Т-лимфоциты, могут отражать воспалительные процессы, происходящие в головном мозге при БП. С возрастом, а также при хроническом воспалении, например, при наличии персистирующей цитомегаловирусной инфекции (CMV), на Т-лимфоцитах периферической крови наблюдается увеличение экспрессии молекулы CD57. Молекула CD57 характеризует репликативное старение Т-лимфоцитов. Целью данного исследования было провести оценку изменения экспрессии CD57 периферическими Т-лимфоцитами пациентов с БП.

Выборка доноров состояла из 26 пожилых пациентов с БП, 33 здоровых пожилых доноров (ПД) и 30 здоровых молодых доноров (МД). Иммунофенотипирование проводили методом проточной цитометрии. Серотипирование доноров на CMV проводили методом ИФА. Доля Т-лимфоцитов (CD3⁺CD56⁻), экспрессирующих маркер CD57, оказалась ниже в группе БП, чем в группе здоровых ПД (8.5 и 13.1, $p=0.03$). В то время как доля этих клеток в группе здоровых МД оказалась достоверно ниже, чем группе БП и здоровых ПД. 76% здоровых ПД, 73% здоровых МД и 100% доноров с БП оказались серопозитивными по IgG к CMV. С целью исключить влияние CMV на уровень экспрессии CD57, проводили сравнение между группами доноров, инфицированных CMV. При этом, не было обнаружено различий в экспрессии молекулы CD57 Т-лимфоцитами в группах БП и здоровых МД (8.5 и 6.8 $p=0.2$), тогда как между группами здоровых ПД и здоровых МД выявлены достоверные различия (14.4 и 6.8 $p<0.0001$). Несмотря на то, что наша выборка больных состоит из людей пожилого возраста, мы обнаружили отсутствие репликативного старения Т-клеток, несмотря на наличие CMV инфекции у этих доноров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-31-70001.

9.6. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ ДЕСТРУКЦИИ НОСИТЕЛЕЙ, ИСПОЛЬЗУЮЩИХСЯ ПРИ СОЗДАНИИ КОМПЛЕКСНОГО ПЕРЕВЯЗОЧНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ РАН

Ванюшенкова А.А., Белов А.А.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Москва

AVaniushenkova@yandex.ru

В медицине антиоксиданты служат для укрепления иммунной системы, защиты и восстановления организма после облучения и раковых поражений, способствуют выздоровлению при сердечных заболеваниях, болезнях почек, стрессах и повреждениях кожных покровов при глубоких ранах и ожогах. Процесс заживления ожоговых ран идет в условиях активации свободно радикальных реакций, что особенно заметно на этапе воспаления. Медицине довольно давно известен положительный эффект от приема комплекса антиоксидантов при лечении ожогов различной тяжести, при их использовании сроки заживления ран сокращались почти в два раза.

В нашей работе для определения антиоксидантной активности (АОА) использовался спектрофотометрический метод, основанный на реакции антиоксиданта со свободными радикалами ДФПГ. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что использованные носители на основе диальдегидцеллюлозы (ДАЦ) независимо от степени окисления (количество альдегидных групп), а также целлюлоза и продукты ее деструкции не обладают АОА.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что присутствие АОА в образцах ДАЦ вызвано только гидролитическим разрушением окисленной целлюлозы. В ходе деструкции в среду выделяются фрагменты матрицы, обладающие существенной антирадикальной активностью, при этом с увеличением количества альдегидных групп на носители, величина АОА растет. Согласно вышеописанному, ДАЦ можно отнести к пролекарствам. Матрица подобного носителя подвержена биотрансформации, вследствие чего активированные фрагменты способны проникать к месту воспаления и оказывать необходимый фармакологический эффект. Анализ полученных зависимостей показал, что АОА ДАЦ растет в течение всего исследования, вследствие чего можно предположить, что в процессе ведения раны будет достигнута необходимая терапевтическая дозировка антиоксиданта. Имобилизованный Хт предотвращает разрушение окисленной целлюлозы и снижает АОА продуктов распада.

Таким образом, материалы на основе ДАЦ являются не только хорошими хемосорбционными носителями для создания ранозаживляющих препаратов с иммобилизованными ТА, но и проявляют свойства ингибиторов свободно-радикальных реакции, что делает дальнейшую разработку раневых покрытий на их основе перспективным направлением в создании комплексных препаратов для лечения некротизированных и экссудирующих ран.

9.7. ВЛИЯНИЕ РИФАМПИЦИНА НА СОДЕРЖАНИЕ мРНК ГЕНОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПРИЛЕЖАЮЩЕМ ЯДРЕ МОЗГА КРЫС

Васильева В.Ю.¹, Данильченко Е.А.³, Ереско С.О.⁴, Айрапетов М.И.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
vivas1031999@gmail.com

Введение. Рифампицин - антибиотик широкого спектра действия. Имеются сведения о его противонейровоспалительных свойствах. Длительное употребление этанола приводит к развитию нейровоспаления в структурах головного мозга, в том числе и в прилежащем ядре (nucleus accumbens, NAc). Интересным представляется оценить относительное содержание мРНК ключевых генов, вовлечённых в механизмы развития нейровоспаления, при введении инъекций рифампицина.

Цель работы. Оценить относительное содержание мРНК ключевых генов, вовлечённых в механизмы развития нейровоспаления, в NAc длительно алкоголизированных крыс при введении инъекций рифампицина.

Материалы и методы. Алкоголизация крыс (n=16) 20%-ным р-ом этанола в течение 2 мес. После отмены этанола в течение 7-ми сут. были выполнены инъекции рифампицина внутривенно (100 мг/кг, n=8) или физ. р-ра (n=8). Интактная группа крыс (n=10) получала воду. Крыс декапитировали и извлекали NAc. РНК выделяли с помощью TRIzol (Евроген, Россия). ОТ проводили с использованием M-MuLV обратной транскриптазы (Евроген, Россия). Реал-тайм ПЦР (Mx3005P, Stratagene, США) проводили в смеси, содержащей SYBR Green Mix (Евроген, Россия), смесь праймеров (Beagle, Россия). Полученные данные нормированы по содержанию мРНК гена Gapdh.

Результаты. Уровень мРНК *Tlr4*, *Il1 β* , *Ccl2*, *Mycd88* был повышен почти в 2 раза в NAc у крыс на 7-е сут. отмены этанола в группе с инъекциями физ. р-ра в сравнении с интактной группой крыс, при этом уровень мРНК *Tlr3* и *Irf3* был понижен почти в 2 раза, уровень мРНК *Tlr7* незначительно повышен. У крыс, получавших инъекции рифампицина, повысился уровень мРНК *Irf3* до уровня контрольных значений, а уровень мРНК *Tlr7* в группе рифампицина понизился в 1,6 раз.

Выводы. Полученные данные указывают на способность рифампицина оказывать корректирующее действие на патофизиологические механизмы, наблюдаемые в NAc мозга крыс в условиях длительной алкоголизации.

9.8. МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ОТБОРА С ПОМОЩЬЮ ГЕННЫХ СЕТЕЙ

Ваулин А.Н.¹, Касьянов А.С.^{1,2}, Морозова И.Ю.³

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

²Институт общей генетики РАН, Москва, Россия

³The Institute of Evolutionary Medicine, University of Zurich, Switzerland
anulin@mail.ru

Метрики, позволяющие исследовать отбор, основываются на подсчете частот однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Но обнаружение отбора в полигенных признаках усложняется тем, что эти метрики, детектирующие отбор, будут выдавать малые значения из-за того, что частоты будут поделены между всеми генами, влияющими на признак. Чаще всего применяется подход, учитывающий метрики отбора по отдельным SNP. Это позволяет рассматривать ситуацию, когда отбор влияет на один ген. Но в случае полигенных признаков отбор приводит к изменению частоты нескольких SNP разных генов. В данной работе использованы генные сети для обнаружения отбора по полигенным признакам.

Нами была написана программа на языке Python, которая принимает на вход значения отбора (метрики) по однонуклеотидным полиморфизмам (SNP) и определяет генные сети, по которым идет отбор в популяции. Были использованы 303 генные сети KEGG и данные проекта 1000 Genomes (internationalgenome.org). За метрику генной сети принималась медиана метрик SNP в ней. Исследование проводилось для популяции американцев европейского происхождения (CEU), которая сравнивалась с совокупностью европейских популяций

На основе использования нашего подхода было показано, что популяции отличаются разной степенью действия отбора на 25 сетей. Среди них, например, есть сети такие как Autoimmune thyroid disease, Graft-versus-host disease, которые связаны с аутоиммунными заболеваниями, а также сети Viral myocarditis, Influenza A и Tuberculosis, связанные с ответом на инфекционные заболевания. Таким образом, создан метод, который в отличие от большинства предыдущих работ, позволяет анализировать отбор по полигенным признакам. На базе этого метода реализована программа, выявляющая отбор по этим признакам на основе частот SNP в популяции и выявлены биохимические процессы, на которые влияет отбор в популяции CEU.

9.9. ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНАХ У МЫШЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ МИЛДРОНАТА

Вишняков А.В., Горелов Е.Н., Валов С.Л., Саляхутдинов Р.Р., Чонтян Д.А.

Кировский государственный медицинский университет, Киров

okulova_i@mail.ru

Милдронат - синтетический препарат, улучшающий энергообеспечение и метаболизм тканей. Действующее вещество милдроната способствует выведению накопленных токсинов из клеток, оказывает тонизирующее влияние и защищает клетки от повреждения. Действие препарата основано на угнетении деятельности некоторых ферментов и доставку длинноцепочечных жирных кислот через мембраны клеток, тем самым предотвращается накопление токсических производных, не окисленных жирных кислот в клетках. Милдронат является одним из представителей группы препаратов для улучшения обмена веществ и энергоснабжения тканей, обладая антигипоксическим действием, способствует вазодилатации, утилизации продуктов неполного метаболизма глюкозы. Для изучения влияния скормливания милдроната мышам на паренхиматозные органы были проведены морфометрические исследования. При проведении морфометрических измерений почек, были получены следующие результаты: В опытной группе мышей, получавшие милдронат в дозе 0.0078 млг, на 1 грамм веса мышки в течение трех месяцев с перерывом 7 дней, средняя площадь почечных телец в суперцифальной зоне по сравнению с контрольной группой была выше на 15,8%, сосудистого клубочка - на 3,9%, мочевого пространства - на 29,2 % ($p \leq 0.01$). В кортикальной зоне площадь почечного тельца в опытной группе достоверно больше на 21%, сосудистого клубочка - на 8,6%, мочевого пространства - на 40% по сравнению с контролем ($p \leq 0.01$). В медуллярной зоне площадь почечного клубочка в опытной группе мышей была на 18%, сосудистого клубочка - на 2,5% и мочевого пространства - на 49% ($p \leq 0.01$) по сравнению с контролем. При морфометрическом исследовании печени, нами было установлено, что площадь поддольковой вены в опытной группе была достоверно увеличена на 44% по сравнению с контролем, а площадь центральной вены уменьшена на 34%, площадь синусоидного пространства уменьшена в 2,4 раза. Соотношение площади поддольковой вены к центральной в экспериментальной группе составляет 19, 95 против 6,23 (в контроле), в опытной группе соотношение в 1,5 раза больше, чем в контроле, что свидетельствует об улучшении микроциркуляции в тканях печени.

9.10. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕПАТОЦИТАХ ПРИ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С: ИССЛЕДОВАНИЕ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ СРЕДЕ

Голиков М.В.^{1,2}

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

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
cool.mik3492594@yandex.ru

Вирус гепатита С (ВГС) уже два десятилетия является одной из наиболее существенных проблем мирового здравоохранения. По данным ВОЗ во всем мире им поражено около 71 миллиона человек. Несмотря на некоторые успехи в лечении вируса, все еще существует проблема с его своевременным диагностированием, кроме того, стоит отметить, что не все генотипы вируса одинаково хорошо поддаются лечению. Усилившийся научный интерес к проблеме стимулировал попытки разработать эффективную вакцину, но исследователи столкнулись с на данный момент все еще непреодоленными проблемами, связанными с высокой вариабельностью генома вируса.

Общеизвестен факт, что репликация вируса в крови зависит от метаболизма инфицированных клеток. Метаболизм клеток в свою очередь зависит от многочисленных внешних факторов, например, от культуральной среды. Исследования метаболизма инфекционного процесса испытывают затруднения из-за слишком сильного влияния стандартных культуральных сред (напр. DMEM, F12, MEM и др.). В связи с этим недавно были созданы физиологически обоснованные среды (напр. Plasmach, HPLM) и было показано, что метаболические изменения в таких условиях имеют иной характер. Соответственно целью данной работы является исследование метаболических изменений гепатоцитов в разных средах при их инфекции вирусом гепатита С.

Анализ экспрессии основных метаболических путей показал наличие отклика при переходе к физиологической среде в таких метаболических путях, как глутаминолиз, биосинтез серина, пентозофосфатный шунт и т.д. Было обнаружено влияние среды и на токсичность стандартных ингибиторов: клетки культивируемые в физиологической среде становятся менее чувствительными к ингибированию лактатдегидрогеназы, но более чувствительными к ингибитору гексокиназы. Изменились и некоторые показатели клеточного дыхания, но показатели гликолитической активности клеток сохранились и при замене среды. Уровень репликации вируса в клетках, культивируемых в среде Plasmach, был в 6-8 раз ниже, чем в стандартной среде DMEM. Были выявлены нарушения экспрессии ряда генов, включая гены, кодирующих ферменты цикла мочевины.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ №19-74-10086.

9.11. ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕЗАЗУРИНА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В КОЛЛАГЕНОВОМ ГИДРОГЕЛЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Гречаная Ю.С.^{1,3}, Журенков К.Э.^{2,3}, Александрова О.И.³

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

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

julia.grechanaya@yandex.ru

При разработке биоинженерных конструкций (БИК) для регенеративной медицины важным этапом является оценка цитосовместимости скаффолда с культивируемыми клетками. Существует множество методов оценки жизнеспособности клеток. Наиболее часто применяются методы определения их метаболической активности с использованием тетразолиевых и резазуриновых красителей. Тесты на основе резазурина считают более чувствительными и надежными. Однако универсальных протоколов определения с помощью этого теста жизнеспособности клеток, заселённых в 3D-материалы на основе гелей, в доступной нам литературе не обнаружено.

Цель данного исследования: подбор экспериментальным путём оптимальных условий использования резазурина для проведения оценки цитосовместимости скаффолда на основе коллагенового гидрогеля (КГ) с культивируемыми внутри него клетками. В качестве клеточных тест-систем были использованы стволовые клетки слизистой ротовой полости (СКРП) и роговичного лимба (СКРЛ). При инкубировании коллагеновых гидрогелей с культивируемыми в них клетками в питательную среду над гелем добавляли раствор резазурина в различных концентрациях и инкубировали гидрогели в течение 24 часов. Флуоресценцию восстановленного красителя определяли с помощью планшетного ридера (УНИПЛАН, Пикон) (возбуждение при 530 нм, эмиссия при 595 нм).

Экспериментальным путём было выявлено, что для определения жизнеспособности клеток, культивируемых в коллагеновых гидрогелях, оптимальным является использование резазурина в концентрации 1 мг/мл. При использовании более высоких концентраций он токсичен для клеток, культивируемых в гелях. Дальнейшие исследования будут направлены на отработку протокола определения с помощью этого теста жизнеспособности клеток, заселённых в 3D-скаффолды на основе коллагеновых гидрогелей.

9.12. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ САМООРГАНИЗУЮЩИХСЯ СУПРАМЕРОВ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ С ЦИКЛОДЕКСТРИНОВОЙ ГРУППОЙ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Заец К.В.^{1,2}, Васкан И.С.^{2,3}, Залыгин А.В.^{1,2}, Олейников В.А.²

¹Московский государственный педагогический университет, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

⁴Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва
zaetz.ksenia@gmail.com

Неогликолипиды являются синтетическими аналогами гликолипидов и представляют собой молекулы, в состав которых входят полярные "головы", состоящие из углеводов, и неполярные "хвосты", являющиеся остатками жирных кислот. Наличие гидрофобной и гидрофильной частей у неогликолипидов позволяют им самоорганизовываться в мицеллы, что делает их привлекательными в биотехнологических целях, таких как изменение свойств клеточных мембран и разработка средств точечной доставки лекарств, в том числе противораковых антибиотиков. Циклодекстрины, входящие в состав исследуемых супрамеров, являясь полярной частью, улучшают растворимость и стабильность лекарств в воде, помогают увеличить их биодоступность и уменьшают токсичность.

В качестве исследуемого образца на подложки из слюды были нанесены мицеллы, образованные α -CD-Ad-DOPE в водном буфере. Для исследования структурных свойств, к которым относятся форма и размер, использовался полуконтактный метод атомно-силовой микроскопии. В ходе варьирования концентраций от 0,1 мкМ до 500 мкМ была выявлена оптимальная, составляющая 50 мкМ, при которой на поверхности слюды были получены отдельно расположенные мицеллы.

Полученные данные привели к выводу, что данные конструкторы в растворе образуют мицеллы эллипсоидной формы размером от 10 до 12 нм, что позволяет их использовать в качестве контейнеров для точечной доставки лекарств.

9.13. ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ НА РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Земская А.С., Щербакова А.С., Кондукторов К.А., Кочетков С.Н., Козлов М.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
a.zemskaja@mail.ru

Недавние исследования обнаружили, что фиброзное поражение печени у людей, страдающих хроническим гепатитом С (ХГС), коррелирует с клеточным старением (КС) в поврежденных тканях. Однако, до сих пор остается невыясненным, как КС может влиять на репликацию вируса гепатита С (ВГС). В данной работе мы показали, что ингибитор циклин-зависимых киназ 4/6 палбоциклиб ускоряет размножение репликона ВГС в клетках гепатомы человека линии Huh7 luc/neo, индуцируя в них процессы старения.

В частности, палбоциклиб вызывал в клетках рост активных форм кислорода (АФК), эффективный G1 арест клеточного цикла, накопление лизосом и активировал β -галактозидазную активность (маркер клеточного старения [1]), а также вызывал морфологические изменения, характерные для прогрессирующего старения [2]. Нами также было установлено, что при переходе клеток в состояние старения резко увеличивалось количество вирусной РНК, возрастала трансляция белков, кодируемых вирусным репликоном, включая репортерную люциферазу и вирусные белки NS3 и NS5B.

То, что индукция КС в клетках Huh7 luc/neo оказывало стимулирующий эффект на вирусную репликацию, стало предпосылкой для создания тест-системы с более оптимальной "средой обитания" для ВГС. Нами было установлено, что КС по-разному влияет на антивирусную активность препаратов прямого действия (ППД). Из четырех выбранных нами препаратов: телпревира, 2'-Me-Ad, софосбувира и рибавирина, концентрационная зависимость ингибирования репликона телпревиром и 2'-Me-Ad практически совпадала и в свободно пролиферирующей и в сенесцентной тест-системе, как и ожидалось для ППД, эффективность которых против вирусных ферментов не зависит от статуса клетки-хозяина.

Неожиданно для нас в сенесцентной тест-системе анти-ВГС активность софосбувира и рибавирина уменьшалась в 2,5 и 3 раза соответственно. В случае софосбувира это можно объяснить замедлением метаболизма пролекарственной формы препарата, а случае рибавирина - плейотропным механизмом антивирусной активности. Дальнейшее изучение экспрессии клеточных ферментов, вовлеченных в противовирусное действие этих двух препаратов в стареющих клетках, вероятно, позволит точнее определить природу полученных эффектов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00504.

Литература:

1. Höhn A., Weber D., Jung T., Ott C., Hugo M., Kochlik B. et al. (2017) Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. Redox Biol. 11:482-501. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.001>.
2. Li C., Qi L., Bellail A.C., Hao C., Liu T. (2014) PD 0332991 induces G1 arrest of colorectal carcinoma cells through inhibition of the cyclin dependent kinase-6 and retinoblastoma protein axis. Oncol Lett. 7:1673-1678. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.1957>.

9.14. *NEISSERIA GONORRHOEA*: ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ В РОССИИ И В МИРЕ

Кандинов И.Д.¹, Кравцов Д.В.¹, Дементьева Е.И.¹, Грядунов Д.А.¹,
Шаскольский Б.Л.¹, Кубанов А.А.², Комягина Т.М.², Дерябин Д.Г.²

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

²ГНЦ дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, Москва
Ilya9622@gmail.com

Целью работы являлось генотипирование современных российских клинических изолятов *N. gonorrhoeae* по протоколу NG-MAST (*Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence types), сравнительный филогенетический анализ *N. gonorrhoeae* в России, странах ЕС и Японии, а также анализ генетических детерминант устойчивости к цефалоспорином - основным препаратам для терапии гонококковой инфекции в России и в мире.

Всего исследовано 900 изолятов, собранных в РФ в период с 2013 по 2019 гг., Использовали также данные NG-MAST-типирования из баз данных "PathogenWatch" и "PubMLST" для более 1000 образцов из стран ЕС и 200 образцов из Японии. Изоляты РФ принадлежали к 301 различному сиквенс-типу, наиболее распространенными являлись 807, 228, 1993, 5714, 9476 (8,3%; 3,3%; 3,2%; 3,2%; 2,7% соответственно), для которых не было выявлено устойчивости к цефалоспорином. Кластерный анализ данных по доле изолятов с уникальными сиквенс-типами и численности населения стран ЕС и Японии показал существование двух кластеров: первый составили Россия и Япония, второй - европейские страны, что свидетельствует о тенденции в распределении уникальных сиквенс-типов - их доля тем выше, чем больше численность населения страны. Филогенетический анализ показал генетическую отдаленность наиболее распространенных российских, европейских и японских сиквенс-типов, что указывает на локальный характер формирования и эволюции популяции *N. gonorrhoeae* в России. Анализ взаимосвязей между типами аллелей гена *penA* (маркеров устойчивости к цефалоспорином) и NG-MAST подтвердил, что горизонтальный перенос генов - частое событие в популяции *N. gonorrhoeae*. Несмотря на то, что *N. gonorrhoeae* не является мономорфным патогеном, значительная доля сиквенс-типов сохраняется из года в год, что свидетельствует о значительном вкладе клонального размножения в структуру популяции возбудителя гонококковой инфекции.

9.15. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ТЕРАПИИ HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Колесникова О.А.^{1,2}, Шипунова В.О.^{1,3,4}, Соловьев В.Д.^{1,4}, Деев С.М.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

⁴Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва
olya325@gmail.com

HER2 рецептор, относящийся к семейству рецепторных тирозинкиназ, регулирует активацию различных клеточных программ. Амплификация HER2 рецептора приводит к развитию злокачественных новообразований. Для HER2-положительных опухолей характерен высокий уровень метастазирования, что делает их лечение сложно доступным. Высокая биосовместимость, магнитные свойства, а также возможность модифицировать поверхность наночастиц магнетита позволяют использовать их в качестве агентов онкотерапии HER2-положительных опухолей.

Целью данной работы является получение наночастиц магнетита для терапии HER2-положительных опухолей с использованием низкочастотного магнитного поля. Нами были синтезированы наночастицы магнетита, модифицированные анти-HER2 антителом, трастузумабом. Для визуализации частиц *in vitro* HER2-распознающие наночастицы были мечены флуоресцентным красителем Cy5.5. Методом проточной цитометрии было показано, что флуоресцентные наночастицы высокоселективно связываются с HER2- сверхэкспрессирующими раковыми клетками BT474 в отличие от контрольной линии СНО. Для увеличения эффективности проникновения наночастиц в клетку, флуоресцентные наночастицы магнетита дополнительно модифицировали TAT-пептидом в комбинации с трастузумабом. Полученные наночастицы использовали для механоиндуцированного разрушения раковых клеток при облучении низкочастотным переменным магнитным полем. Было показано, что при облучении клеток, нагруженных наночастицами, происходит разрыв лизосомальной мембраны, приводящий к высвобождению содержимого лизосом в цитоплазму клетки.

Таким образом, нами были получены флуоресцентно меченные наночастицы магнетита, которые можно использовать для механоиндуцируемого уничтожения раковых клеток при облучении низкочастотным магнитным полем.

Исследование поддержано грантом РНФ, проект № 17-74-20146 (синтез наночастиц) и РФФИ №19-29-04012 (культивирование клеток млекопитающих, тесты по цитотоксичности).

9.16. ИММУНОСУПРЕССИЯ У ВРАЧЕЙ, РАБОТАЮЩИХ С БОЛЬНЫМИ COVID-19

Коновалова М.В.¹, Пырегов А.В.², Полтавцева Р.А.², Свищевская Е.В.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова МЗ РФ, Москва
mariya.v.konovalova@gmail.com

Современная коронавирусная инфекция COVID-19 характеризуется тяжелым течением и высокой контагиозностью. Несмотря на все меры предосторожности, врачи, работающие с больными COVID-19, получают значительную вирусную нагрузку. Целью данной работы был анализ цитокинового статуса врачей, работающих с больными COVID-19 (n=33), и здоровых доноров (n=31).

Анализ концентрации 41 гуморального фактора, проведенный в сыворотке крови доноров с помощью цитометрического набора Milliplex, показал наличие трех групп белков, различающихся по концентрации: факторы с концентрацией от 200 до 15000 пг/мл (n=10); факторы с концентрацией от 10 до 100 пг/мл (n=6) и факторы с концентрацией от 0 до 10 пг/мл (n=15).

К первой группе относятся Eotaxin, GRO, MDC, PDGF-AA, sCD40L, IL-4, IP10, MCP-1, RANTES и VEGF. Все белки этой группы являются хемокинами, ростовыми или супрессорными факторами, контролирующими гомеостаз крови. У врачей достоверно снижался уровень GRO, sCD40L, IL-4, IP-10, MCP-1 и повышался уровень MDC и PDGF-AA. Белок PDGF-AA является стимулятором репарации сосудов.

Ко второй группе относятся G-CSF, IFN α 2, IL-1RA, IL-1 α , TNF- α , MCP-3, EGF и FGF-2. Факторы этой группы можно отнести к первой линии защиты против инфекции. Из них снижался уровень ростовых факторов G-CSF, EGF и FGF-2, по-видимому, также из-за расхода на репарацию сосудов.

Наконец, к факторам третьей группы относятся, в основном, белки острой фазы - цитокины: GM-CSF, IFN- γ , IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-13, IL-15, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, FLT-3L, TNF- β , MIP-1 α и MIP-1 β . Повышение, в частности, уровня IL-6 выявляют у больных COVID-19. У врачей, работающих с такими больными, уровень в сыворотке крови факторов острой фазы находился в норме.

Таким образом, показано, что иммунная система врачей находится в активированном состоянии на уровне регуляции восстановления сосудистого русла, повреждаемого вирусной нагрузкой, и не достигает острой фазы.

9.17. АНАЛИЗ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ ПЕПТИДНОГО ПАТТЕРНА СЫВОРОТКИ/ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ПОИСКА ПЕПТИДНЫХ БИОМАРКЕРОВ

Кузьмина Е.О., Арапиди Г.П.

ФНКИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва
firsteugenia@yandex.ru

Для успешного лечения онкологических заболеваний важна их ранняя диагностика.

Исследования крови часто применяются в качестве малоинвазивного метода диагностики, поскольку кровь является соединительной тканью организма.

Обнаруживаемые в крови органические молекулы, в частности белки и пептиды, активно исследуются для поиска новых биомаркеров. Для эффективного обнаружения биомаркеров необходимо иметь представление о пептидном составе крови в норме. Вариабельность обнаруживаемого пептидного состава крови является важной характеристикой как самого биологического объекта, так и метода анализа.

Ранее нами был разработан метод пептидного анализа биологических жидкостей организма, в том числе сыворотки и плазмы крови, основанный на высокоэффективной хромато-масс-спектрометрической идентификации пептидов. Для анализа воспроизводимости пептидного паттерна сыворотки/плазмы крови, получаемого при помощи разработанного нами метода, мы проанализировали 12 образцов (6 плазмы и 6 сыворотки крови), в двух повторах. Согласно разработанному нами протоколу, пептиды в наших образцах были десорбированы с поверхности мажорных белков с использованием хаотропного агента, гуанидин гидрохлорида. Далее была проведена ультрафильтрация образцов на картриджах с пропускной способностью 10 кДа, для очистки от высокомолекулярных соединений (в основном белков). Последующее обессоливание при помощи обращенно-фазовой хроматографии на колонках Discovery DSC-18 было необходимо для подготовки образцов к масс-спектрометрическому анализу.

Масс-спектрометрический анализ на приборе Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole Orbitrap позволил идентифицировать в среднем в каждом образце около 3 000 пептидов. В результате исследования мы показали высокую воспроизводимость метода выделения пептидов из сыворотки и плазмы крови. Между любыми двумя повторами воспроизводимость была не менее 70%. Средняя воспроизводимость составляла около 80%.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-15-00400.

9.18. ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КАПСУЛЫ ДЛЯ АКТИВНОЙ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Курбанова Л.А.¹, Гилева А.М.¹, Яголович А.В.¹, Смирнов И.В.¹, Трушина Д.Б.², Марквичева Е.А.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²ФНИЦ Кристаллографии и фотоники РАН, Москва
leyli.kurbanova_1997@mail.ru

Полиэлектролитные мультислойные капсулы (ПМК), полученные методом послойной адсорбции (LbL) противоположно заряженных сульфата декстрана (DS) и поли-L-аргинина (Parg) на поверхности сферических частиц карбоната кальция, являются перспективными носителями противоопухолевых лекарств. Они могут быть использованы как для пассивной, так и для активной адресной доставки. Мутантный вариант цитокина TRAIL DR5-B, селективно связывающийся с рецептором смерти DR5 и запускающий апоптоз опухолевых клеток, является перспективным для лиганд-нацеленной активной доставки.

Целью настоящей работы было получение ПМК, модифицированных TRAIL DR5-B (ПМК/ TRAIL DR5-B), исследование эффективности их накопления и локализации в опухолевых клетках, а также изучение цитотоксичности в 2D и 3D моделях *in vitro*.

В работе были получены ПМК/TRAIL DR5-B, оболочка которых состоит из 3 бислоев полиэлектролитного комплекса (DS/Parg), со средним диаметром 300 и 500 нм. Локализацию всех образцов ПМК в клетках исследовали с помощью конфокальной лазерной микроскопии, а эффективность накопления методом проточной цитофлуориметрии. Показано, что ПМК/TRAIL DR5-B накапливались в клетках быстрее, чем немодифицированные ПМК (без TRAIL DR5-B) и свободный TRAIL DR5-B. Так, после 2 ч инкубации эффективность интернализации ПМК/TRAIL DR5-B клетками была выше в 1,3 и 2,6 раза, чем немодифицированных ПМК и свободного TRAIL DR5-B, соответственно. Цитотоксичность ПМК/TRAIL DR5-B, немодифицированных ПМК, а также свободного TRAIL DR5-B была изучена на TRAIL-чувствительной клеточной линии колоректальной карциномы человека HCT116 с помощью МТТ-теста в 2D (монослойная культура) и 3D (опухолевые сфероиды) моделях. Показатель IC₅₀ для ПМК/TRAIL DR5-B в 2D модели был на порядок ниже такового для 3D модели и составил 70 и 600 нг/мл, соответственно.

Таким образом, было показано, что ПМК, модифицированные TRAIL DR5-B, перспективны для загрузки противораковыми лекарствами с целью их активной адресной доставки в клетки.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты №№ 18-04-01087, 18-53-34007).

9.19. РОЛЬ СТАТУСА p53 В ОТВЕТЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ИОНИЗИРУЮЩЕЕ ИЗЛУЧЕНИЕ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ CDK8/19

Кучур О.А.¹, Штиль А.А.^{1,2}

¹Университет ИТМО, химико-биологический кластер, Санкт-Петербург

²Институт биологии гена РАН, Москва

kuchur@scamt-itmo.ru

Лучевая терапия гамма-фотонами - один из наиболее эффективных методов борьбы со злокачественными опухолями. Однако, в ответ на ионизирующее излучение в опухолевых клетках активируются механизмы выживания, что снижает эффективность лечения и повышает вероятность прогрессии заболевания. В возникновении данного феномена одну из ключевых ролей играют пути, регулируемые супрессором опухолей p53.

Наш проект посвящён изучению влияния белка p53 на выживание опухолевых клеток человека при облучении терапевтическими дозами гамма-фотонов и установлению механизмов преодоления этого клинически неблагоприятного фенотипа при селективном ингибировании перепрограммирования транскрипции через киназы CDK8/19.

Нами был изучен статус белка p53 в клетках аденокарциномы кишечника человека HCT116 и её сублинии с нокаутированным p53 - HCT116p53KO. Установлено, что экспрессия p53 дозозависима от облучения, при этом клетки HCT116p53KO после воздействия гамма-лучами от 1 до 4 Гр погибают, а в клетках с нормально функционирующим p53 происходит арест в фазе G2/M, что способствует выживанию. Кроме того, мРНК p53 и соответствующий белок накапливался в клетках HCT116 с 1 по 10 дни после облучения 2 Гр; одновременно с этим наблюдалось увеличение белка p21 в дни 1-7, что было определено с помощью ПЦР в реальном времени и иммуноблоттинга.

Для повышения радиочувствительности клеток HCT116 (p53^{+/+}) исследовано фармакологическое ингибирование протеинкиназ CDK8/19 - регуляторов перепрограммирования геной транскрипции в ответ на стресс. Нетоксичный селективный блокатор CDK8/19 Сенексин В (0,5-1 мкМ) в комбинации с облучением (2-4 Гр) повышал долю гибнущих клеток с нормально функционирующим p53, однако не оказывал эффекта на клетки HCT116p53KO. Механизм синергического эффекта активации p53 и ингибирования CDK8/19 - предмет дальнейших исследований.

Последующие эксперименты будут направлены на анализ роли p53 в выживании клеток после облучения и определение возможностей усиления гибели опухолей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90046.

9.20. НОВЫЕ ПОЛИФАРМАКОФОРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ К ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИМ НЕЙРОНАМ

Лаврова А.В., Акимов М.Г., Фомина-Агеева Е.В., Грецкая Н.М., Безуглов В.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
alinalavrova1@gmail.com

Характерные для болезни Паркинсона симптомы являются результатом гибели дофаминергических нейронов и, вследствие этого, истощения дофамина в синапсах. Этиология и конкретный механизм дегенерации дофаминергических нейронов пока неизвестны. Установлено, что сложный дегенеративный каскад обусловлен окислительным стрессом. Важное место в защите клеток от окислительного стресса занимает эндогенная антиоксидантная система Nrf2/Keap1. Очевидно, что терапия болезни Паркинсона должна включать не только препараты, повышающие уровень дофамина, но и противовоспалительные и антиоксидантные средства. Таким образом, успешное создание новых антипаркинсонических средств возможно при сочетании нескольких фармакофоров, направленных на одновременную активацию разных мишеней.

Цель данной работы - разработка многофункциональных соединений для направленной доставки с потенциальной лекарственной активностью для терапии болезни Паркинсона. Синтезированные соединения содержат в своей структуре адресную часть, обеспечивающую направленную доставку к дофаминергическим нейронам, а также низкомолекулярные или полипептидные фрагменты, проявляющие антиоксидантный и противовоспалительный эффекты. Адресная часть синтезированных соединений представлена модифицированной структурой ингибитора обратного захвата дофамина GBR12909, который является высокоаффинным и селективным к пресинаптическому белку-транспортёру дофамина. На дистальном конце молекула модифицированного аналога GBR12909 несёт аминокислотную группу, пригодную как для присоединения полифункционального линкера, так и для непосредственного присоединения дополнительных фармакофоров. Присоединением по аминокислотной группе аналога GBR12909 были синтезированы амиды моноэтилового эфира фумаровой кислоты и 2-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)уксусной кислоты. Моноэтиловый эфир фумаровой кислоты является активатором антиоксидантной системы клетки Nrf2/Keap1, в то время как 2-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)уксусная кислота - ловушка свободных кислородных радикалов. Также синтезирован аналог GBR12909 с представителем группы нестероидных противовоспалительных средств - сулиндаком. Для получения мультифункционального соединения по аминокислотной группе модифицированного аналога GBR12909 присоединяли N α -Boc-N ϵ -Fmoc-защищённый L-лизин, что позволит в будущем постадийно синтезировать конструкцию, несущую одновременно либо два антиоксидантных, либо антиоксидантный и противовоспалительный фармакофоры.

9.21. ОЦЕНКА ВИТАМИННОГО СТАТУСА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДАМИ ЯМР-МЕТАБОЛОМИКИ

Ларичева Д.И.^{1,2}, Марьясина С.С.¹, Вараева Ю.Р.³, Стародубова А.В.³,
Польшаков В.И.¹

¹Лаборатория магнитной томографии и спектроскопии МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

³ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва
laricheva.dar@yandex.ru

Изучение витаминного статуса методами метаболомики открывает новые возможности в персонализированном подходе к лечению различных заболеваний. В данном исследовании планируется разработать методику, основанную на спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), которая позволила бы в дальнейшем давать обоснованные рекомендации по приему витаминов.

Метаболомика - наука о качественном и количественном анализе низкомолекулярных метаболитов в биологических жидкостях и тканях. Определение метаболомного профиля предоставляет важную информацию для точного описания физиологического состояния организма. Существует два наиболее распространенных метода для метаболомных исследований: высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия). Метод ЯМР-спектроскопии обеспечивает высокую воспроизводимость, требует недорогую и легкую пробоподготовку, но в то же время чувствительность этого метода довольно низкая. ВЭЖХ-МС является гораздо более чувствительным методом по отношению к ЯМР-спектроскопии, но он ограничивается более низкой воспроизводимостью и требует более сложной обработки образца.

Целью данного исследования является разработка методики идентификации маркеров витаминного статуса человека по результатам анализа спектров ЯМР биологических жидкостей. Дизайн эксперимента предполагает обследование шести групп здоровых людей, подвергаемых витаминной терапии с использованием пяти витаминов (В₁, В₆, В₉, В₁₂ и С). Измерения ЯМР-спектров проводили для образцов мочи, сыворотки и плазмы крови по 3 раза для каждого человека: до начала курса витаминотерапии, спустя 2 недели приёма витаминов и через 2 недели после прекращения курса.

В настоящее время проводится идентификация и количественная оценка метаболитов, а также статистический анализ экспериментальных данных. Полученные результаты позволят получать информацию о витаминной избыточности или недостаточности.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00115).

9.22. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ФУНГИЦИДА ТИРАМА

Максимова В.П.¹, Усалка О.Г.^{1,2}, Попова В.Г.³, Якубовская М.Г.¹, Кирсанов К.И.¹

¹НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва

³Московский политехнический университет, Москва.

lavarvar@gmail.com

Введение. Действие различных экзогенных ксенобиотиков на человека может приводить к наследуемым эпигенетическим изменениям, которые в свою очередь могут привести к неопластической трансформации и развитию опухоли. Ключевую роль в реализации эффектов внешних факторов на человека играют гистоновые модификации и метилирование ДНК. Ранее нами были получены данные о способности фунгицида тирама реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированного гена GFP в тест-системе HeLa T1. Целью данного исследования было изучение влияния эпигенетически активного фунгицида тирама на метилирование и ацетилирование гистонов H3 и H4, на метилирование ДНК, а также на активацию транскрипции онкогенов и генов онкосупрессоров.

Материалы и методы. Для анализа изменения уровня модификаций гистонов H3 и H4 и экспрессии белка HDAC1 использовали Вестерн-блоттинг. Изменение уровня интегрального метилирования ДНК изучали с помощью рестрикционного анализа MspI/HpaII и метилчувствительного ИФА. Анализ эффектов фунгицида на экспрессию онкогенов и генов онкосупрессоров оценивали с помощью набора RT² Profiler PCR Array (PAHS-502Z), представляющим собой панель из 84 пар праймеров.

Результаты. В ходе исследования было показано, что при действии тирама происходит увеличение глобального ацетилирования гистона H3 (модификация, характерная для активно-транскрибируемого хроматина) в 1,5 раза, что сопровождается значительным снижением количества белка гистоновой деацетилазы HDAC1 (в 3,2 раза). После обработки клеток фунгицидом изменения уровня метилирования сайтов H3K9me3, H4K20me3, H3K4me3 не наблюдалось. Также было показано отсутствие каких-либо эффектов тирама на метилирование ДНК. При действии исследуемого агента было зарегистрировано изменение уровней экспрессии для 4 онкогенов панели из 84. Было показано, что при действии тирама происходит более чем двукратное снижение экспрессии генов *ROS1* и *MOS*, кодирующих протоонкогенные тирозиновые протеинкиназы, и снижение экспрессии гена провоспалительного медиатора TNF α . Также было зарегистрировано увеличение количества мРНК онкогенного транскрипционного фактора JUN в 3,1 раза.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-75-00115.

9.23. РОЛЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В РАЗВИТИИ ЭНДОМЕТРИОЗА ЯИЧНИКОВ

Мамедова А.Э.², Леваков С.А.², Азадова Г.Я.², Павлюков М.С.¹, Маслякова М.И.¹, Чекова М.Д.¹, Шахпаронов М.И.¹, Антипова Н.В.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва
venesuela93@gmail.com

Эндометриоз - патологический процесс, характеризующийся разрастанием ткани, родственной эндометрию, вне пределов слизистой оболочки матки. Заболевание поражает от 10 до 15% всех женщин. Эндометриоз яичников часто приводит к нарушению репродуктивной функции, распространению патологического процесса, малигнизации. Длинные некодирующие РНК (lncRNAs) являются большой группой некодирующих РНК длиной более 200 нуклеотидов. lncRNAs как факторы регуляции, играют важную роль в сложных клеточных процессах, таких как апоптоз, рост, дифференцировка, пролиферация и т.д. По сравнению с традиционными биомаркерами, такими как белки, циркулирующие lncRNAs имеют ряд преимуществ, которые позволяют их рассмотреть в качестве новых потенциальных биомаркеров при различных заболеваниях.

Целью данного исследования является оценка уровня экспрессии lncRNAs в биоптатах яичников, пораженных эндометриозом по сравнению с интактными образцами.

Мы исследовали уровень экспрессии длинных некодирующих РНК lincROR и lincSURV в биоптатах ткани яичников, пораженной эндометриозом. Образцы взяты от пациенток репродуктивного возраста и разделены на 2 группы: с эндометриозом яичников и без. Последовательно из образцов выделены РНК, методом обратной транскрипции получены кДНК. С помощью специфических праймеров относительно экспрессии длинных некодирующих РНК выявлено статистически достоверное понижение уровня РНК lincROR и lincSURV в патологических образцах.

На основании полученных в нашем исследовании данных можно сделать вывод о том, что уникальные lncRNAs lincROR и lincSURV могут быть использованы в качестве диагностических маркеров эндометриоза яичников. Измерение уровня экспрессии lncRNAs может предсказать развитие эндометриоз-ассоциированного рака яичников.

Дальнейшие исследования в данной области необходимы для более глубокого изучения проблемы и поиска способа выделения lncRNAs малоинвазивным путем из биологических жидкостей организма.

9.24. СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ ГЛЮКАГОН-ПОДОБНОГО ПЕПТИДА 1 ЛИРАГЛУТИД УЛУЧШАЕТ ИНСУЛИНОВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АДИПОЦИТОВ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ 3T3-L1 И ВЛИЯЕТ НА КИНЕТИКУ МИТОГЕННОЙ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ КИНАЗ

Мамонтова Е.Д.^{1,2}, Мичурина С.С.², Подкуйченко Н.В.², Соркина Е.³, Стафеев Ю.С.², Меньшиков М.Ю.², Шестакова М.³, Парфенова Е.В.²

¹Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва

²НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва

³НМИЦ эндокринологии МЗ РФ, Москва
elizaveta.m3@mail.ru

В настоящее время одним из наиболее перспективных медикаментозных способов терапии сахарного диабета 2 типа (СД2Т) является использование агонистов рецептора глюкагон-подобного пептида 1 (ГПП-1), таких как лираглутид. Основное действие лираглутида сопряжено с секрецией инсулина поджелудочной железой, однако локальный эффект лираглутида на другие инсулин-зависимые ткани, такие как жировая ткань, остается неизвестным. Целью данной работы стало изучение локального эффекта лираглутида на инсулиновую чувствительность и воспалительный статус адипоцитов, полученных из клеточной линии 3T3-L1. Преадипоциты 3T3-L1 дифференцировали по стандартному протоколу. Активность инсулинового, митогенного и воспалительного сигнальных путей оценивали методом иммуноблоттинга с использованием фосфоспецифических антител. Для оценки инсулиновой чувствительности измеряли инсулин-индуцируемый захват глюкозы зрелыми адипоцитами 3T3-L1. В данной работе продемонстрировали, что лираглутид повышает экспрессию митогенной киназы ERK и понижает экспрессию воспалительной киназы JNK. В связи с полученными результатами было выдвинуто предположение о возможной активации аденилатциклазы и CREB-зависимой регуляции экспрессии генов под действием лираглутида. Для проверки данной гипотезы мы использовали ингибитор аденилатциклазы (SQ22536). Как мы и предполагали, в присутствии ингибитора данный эффект лираглутида нивелируется. Затем мы оценили действие лираглутида на инсулиновый сигналинг. Лираглутид усиливает экспрессию и активацию субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS1) и Akt, в присутствии ингибитора аденилатциклазы данный эффект не наблюдается. Лираглутид также усиливает инсулин-стимулируемый захват глюкозы адипоцитами 3T3-L1 и повышает уровень экспрессии инсулин-зависимого транспортера глюкозы GLUT4, в присутствии ингибитора данные эффекты нивелируются. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможном локальном механизме действия лираглутида на адипоциты 3T3-L1 путем CREB-зависимой регуляции транскрипции.

9.25. БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЛИНКЕРЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИЛАМИНА ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ КАРБОНИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

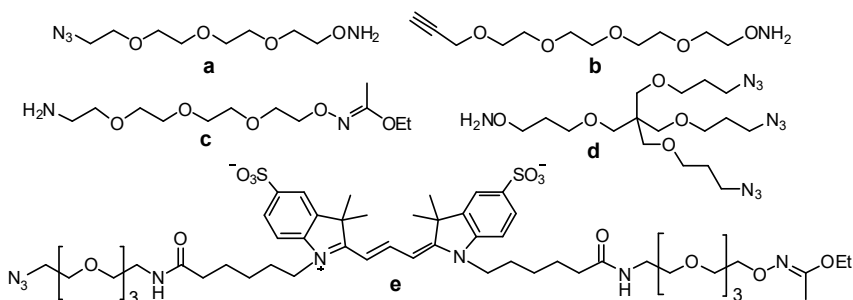
Мелешкина Е.Г.^{1,3}, Говтвань А.О.^{1,2}, Волков Т.М.^{1,3}, Брылёв В.А.¹,
Коришун В.А.¹, Сапоженникова К.А.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

³Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва
elisaveta.privalova@yandex.ru

O-Замещенные гидроксилламины находят применение для синтеза биоконъюгатов благодаря быстро и количественно протекающей реакции с карбонильной группой альдегидов и кетонов в водной среде и при физиологических значениях pH с образованием достаточно устойчивых оксимов [1]. Реакция конденсации полностью удовлетворяет критериям т.н. "клик-химии" и является удобным методом модификации биомолекул и биологически активных соединений. Среди N-защитных групп для синтеза O-замещенных гидроксилламинов представляет интерес этоксиэтилиденовая группа, устойчивая в щелочной и нейтральной среде, но легко удаляемая при подкислении [2]. С использованием этой защитной группы нами получены бифункциональные реагенты на основе тетраэтиленгликоля (**a**), содержащие свободный или защищенный оксамин. Из тетра-O-(3-гидроксипропил)пентаэритрита [3] получен полифункциональный реагент (**d**). Разработан синтез бифункциональных линкерных молекул, содержащих в своем составе флуоресцентный цианиновый краситель, например (**e**).



Подобные реагенты представляют интерес в первую очередь для получения конъюгатов лекарство-антитело (antibody-drug conjugates, ADC) [4] с контролируемой стехиометрией и несущих более одной молекулы фармакофора. Разветвленные линкеры перспективны для увеличения нагрузки терапевтических молекул на полноразмерный иммуноглобулин в ADC [5]. Присоединение оксиаминов осуществляется по окисленным

периодатом углеводным остаткам иммуноглобулинов, что позволяет сохранить аффинность к антигену и улучшить гомогенность конъюгатов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (проект № 20-15-00361); К.А.С. благодарит за поддержку РФФИ (проект № 20-34-90125 "Аспиранты"; синтез исходных соединений на основе пентаэритрита).

Литература:

1. D.K. Kölmel and E.T. Kool. Chem. Rev. 2017. 117. 10358-10376.
2. M.A. Khomutov et al. Amino Acids. 2010. 38. 509-517.
3. A.I. Ponomarenko et al. Tetrahedron. 2016. 72. 2386-2391.
4. K.C. Nicolaou and S. Rigol. Angew. Chem. Int. Ed. 2019 58 11206-11241.
5. Y. Anami et al. Org. Biomol. Chem. 2017. 15. 5635-5642.

9.26. ЗНАЧЕНИЕ *lincROR* И *lincSURV* В РАЗВИТИИ ДИСПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ

Обухова Е.А.², Павлюков М.С.¹, Шахпаронов М.И.¹, Леваков С.А.², Шешукова Н.А.², Антипова Н.В.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва
liza_obukhova@mail.ru

Дисплазия шейки матки - это патологический процесс, возникающий в эпителии шейки матки, морфологически проявляющийся ядерной атипией и утратой нормального строения эпителия без повреждения базальной мембраны и характеризующийся потенциально предраковой трансформацией. Известна роль длинных некодирующих РНК (*lncRNA*) в регуляции экспрессии генов и в патогенезе нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, гинекологических и онкологических заболеваний. *lncRNA* могут стать претендентами на идеальные ранние биомаркеры дисплазии и рака шейки матки. Мы исследовали уровень экспрессии *lincROR* и *lincSURV* в эпителии шейки матки при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и в норме. В исследовании принимали участие 24 пациентки в возрасте от 18 до 40 лет, которые были разделены на 3 группы на основании цитологического исследования: 1) пациентки с LSIL, 2) пациентки с HSIL, 3) группа контроля. Проведен анализ экспрессии *lincROR* и *lincSURV* методом Real-Time PCR с использованием специфичных праймеров. Пациенткам с цитологическими заключениями "LSIL" и "HSIL" проводилась биопсия шейки матки и гистологическая верификация диагноза. Результаты проведенного нами исследования продемонстрировали повышенную экспрессию *lincROR* и *lincSURV* при дисплазии шейки матки относительно нормы. При дисплазии имеет место активация *lincROR* и *lincSURV*: при LSIL уровень экспрессии *lincROR* был повышен в 3,8 раз у 90%, а уровень *lincSURV* в 8 раз у 83% пациенток соответственно, при HSIL в 81% уровень экспрессии *lincROR* был повышен в 7,5 раз и *lincSURV* в 7 раз относительно нормы ($p < 0,05$, непараметрический критерий Манна-Уитни).

Уровень экспрессии *lincROR* и *lincSURV* повышается при любом варианте интраэпителиальных поражений шейки матки, при этом уровень повышения экспрессии гена *lincROR* четко коррелирует со степенью тяжести SIL. Таким образом, *lincROR* и *lincSURV* могут стать новыми перспективными прогностическими маркерами диагностики дисплазии шейки матки и перехода цервикальной интраэпителиальной неоплазии в рак, что позволит повысить качество ранней диагностики предраковых заболеваний и рака шейки матки и оптимизировать дифференцированную лечебную тактику.

9.27. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОННОЙ ПЛОТНОСТИ В МИЦЕЛЛАХ НА ОСНОВЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ СО СПЕЙСЕРНОЙ ГРУППОЙ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

Приходько А.Т.¹, Шестопалова М.С.¹, Залыгин А.В.^{1,2}, Олейников В.А.¹

¹Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский педагогический государственный университет, Москва
Aleksa_ko99@mail.ru

Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) - метод структурной диагностики, который позволяет исследовать объекты различной физической природы и агрегатного состояния в нативных условиях, в том числе биологические и полимерные макромолекулы в растворе.

Методы интерпретации данных МУРР и созданное для них программное обеспечение позволяют извлекать из спектра интенсивности геометрические и весовые характеристики рассеивающих объектов, называемые инвариантами, а также восстанавливать качественную картину распределения электронной плотности. Однако качественная картина не даёт полной информации о структуре объекта.

В данной работе для осуществления количественной оценки предлагается метод контрастирования, характеризующийся добавлением "электронно-плотных" веществ в растворитель. Эффективная рассеивающая способность вещества определяется разницей (контрастом) между средней электронной плотностью пространства ρ_s , в котором находится рассеивающая частица, и электронной плотностью самой частицы $\Delta\rho = \rho - \rho_s$. Таким образом, при изменении электронной плотности растворителя ρ_s , будет изменяться итоговая картина распределения электронной плотности исследуемого объекта.

В качестве объекта изучения были выбраны мицеллы, образованные биотиновым конструктором biot-CMG(2)-Ad-DOPE. Будучи амфифильной молекулой, имеющей гидрофобную и гидрофильную части, биотиновый конструктор в жидких средах склонен к самосборке, образует мицеллообразные структуры, которые потенциально возможно использовать в медицине. Поэтому изучение их свойств и структуры является крайне актуальной и важной задачей, однако, по причине малых размеров (12 нм в диаметре), исследование их структуры вызывает большие сложности.

Малоугловой эксперимент проводился для биотинового конструктора в чистом фосфатном буфере (PB) и в PB с добавлением различных массовых концентраций глюкозы: от 92,7 мг/мл до 321,9 мг/мл. Для каждого образца были получены 3D структуры распределения электронной плотности, которые были сопоставлены с рассчитанными электронными плотностями каждого буфера. Повышение электронной плотности буфера привело к выделению наиболее "электронно-плотных" участков образца и исчезновению тех участков, чья электронная плотность оказалась меньше или равной плотности буфера. Наложение структур показало, что наиболее "электронно-плотные" участки образца, соответствующие электронной плотности буфера, равной 353,8 е/нм³, располагаются на поверхности мицеллы, а наименее "электронно-плотные", соответствующие электронной плотности буфера, равной 334,4 е/нм³, - в центре.

Полученный результат подтвердил действенность метода контрастирования для осуществления количественной оценки распределений электронных плотностей, восстановленных по данным МУРР.

9.28. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТРИХИНЕЛЛЕЗНОЙ ИНВАЗИИ НА СЕЛЕЗЕНКУ

Родыгин Д.А., Погудина Д.К., Ершова М.И.

Кировский государственный медицинский университет, Киров
rodygin.dmit@yandex.ru

Одним из важнейших периферических органов иммунной системы является селезенка. Лимфоциты белой пульпы селезенки реагируют на патогены - бактерии или вирусы, которые попадают в селезенку с кровью, образуются иммуноглобулины - специальные антителами против патогенов. Во время иммунного ответа на различные антигены происходит связывание специфического для В-лимфоцитов иммуноглобулинового рецептора и бласттрансформация. Цель данного исследования - изучить реакцию селезенки иммунизированных животных на трихинеллезную инвазию - опасный паразитоз человека и животных, вызываемый гельминтами рода *Trichinella*, который протекает остро и хронически, также при трихинеллезе паразит очень длительное время находится в организме хозяина. При экспериментальном пероральном заражении 20 мышей трихинеллами в дозе 40 личинок на животное перорально, из которых 10-ти предварительно внутримышечно ввели антиген трихинелл, приготовленный по методу Магат (1986) в дозе 0,1 мг, наблюдения продолжали 2 месяца, 10 мышей составили контрольную группу, после чего животных выводили из опыта, согласно Хельсинской Декларации. У мышей при дозе 40 личинок заболевание протекает бессимптомно. Однако, имеются значительные сдвиги в показателях иммуно-нейро-эндокринной системы. При гистологическом и морфометрическом исследовании селезенки, окрашенной гематоксилин-эозином установлено, что все процессы усиливаются и увеличивается площадь паренхимы у зараженных животных. Краевая зона лимфатических узелков является местом формирования иммунного ответа, в котором происходят кооперативные взаимодействия Т-, В-лимфоцитов и макрофагов, через нее в белую пульпу постоянно поступают экскреторно-секреторные и соматические антигены трихинелл, в связи с чем число митозов увеличилось в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой. В периартериальной зоне лимфатических узелков и периартериальных лимфоидных муфтах также отмечается увеличение численности больших лимфоцитов, лимфобластов, плазмочитов и макрофагов, причем в группе животных, которым вводился антиген, то их количество преобладало не только над контролем, но и над морфометрическими показателями у инвазированных животных. Полученные результаты свидетельствуют о высокой степени реактивности селезенки в ответ на заражение личинками трихинелл, что проявляется изменением клеточного состава белой пульпы по сравнению с селезенкой контрольных животных.

9.29. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОБИОТИКОТЕРАПИИ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Руденко Г.П.¹, Руденко П.А.², Руденко В.Б.², Руденко А.А.³

¹МБОУ СОШ №3, Пушкино

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

³Московский государственный университет пищевых производств, Москва
pavelrudenko76@yandex.ru

На протяжении всей истории медицины хирургическая инфекция является основным препятствием для развития и расширения диапазона хирургических вмешательств. Несмотря на успехи в борьбе с гнойно-воспалительными процессами, инфекция в хирургии остается сложной и актуальной проблемой. Микробное загрязнение при воспалительных процессах обусловлено распространением хирургической инфекции, появлением новых антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов, изменением их биологических свойств, осложнением ран, а также высоким уровнем иммунодепрессии, вызванным различными факторами [1-5].

Материалы и методы. Для оценки эффективности пробиотико-сорбционных препаратов, животных методом конвертов разделили на четыре группы - 1 опытную (A_1 , $n=16$), 2 опытную (A_2 , $n=16$), 3 опытную (A_3 , $n=21$) и контрольную (группу сравнения, A_0 , $n=11$).

Результаты. Использование пробиотико-сорбционных препаратов при лечении кошек с гнойными ранами существенно ускоряет их заживление. Так, средний срок очищения ран и формирования грануляций у животных группы (A_3) отмечали в 3,6 раза быстрее, чем у кошек контрольной группы ($p<0,001$). Это обуславливало скорейшее начало роста по периферии ран эпителиальной каймы, возникающее в 3,1 раза быстрее у кошек 3 группы, по сравнению с животными группы A_0 ($p<0,001$). Полное заживление ран наступало в A_1 , A_2 и A_3 группах животных в 1,6, 1,9 и 2,3 раза соответственно быстрее, чем у кошек группы контроля ($p<0,001$).

Литература:

1. Руденко П.А. Роль дисбактериоза кишечника в механизмах формирования и прогрессирования хирургической инфекции у кошек // Научная жизнь. - 2018. - 1. - С. 84-98.
2. Руденко П.А. Цитологическая характеристика случайных гнойных ран у кошек в динамике их лечения // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2016. - 3(35). - С. 134-142.
3. Rudenko P., Vatikov Yu., Kulikov E. [et al.] Experimental and clinical justification of the use of probiotic-sorption drugs in veterinary surgery // Sys. Rev. Pharm. - 2020. - 11(4). - P. 275-287.
4. Руденко П.А. Интенсивность перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы кошек при гнойно-воспалительных процессах // Ветеринария. - 2016. - 10. - С. 45-48.
5. Руденко П.А., Мурашев А.Н. Технологический процесс производства комплексных пробиотико-сорбционных препаратов "Дилаксил" и "Сорбелакт" // Биофармацевтический журнал. - 2017. - 9(6). - С. 40-45.

9.30. ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ NGS

Сай А.В.¹, Мацвай А.Д.¹, Киселев Д.А.^{1,3}, Гордукова М.А.², Хахина А.О.¹, Михайлов И.М.¹, Шипулин Г.А.¹

¹ЦСП ФМБА России, Москва

²ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского ДЗ, Москва

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва

ASay@cspmrz.ru

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, на сегодняшний день и по прогнозу на 2060 год основной причиной смертности населения являются инфекционные заболевания. Для эффективной терапии необходима своевременная, быстрая и качественная диагностика. Системы, основанные на метабаркодировании ДНК, имеют ряд преимуществ перед классическими методами диагностики инфекционных заболеваний, применяемыми в клинике, и позволяют выявлять как известные, так и ранее неизученные патогенные микроорганизмы.

Нами были исследованы ликворы от педиатрических пациентов с инфекционными заболеваниями, этиология которых после клинического лабораторного скрининга на распространенных возбудителей соответствующих заболеваний осталась неустановленной. В исследуемых образцах с использованием 16S-метабаркодирования ДНК были обнаружены патогены следующих таксономических групп: *Sphingomonas* (13%), *Pseudomonas* (11%), *Acinetobacter* (10%), *Staphylococcus* (7%), *Fusobacterium* (3%), *Enterococcus* (3%), *Leuconostoc* (3%), *Streptococcus* (3%), *Caulobacter* (3%). В единичных образцах нами были обнаружены бактерии родов *Halomonas*, *Lactobacillus*, *Dolosigranulum*, *Haemophilus*, *Micrococcus*, *Herbaspirillum*, *Mycobacterium*, *Leptothrix*, *Bacteroides*, *Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Brochothrix*, *Prevotella* 7, *Brevundimonas*, *Schlesneria*, *Corynebacterium* 1, *Gallicola*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderi*. Некоторые из них (*Brochothrix*, *Schlesneria*, *Stenotrophomonas* и вида *Gallicola barnesae*) относятся к крайне редким возбудителям инфекционных заболеваний или не отнесены к классам патогенных или условно патогенных бактерий, и нами впервые обнаружены в клиническом материале от инфекционных больных. В дальнейшем необходимо провести дополнительные исследования данных образцов для подтверждения полученных результатов.

Таким образом, применяемый нами метод метабаркодирования ДНК с последующим высокопроизводительным секвенированием позволяет расширить диагностические возможности используемых тест систем в клинике.

9.31. ЦИТОКИНОВЫЙ ШТОРМ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

Сергеев А.А.¹, Коновалова М.В.¹, Константинова Е.В.², Богданова А.А.²,
Свирицевская Е.В.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Первая Градская больница им. Н.И. Пирогова, Москва
antonisergeev@mail.ru

Цереброваскулярные заболевания, в частности, ишемический инсульт (ИИ) и инфаркт миокарда (ИМ), остаются главными причинами смертности и инвалидизации взрослого населения. Показано, что при атеросклерозе в сыворотке крови повышается уровень интерлейкина (IL) 6 и фактора некроза опухоли TNF-α, что может свидетельствовать о наличии цитокинового шторма. Задачей настоящего исследования являлся анализ широкой панели цитокинов и хемокинов в сыворотке крови больных ИИ (n=4), ИМ (n=12), атеросклерозом сосудов (n=7) и здоровых доноров (n=31).

Анализ концентрации 41 гуморального фактора, проведенный в сыворотке крови доноров с помощью цитометрического набора Milliplex, показал наличие трех групп, различающихся по концентрации: факторы с концентрацией от 150 до 22000 пг/мл (n=12); факторы с концентрацией от 10 до 100 пг/мл (n=6) и факторы с концентрацией от 0 до 10 пг/мл (n=15). К первой группе относятся EGF, FGF-2, Eotaxin, GRO, MDC, PDGF-AA, sCD40L, IL-4, IP10, MCP-1, RANTES и VEGF. Все факторы этой группы являются хемокинами или ростовыми факторами, за исключением супрессорного IP10. Уровень 6 из этих факторов повышался в сыворотке крови больных в среднем в 2,3 раза по сравнению с сывороткой доноров. Ко второй группе относятся G-CSF, IFNα2, IL-1RA, IL-1α, TNF-α и MCP-3. Факторы этой группы можно охарактеризовать как сторожевые белки, способные запускать и контролировать (IL-1RA) воспалительный ответ при угрозе. Уровень всех этих факторов повышался в среднем в 3,5 раза у больных всех трех групп по сравнению с донорами. Различий между группами больных по факторам 1-ой и 2-ой групп не было.

Наконец, к факторам третьей группы относятся, в основном, белки острой фазы - цитокины: GM-CSF, IFN-γ, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-13, IL-15, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, FLT-3L, TNF-β, MIP-1α и MIP-1β. За исключением MIP-1β, уровень всех этих факторов повышался в сыворотке больных в среднем в 5,5 раз. Максимальное повышение наблюдали для IL-6, 2, 12 и IFN-γ в 14, 8, 8 и 7 раз соответственно. Только повышение уровня IL-6 и, в меньшей степени, IL-10 зависело от тяжести заболевания. Так в сыворотке доноров, при атеросклерозе, ИИ и ИМ уровни IL-6 были 2, 11, 21 и 52 пг/мл соответственно. Уровень TNF-α повышался только в 1,4 раза.

В целом, при атеросклерозе без ИМ и ИИ уже наблюдается цитокиновый шторм, сохраняющийся на сопоставимом уровне при ИМ и ИИ. Наиболее прогностическим значением тяжести заболевания является уровень IL-6.

9.32. БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПЛЕНКИ И МАКРОПОРИСТЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Толстова Т.В.¹, Мамедова А.Р.^{1,2}, Терехова В.В.^{1,2}, Тетерева Е.А.^{1,2}, Дроздова М.Г.¹, Демина Т.С.³, Сажнев Н.А.⁴, Черногорцева М.В.⁴, Кильдеева Н.Р.⁴, Марквичева Е.А.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

³Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва

⁴Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина, Москва
balabanovt88@gmail.com

Макропористые гидрогели на основе натуральных полисахаридов, таких как хитозан (Chit), являются перспективными матриксами для культивирования животных клеток. Так, Chit является биodeградируемым нецитотоксичным биополимером с высокой ранозаживляющей способностью, что определяет возможность его применения в области регенеративной медицины. В настоящее время широко исследуется влияние углеводсодержащих биополимеров на межклеточные взаимодействия, формирование многоклеточных систем и дифференцировку клеток, что важно при создании тканеинженерных конструкций. Однако, однокомпонентные гидрогели на основе хитозана имеют низкую механическую прочность [1]. Модификация хитозана по аминогруппам, позволяет получить многокомпонентные гидрогели с заданными структурой и свойствами и применять их для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Цель работы - получение полимерных матриц в виде пленок (2D) и макропористых гидрогелей (3D) на основе хитозана, изучение их структуры, физико-химических свойств, а также роста и дифференцировки клеток на/в них в модели *in vitro*. В работе использовали сополимеры Chit (ММ 60 кДа, СД 0.9) с олиго(L,L-/D,D-лактидами) (Chit-PLA), ММ 5кДа, а также композитные гидрогели на основе хитозана (ММ 320 кДа) и гиалуроновой кислоты с ММ 5 и 30 кДа (Chit-НА). Кроме того, были получены гидрогели на основе хитозана, в которые для улучшения механических свойств был добавлен белок шелка - фиброин. Соплимеры Chit-PLA получали методом твердофазного синтеза [2]. Гидрогели Chit с НА получали путем предварительной сшивки Chit дженипином (Gr) с последующим образованием полиэлектролитного комплекса Chit-НА (по объему/по поверхности гидрогеля). Структура гидрогелей была изучена методом конфокальной лазерной микроскопии. Показано, что гидрогели обладают взаимосвязанной системой макропор (ср. размер - 150-200 мкм, значительно превышающий ср. размер животных клеток и позволяющий применять матрицы для их культивирования). Исследование полученных из гидрогелей экстрактов показало, что матриксы не цитотоксичны (MTT-тест). Модифицированные матриксы обеспечивали хорошую адгезию (конфокальная микроскопия), а также рост и пролиферацию клеток мышинных фибробластов (L929) при культивировании в гидрогелях в течение 4-7 дней (MTT-тест). Гидрогели поддерживали пролиферацию клеток и их дифференцировку в остеонаправлении (активность щелочной фосфатазы) при длительном культивировании мезенхимальных стромальных клеток человека (МСК) из жировой ткани. Таким образом, гидрогели являются перспективными биоматериалами для регенеративной медицины.

Литература:

1. Dornish M., Kaplan D.S., Arepalli S.R. Regulatory status of chitosan and derivatives //Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: Delivery, targeting and polymer therapeutics. 2012. P.463-481.
2. Demina T.S. et al. Two-photon-induced microstereolithography of chitosan-g-oligolactides as a function of their stereochemical composition //Polymers. 2017. 9(7):302.

9.33. ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЦЕНТРАЦИОННОЙ ЗАВИСИМОСТИ МИЦЕЛЛ НЕОГЛИКОЛИПИДА А (TYPE 2) sp-Ad-DE МЕТОДОМ МУРР

Троицкая П.С., Шестопалова М.С., Залыгин А.В., Олейников В.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
poly.trinity.work@gmail.com

Одна из наиболее актуальных задач в разделе биосовместимых структур - получение мицеллярной структуры с низкой критической концентрацией мицеллообразования, стабильно сохраняющей свою форму и размер. В связи с этим был рассмотрен неогликолипид А(Type2)-sp-Ad-DE, который представляет собой синтетический аналог природных гликолипидов. Структурные исследования проводились методом малоуглового рентгеновского рассеяния.

В данной работе был измерен образец А(Type2)-sp-Ad-DE при изменяющейся концентрации в диапазоне от 0,6 до 3,35 мг/мл. Изучение биосовместимой структуры было направлено на определение способности этой структуры сохранять стабильную форму и размер при уменьшении концентрации. Функциональная часть молекулы (А Type2) представляет собой "липоидный антиген", содержащий сложные углеводы, несущие определенные группы крови А или В, не экстрагируемые водой непосредственно из ткани, в отличие от антигенов, связанных с муцинами. Цепь Type 2 в эритроцитах часто присутствует в виде полимерной формы N-ацетиллактозамина, связанной с мембранным белком. Антигены группы крови А наиболее широко экспрессируются в эпителиальных клетках энтодермы, где возникает большинство раковых заболеваний человека. Следовательно, изменения в этих группах крови или родственных антигенах составляют основные связанные с опухолями изменения гликозилирования, и многие из них приводят к образованию связанных с опухолью углеводных антигенов. Зная, что антигены группы крови локализованы в мембранах эритроцитов, изучение свойств и поведения А(type2)-sp-Ad-DE в изотонических растворах (аналогах крови человека) становится актуальной задачей для определения размера и формы мицелл при изменении концентрации.

Анализ кривых интенсивности, функций распределения по расстоянию и полученных на их основе 3D-моделей образца показал, что полученные мицеллы не меняют свои формы и размеры при изменяющейся концентрации, что делает их успешными кандидатами в области средств точечной доставки лекарств, в том числе противораковых антибиотиков.

9.34. ДЕЙСТВИЕ НА КОЛЛАГЕН ПРОТЕАЗ В ПРИСУТСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Тузова Е.С., Белов А.А.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
кафедра биотехнологии, Москва
ABelov2004@yandex.ru

Нативный коллаген не гидролизуеться обычными пептидгидролазами, основной фермент катаболизма коллагена - коллагеназа. Денатурированный коллаген (желатина) разрушается различными протеазами. Разрушение коллагена может происходить не только с помощью специфических ферментов, но при повышенной температуре и активными формами кислорода. В результате тепловой денатурации распад коллагена начинается в температурном промежутке при 45-65°C.

В настоящее время биомедицинская и косметическая промышленности как и у нас в стране, так и за рубежом, выпускают лечебные и косметические препараты, для лечения и профилактики гнойно-некротических заболеваний, содержащие ферменты (в основном - гидролазы, в частности протеазы). Использование различных вспомогательных веществ и биополимеров в разработанных препаратах способствует более быстрому и успешному проникновению терапевтических агентов (ТА) в кровоток и различные органы человека. Вполне возможно, что некоторые ТА могут вызвать временную (проходящую) денатурацию кожного покрова, в результате чего может происходить разъедание кожи используемыми ферментами. Используемые нами ферменты не действуют на неповрежденную кожу и живые клетки. Разрушению подвергается только денатурированные фрагменты.

Было исследовано действие различных протеаз: трипсин (Тр) КРС; бромелаин (Брм); химопсин (Хмп) КРС и протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба (ПК) на коллаген (ТУ 10П 453-70) в модельных условиях 37°C, фосфатный буферный раствор (ФБ) pH 6,2. Среди ТА были исследованы: биоцид мирамистин (Мир); хитозан (Хт); лидокаин (Лд) и их смеси. Было исследовано влияние времени нахождения коллагена (ТУ 10П 453-70) в растворе, при наличии или отсутствии ТА на его гидролиз протеазами. Следует обратить внимание на активность по коллагену, это не коллагенолитическая активность, а действие протеаз на частично денатурированный используемый коллаген. У некоторых из перечисленных ферментов была обнаружена эластолитическая активность (субстрат ВосAlaONp) и все ферменты имели активность по азоколлу. В отсутствие Хт в пределах погрешности эксперимента ТА не способствовали усилению разрушения коллагена. Несмотря на то, что Хт сшивает молекулы коллагена, он способствует разрушению последнего.

9.35. КОЛИЧЕСТВО НЕЗРЕЛЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК В АОРТЕ МЫШЕЙ УВЕЛИЧИВАЕТСЯ С ВОЗРАСТОМ

Филатова Ю.Г.¹, Савина А.Д.², Балацкая М.Н.², Попов В.С.², Калинина Н.И.², Балацкий А.В.²

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва

²Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
balatsky@fbm.msu.ru

Введение. Эффективные методы профилактики и воздействия на начальные этапы формирования атеросклеротической бляшки смогли бы предотвратить существенную часть сердечно-сосудистых заболеваний. Однако именно начальные этапы формирования атеросклеротических поражений исследованы меньше всего. Остаются невыясненными как триггеры, так и механизмы мозаичного развития атеросклеротических поражений. Недавно в стенках крупных артерий была идентифицирована популяция незрелых гладкомышечных клеток (ГМК), которые преимущественно располагаются в местах, наиболее подверженных развитию атеросклероза. Такие клетки характеризуются экспрессией мембранных рецепторов NG2 и CD146 и локализуются преимущественно в бифуркациях сосудов. В настоящей работе мы исследовали количество и распределение NG2⁺/CD146⁺ клеток в стенке аорт мышей разного возраста.

Методы. В работе использовали аорты мышей линии C57BL/6. Распределение незрелых ГМК исследовали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания замороженных срезов антителами к NG2 и CD146, с последующей конфокальной микроскопией. Долю NG2⁺/CD146⁺ клеток оценивали после лизиса аорт в растворе коллагеназы I с помощью проточной цитометрии.

Результаты. Мы обнаружили, что NG2⁺CD146⁺ ГМК локализованы в меди аорты и отходящих от неё сосудов. Оценка при помощи проточной цитометрии показала, что у мышей в возрасте 7 недель (n=6) медианная доля NG2⁺CD146⁺ клеток в аорте составляет 7,4%, 18 недель (n=6) - 10,7%, а в возрасте 45 недель (n=5) - 29,9% (при сравнении с мышами в возрасте 7 недель p=0,02). Доля незрелых гладкомышечных клеток в аорте не зависит от пола животного.

Выводы. В данной работе мы впервые обнаружили парадоксальное увеличение доли незрелых ГМК в стенке аорт старых мышей. Полученные результаты являются важным косвенным свидетельством участия NG2⁺CD146⁺ незрелых ГМК в атерогенезе, поскольку атеросклероз является заболеванием, ассоциированными с возрастом.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00429.

9.36. ГИБРИДНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА pHLP И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ К РАКОВЫМ КЛЕТКАМ И ИХ ЭЛИМИНАЦИИ В УСЛОВИЯХ АЦИДОЗА

Фролова А.Ю., Пахомов А.А., Мартынов В.И.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
anastasiya_frolova_box@mail.ru

В результате активного метаболизма раковых клеток значение pH их внеклеточного пространства (pH 6,0-6,7) ниже, чем у здоровых клеток [1]. Данная особенность злокачественных клеток была использована для разработки новых агентов для тераностики рака на основе белковых конструкций, нацеленных на кислотное микроокружение опухоли. Данные конструкции представлены гибридными белками, включающими флуоресцентную и pH-чувствительную части. Последняя представлена пептидами семейства pHLP (pH low insertion peptide), способными к встраиванию в клеточную мембрану при понижении pH [1], а именно: природным пептидом pHLP-WT и его мутантными вариантами VAR3 и ATRAM. Для модельной конструкции в качестве флуоресцентного домена был использован белок EGFP, а для терапевтической - фототоксичный флуоресцентный белок KillerRed. Таким образом, были получены и наработаны в необходимых для дальнейших исследований количествах модельные белковые конструкции EGFP-pHLP-WT, EGFP-pHLP-VAR3, EGFP-ATRAM и фототоксичные KillerRed-pHLP-WT, KillerRed-pHLP-VAR3, KillerRed-ATRAM, содержащие pH-чувствительные фрагменты на С-конце флуоресцентных доменов. Было проведено сравнение эффективности связывания модельных конструкций на клеточной линии HeLa при различных значениях pH (5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,2; 7,4). Было установлено, что с мембраной раковых клеток при пониженных значениях pH связываются все модельные конструкции, в то время как при физиологическом уровне pH связывания не наблюдалось. Было показано, что наибольшей pH-селективностью обладает конструкция EGFP-ATRAM. Аналогичным образом было проведено изучение связывания фототоксичных конструкций с раковыми клетками при различных значениях pH. Как и в случае модельных конструкций, наибольшей селективностью в отношении pH обладала конструкция KillerRed-ATRAM.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90019

Литература:

1. Wyatt L.C, Lewis J.S, Andreev O.A, Reshetnyak Y.K, Engelman D.M. Applications of pHLP Technology for Cancer Imaging and Therapy // Trends Biotechnol. 2017. V.35. P.653-664

9.37. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НОВЫХ АНАЛОГОВ ИНГИБИТОРА ТРАНСПОРТЁРА ДОФАМИНА GBR12909

Хейфец Е.В.¹, Лаврова А.В.², Акимов М.Г.², Фомина-Агеева Е.В.²,
Грецкая Н.М.²

¹РТУ МИРЭА (ИТХТ им. М.В. Ломоносова), Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
zhenia-solo@mail.ru

Болезнь Паркинсона - медленно прогрессирующее хроническое нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется гибелью нейронов дофаминергической системы и, как следствие, снижением уровня дофамина в синапсах. Терапия болезни Паркинсона является симптоматической и направлена на восстановление уровня дофамина. Незадействованной перспективной мишенью для создания новых терапевтических молекул является пресинаптический белок-транспортёр, осуществляющий обратный захват дофамина. Одним из наиболее селективных и высокоаффинных ингибиторов обратного захвата дофамина является ингибитор GBR12909.

Поскольку существенную роль в гибели дофаминергических нейронов играет окислительный стресс, эндогенные антиоксидантные системы клеток задействуются для поддержания физиологической нормы, однако по мере прогрессирования болезни Паркинсона их ресурса становится недостаточно. Следовательно, для комплексного лечения болезни Паркинсона становится актуальным применение не только препаратов, восполняющих уровень дофамина, но и препаратов антиоксидантного действия.

Цель данной работы - синтез новых соединений с полипотентной терапевтической активностью на основе модифицированного аналога GBR12909. Синтезированные бифункциональные аналоги GBR12909, содержат адресную часть, которая обеспечивает направленную доставку синтезированной конструкции в дофаминергические нейроны, ингибируют дофаминовый транспортёр и повышают уровень дофамина, а также снабжены дополнительной аминогруппой для введения дополнительных фармакофоров. Были выбраны фармакофоры с антиоксидантным действием. Аналог ионола, 2-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)уксусная кислота, является скавенджером активных форм кислорода. Моноэтиловый эфир фумаровой кислоты связывается с белком-репрессором Kear1 и, таким образом, активирует фактор транскрипции Nrf2, отвечающий за активацию генов элемента антиоксидантного ответа.

Биологические свойства синтезированных соединений исследовали на клетках нейробластомы SH-SY5Y, которые являются популярной клеточной моделью в исследованиях болезни Паркинсона.

9.38. ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ TRAIL НА МУЛЬТИФОРМНУЮ ГЛИОБЛАСТому

***Чичварин В.А., Яголович А.В., Антипова Н.В., Павлюков М.С.,
Гаспарян М.Э., Шахпаронов М.И.***

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, Москва
Vladimir150799@yandex.ru

Мультиформная глиобластома является наиболее распространенным и тяжелым типом опухолей центральной нервной системы у взрослых пациентов. В связи с рецидивирующей природой заболевания стандартом ее лечения является комбинированная химио- и радиотерапия. Однако резистентность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам вызывает невозможность полного выздоровления пациента и лечение, на данный момент, носит лишь паллиативный характер.

Апоптоз-индуцирующий лиганд, связанный с фактором некроза опухоли (TRAIL) относится к суперсемейству фактора некроза опухолей (TNF), который инициирует апоптоз в раковых клетках путем взаимодействия с рецепторами смерти DR4 и DR5. Связывание TRAIL с рецепторами смерти запускает каспаз-8-зависимый сигнальный путь индукции апоптоза путем активации каспаз-3, -6, -7. Активация каспазы-8 также приводит к расщеплению Bidx, тем самым стимулируя митохондриально-зависимый путь через активацию каспазы-9. TRAIL является перспективным химиотерапевтическим агентом в связи с его способностью избирательно индуцировать апоптоз раковых клеток, не влияя на здоровые.

Ранее показано, что мутантный вариант цитокина TRAIL DR5-B связывается с рецептором смерти DR5 так же эффективно, как TRAIL дикого типа, но практически не связывается с другими рецепторами TRAIL (DR4, DcR1, DcR2 и OPG), что позволяет избежать ингибиторного эффекта рецепторов-"ловушек" и усилить сигнал апоптоза. В нашей работе влияние мутантного варианта цитокина TRAIL DR5-B на пролиферацию клеток первичной культуры глиобластомы оценивали совместно с химиопрепаратом темозоламидом. Показано, что DR5-B в 2,5 раза эффективнее индуцирует клеточную гибель клеток по сравнению с исходным TRAIL и в 5 раз эффективнее монотерапии темозоламидом. Таким образом, повышение эффективности TRAIL может привести к возникновению новой стратегии лечения глиобластомы, более мягкой для самих пациентов.

9.39. ИНГИБИРОВАНИЕ ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ КИНАЗ 4 И 6 В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ ЧЕЛОВЕКА ИМИТИРУЕТ ДЕЙСТВИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Щербакова А.С., Земская А.С., Кочетков С.Н., Козлов М.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
nastya.shcherbakova1@gmail.com

Известно, что хронической гепатит С провоцирует клеточное старение (КС) в поврежденных тканях печени. Недавно в нашей лаборатории было показано, что индуцирование КС в клетках гепатомы человека стимулирует репликацию вируса гепатита С (ВГС). В качестве индуктора старения был использован пальбоциклиб - ингибитор циклин-зависимых киназ 4/6 (CDK4/6). В данной работе мы показали, что пальбоциклиб, подобно трансформирующему фактору роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), активирует в клетках гепатомы биогенез жировых капелек и аутофагосом, которые вместе могут формировать вирусные репликасомы. Однако, если добавление TGF- $\beta 1$ к клеточной среде вызывало слияние жировых капель с лизосомами, характерное для липофагии, то пальбоциклиб полностью блокировал слияние этих органелл, как это происходит и в инфицированных вирусом гепатоцитах [1]. Таким образом, индуцирование КС за счет ингибирования CDK4/6 позволило получить клеточную тест-систему, адаптированную к условиям хронической вирусной инфекции.

С целью изучения влияния КС на анти-ВГС активность, описанную ранее для ингибиторов гистондеацетилаз (HDACs) [2], было выполнено сравнительное тестирование пяти соединений, как в регулярно пролиферирующих, так и в предсенесцентных клетках гепатомы. Было обнаружено, что в условиях индукции КС мультипотентные ингибиторы HDACs (вориностат и белиностат) так же, как и селективный ингибитор HDAC6 (Cmpd12a) резко теряют свою активность, тогда как двунаправленные ингибиторы HDAC6 и HDAC10 (тубастатин А и буфексамак) ее заметно повышают. Нам удалось впервые идентифицировать HDAC10 как новую мишень для анти-ВГС терапии, и, хотя этот результат является предварительным, он демонстрирует уникальные возможности предлагаемого нами подхода для изучения и оценки потенциала антивирусных агентов.

Работа поддержана РФФИ № 20-04-00504.

Литература:

1. Lee et all. Spatiotemporal Coupling of the Hepatitis C Virus Replication Cycle by Creating a Lipid Droplet-Proximal Membranous Replication Compartment. Cell Reports 2019, 27, 3602-3617.
2. Kozlov, M.V., Konduktorov, K.A., Shcherbakova, A.S., Kochetkov, S.N. Synthesis of N'-propylhydrazide analogs of hydroxamic inhibitors of histone deacetylases (HDACs) and evaluation of their impact on activities of HDACs and replication of hepatitis C virus (HCV). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2019, 29, 2369-2374.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абашина Т.Н.	189	Бердышев И.М.	6
Авдюшкин А.С.	23	Беркут А.А.	42, 98
Агапова Ю.К.	5	Бобков Д.Е.	148
Ажикина Т.Л.	60	Бобров М.Ю.	69
Азадова Г.Я.	190, 212	Бовин Н.В.	70, 72, 73, 75, 77
Азарова Д.Ю.	128	Богданов А.М.	87
Айрапетов М.И.	196	Богданов И.В.	102
Акасов Р.А.	149	Богданова А.А.	221
Акимов М.Г.	69, 93, 209, 227	Бойко А.А.	194
Александрова О.И.	200	Бойко К.М.	8
Алексеева А.С.	6	Болдинова Е.О.	46, 48, 50, 56, 155
Алексеева Н.А.	99	Болдырев И.А.	6
Алексеев И.В.	121	Болосов И.А.	22
Алтунина А.В.	78	Борзова В.А.	179
Алтухов Д.А.	5	Борисов Е.Е.	47
Андреев Я.А.	19, 24, 41	Бровко Ф.А.	32
Андреева Т.В.	79	Брылёв В.А.	215
Андреева-Ковалевская Ж.И.	32	Бугрова А.Е.	128
Антипов А.Д.	129	Булаев А.Г.	131, 138, 158, 186
Антипова Н.В.	92, 190, 212, 216, 228	Буряк В.И.	68
Антипова Т.В.	188	Бушуева В.А.	48
Антошина Д.В.	130	Быков А.Г.	189
Арапиди Г.П.	206	Былино О.В.	160
Арсеньев А.С.	19, 84	Бычков М.Л.	112, 151
Артемова Д.А.	191	Вавилова Ю.Д.	194
Артыков А.А.	184	Вагапова Э.Р.	113
Артыкова А.В.	131	Вайнштейн М.Б.	188, 189
Баймуханова Ж.Ж.	108	Валов С.Л.	198
Баландин С.В.	14, 130	Ванюшенкова А.А.	195
Балацкая М.Н.	192, 225	Вараева Ю.Р.	210
Балацкий А.В.	192, 225	Варламов В.П.	176
Балеева Н.С.	81, 84	Варфоломеева Л.А.	8
Баранов М.С.	81, 84	Василевский А.А.	33, 42, 98
Баркова Д.В.	95	Васильева А.Д.	128
Басс Д.Ю.	109	Васильева В.Ю.	196
Безвинова Е.А.	132	Васильева Е.В.	9
Безуглов В.В.	69, 93, 209	Васильева Л.Г.	39
Белалов И.Ш.	63	Васкан И.С.	201
Белкина Е.Г.	62	Ваулин А.Н.	197
Белов А.А.	195, 224	Вдовина Т.В.	177
Белова М.М.	193	Величинский Р.А.	100
Белогурова Н.Г.	168	Вершинина М.А.	14
Белоусов В.В.	109	Вихров А.А.	149
Беляев Я.Б.	133	Вишняков А.В.	198
Беляков В.В.	29	Вишнякова П.А.	191
Бениаминов А.Д.	66	Владимиров А.А.	19

Владимиров В.И.	23	Даянова Л.К.	52
Владимирский М.А.	25	Дегтярева К.О.	93
Водовозова Е.Л.	6, 162	Дегтярёвская Т.Ю.	160
Волков Д.В.	134	Дедков В.Г.	135
Волков Т.М.	215	Деев И.Е.	93, 110, 111
Волкова Е.А.	156	Деев С.М.	133, 137, 139, 141, 144, 146, 154, 157, 169, 170, 174, 181, 187, 193, 204
Волынский П.Е.	6	Делеган Я.А.	188
Воробьев И.И.	52, 143, 166	Дементьева Е.И.	203
Воробьева Н.Е.	55	Демидюк И.В.	6, 37
Воробьева Т.В.	150	Демин Д.Э.	13
Воропаев Г.С.	10	Демина Т.С.	222
Вржещ П.В.	83	Денисова Е.В.	172
Габибов А.Г.	103, 134, 141	Дергоусова Н.И.	45
Гавриленкова А.А.	110	Дерябин Д.Г.	203
Гаврилина Е.С.	128	Дидыч Д.А.	121
Гагаринская Д.И.	46	Долгова А.С.	135
Гайдина А.С.	35, 180	Дроздова М.Г.	222
Гамисония А.М.	69	Дубовиченко М.В.	153
Ганцова Е.А.	110, 111	Дудина П.В.	93
Гарбуз Д.Г.	51	Дымова Е.А.	94
Гаспарян М.Э.	184, 228	Евдокимова А.О.	151
Гилева А.М.	207	Евлаков П.М.	136
Говтвань А.О.	215	Елкина Ю.А.	138
Голиков М.В.	199	Ерем М.А.	82
Голубева А.К.	11	Еремчук С.И.	14
Голубева Т.С.	49	Ереско С.О.	196
Голышев С.А.	168	Ермолаева Д.Р.	70
Гондаренко Е.А.	92	Ерохина С.А.	99, 194
Гончарова Е.А.	135	Ершова М.И.	218
Гончарук С.А.	9, 44, 84	Ефремов А.А.	83
Гордукова М.А.	220	Ефремов Р.Г.	98
Горелов Е.Н.	198	Жарков Д.О.	50, 65
Грановский И.Э.	25, 82	Женило С.В.	96
Грецкая Н.М.	69, 209, 227	Журенков К.Э.	200
Гречаная Ю.С.	200	Заец К.В.	201
Григоров А.С.	60	Заиграев М.М.	15
Грин М.А.	182	Зайцева Э.Р.	80
Гродецкая Т.А.	54, 136	Залыгин А.В.	74, 78, 201, 217, 223
Гроза Н.В.	171	Замятина А.В.	32
Громова А.С.	50	Захарова М.Ю.	11
Грядунов Д.А.	203	Зелепукин И.В.	133, 137, 139, 157, 170, 187
Грязнова О.Ю.	137	Земская А.С.	202, 229
Гузь А.В.	57	Зенин В.А.	88
Гусев И.Д.	29		
Гусева Е.А.	12		
Давлетшин А.И.	51		
Данилкович А.В.	10		
Данильченко Е.А.	196		

Зенкова М.А.	141	Колпашиков Д.М.	153
Зерний Е.Ю.	23	Комарова В.А.	72
Зиганшин Р.Х.	102, 127	Комедчикова Е.Н.	144
Зинченко А.А.	129	Комков А.Ю.	64
Зинченко Д.В.	23	Комолов А.С.	8, 18
Иванова О.М.	108	Комягина Т.М.	203
Иванов-Ростовцев П.А.	71	Кондратьева А.М.	54
Ильинский Н.С.	27	Кондукторов К.А.	202
Исаева А.С.	95	Коновалова М.В.	105, 205, 221
Исатаева Д.	160	Коновалова М.С.	106
Ишина И.А.	140	Кононихин А.С.	128
Казаков А.С.	23	Коноплева М.Н.	17
Казакова А.А.	180	Константинова Е.В.	221
Калиберда Е.Н.	11	Копнова Т.Ю.	145, 185
Калинин Д.С.	82	Коржевский Д.Э.	120
Калинин Р.С.	134, 141	Корнилов Ф.Д.	19
Калинина Н.И.	192, 225	Королькова Ю.В.	40
Калмыкова А.И.	47	Корупасва Е.Ю.	20
Калужный Д.Н.	66	Коршун В.А.	215
Кандинов И.Д.	203	Кот Э.Ф.	9, 84
Карасева М.А.	6, 37	Котельникова П.А.	146
Каратовская А.П.	32	Коцарева О.Д.	105
Карпов Д.С.	51	Кочаровская М.В.	21
Картамышева Л.В.	53	Кочарян А.Г.	147
Карташова А.К.	16	Кочетков С.Н.	202, 229
Кассиров И.С.	135	Кочетов А.В.	49
Касьянов А.С.	197	Кравцов Д.В.	203
Кацуба К.Е.	153	Красавина Д.А.	148
Качаев З.М.	57	Кривошей А.В.	83
Кашеверов И.Е.	95, 167	Кропачева Е.В.	61
Кильдеева Н.Р.	222	Кругликов Р.Н.	22
Ким Д.В.	50	Крупкин Е.А.	149
Кириченко А.В.	112	Крюкова А.В.	150
Кирсанов К.И.	211	Кубанов А.А.	203
Киселев Д.А.	220	Кудрявцев Д.С.	92, 95, 167
Клементьев С.В.	142	Кудряшова Е.В.	145, 165, 168, 173, 185
Клементьева А.А.	68	Кузницын Р.А.	25
Князев А.Н.	31	Кузьменков А.И.	33
Князева С.В.	17	Кузьмина Е.О.	206
Кобелев А.В.	142	Кузьмич А.И.	121
Кобызева П.А.	99	Кукушкин И.Д.	151
Коваленко Е.И.	99-101, 104, 194	Куликов А.М.	53, 62
Ковнир С.В.	52, 166	Куликов П.П.	184
Козлов М.В.	202, 229	Кульбацкий Д.С.	21
Козлов С.А.	41	Кульдюшев Н.А.	98
Колесникова О.А.	204	Куракина Т.А.	153
Колесов Д.Э.	143	Куранова М.Л.	117
Коломыцева М.П.	35, 180	Курбанова Л.А.	184, 207

Курганов Б.И.	179	Марквичева Е.А.	184, 207, 222
Кусков А.Н.	184	Маркелова Е.Е.	156
Кучур О.А.	208	Мартынов В.И.	43, 132, 226
Лаврова А.В.	209, 227	Марьясина С.С.	210
Лазебный О.Е.	62	Масленников А.М.	74
Лапенкова М.Б.	25	Маслякова М.И.	190, 212
Ларина С.Н.	160	Масчан М.А.	103, 134
Ларичева Д.И.	210	Матвейшина Е.К.	83
Лебедев Т.Д.	113	Мацвай А.Д.	220
Лебедев Ю.Б.	64	Медведева В.С.	107
Лебедева А.Ю.	23	Меламуд В.С.	131, 158, 186
Лебедева Л.А.	57	Мелешкина Е.Г.	215
Леваков С.А.	190, 212, 216	Мелихова Т.Д.	129
Ле-Дейген И.М.	165	Мельникова Д.Н.	20, 28
Летаров А.В.	63	Менчиц Я.А.	57
Липатников А.Д.	73	Меньшиков М.Ю.	213
Лобанова Я.В.	96	Микулинская Г.В.	178
Логашина Ю.А.	19	Минеев К.С.	9, 19, 84
Ломакин Я.А.	140, 161	Миркасымов А.Б.	157, 187
Лопатин С.А.	176	Миронов А.Ф.	182
Лубова К.И.	24	Мирошниченко Д.Н.	68
Лукьянов Д.К.	42	Михайлов И.М.	220
Лукьянов К.А.	87	Михайлова А.Г.	30
Лукьянова А.В.	66	Михайлова В.В.	179
Луппов Д.В.	97	Михайлова И.В.	23
Лушпа В.А.	19	Михеева А.М.	113
Люкманова Е.Н.	15, 21, 112, 151	Мичурина С.С.	213
Мазина М.Ю.	55	Можаев А.А.	111
Макаров А.Д.	154	Моллаева М.Р.	88, 114, 159, 171, 175, 183
Макаров Д.А.	129, 150	Морозова И.Ю.	197
Макарова А.В.	155	Мотов В.В.	84
Макарова А.В.	46, 48, 50, 56, 58, 65, 67, 155	Мусабинов А.А.	57
Макарова А.О.	25	Мухаметшина Л.Ф.	115
Максимова В.П.	211	Мышкин М.Ю.	42
Максимчук М.Д.	62	Мягких И.В.	150
Малеева Е.Е.	19	Мяснянко И.Н.	84
Малинина Д.К.	26	Мясоедова Н.М.	35, 180
Мальцев Д.И.	115, 124	Нагель А.С.	32
Малюченко Н.В.	79	Нечаева А.В.	158
Мамедов И.З.	64	Никитин А.А.	182
Мамедова А.Р.	222	Никитин М.П.	139, 147, 156, 157, 187
Мамедова А.Э.	190, 212	Никитин П.И.	157, 187
Мамонтова А.В.	87	Никитина М.А.	28
Мамонтова Е.Д.	213	Никифорова А.В.	75
Мануйлов В.Д.	27	Николаев Е.Н.	128
Манукян А.А.	56	Никольская А.И.	116
Манухов И.В.	17		

Никольская Е.Д.	88, 114, 159, 171, 175, 183	Погудина Д.К.	218
Никонова Д.Д.	29	Подгорный О.В.	115, 124
Новикова А.А.	58	Поденкова У.И.	119
Ноздрачева А.В.	117	Подкуйченко Н.В.	213
Обозина А.С.	160	Полтавцева Р.А.	205
Обухова Е.А.	216	Полтораченко В.А.	58
Овчинникова Л.А.	161	Польпаков В.И.	210
Овчинникова Т.В.	20, 22, 28, 34, 36, 102, 130	Поляков К.М.	8
Ожималов И.Д.	192	Попов В.О.	8, 38, 45
Олейников В.А.	74, 78, 201, 217, 223	Попов В.С.	192, 225
Онищенко Н.Р.	162	Попова В.Г.	211
Орлов М.А.	59	Попова И.С.	72, 77
Орлова Н.А.	52, 143, 166	Попова Н.М.	164
Осмаков Д.И.	40, 41	Потехина Е.С.	109
Осмоловский А.А.	163	Прасолов В.С.	113
Острик А.А.	60	Приходько А.Т.	217
Очнева А.Г.	163	Прозорова И.Ш.	86
Павлюков М.С.	92, 127, 190, 212, 216, 228	Прошкина Г.М.	144, 154
Падий Д.А.	118	Прудникова Д.А.	33
Пазынина Г.В.	73	Пырегов А.В.	205
Паламарчук А.И.	101	Разенкова В.А.	120
Панкратов Т.А.	16	Ракитина О.А.	121
Панова В.В.	83	Ракитина Т.В.	5, 8, 30
Пантелеев В.А.	61	Рапорт Е.М.	72
Пантелеев П.В.	22, 34, 36	Резникова О.В.	34
Парамонов А.С.	21	Ренфельд Ж.В.	35, 180
Парфенова Е.В.	213	Рогачевская О.А.	123
Патова О.А.	75	Родыгин Д.А.	218
Пахомов А.А.	43, 132, 226	Розенфельд М.А.	128
Пахомов Е.А.	29	Рокосовина В.В.	165
Пеньёр С.	98	Россохин Д.С.	107
Пермяков С.Е.	23	Рубцов Ю.П.	103
Перушкина Е.В.	177	Руденко А.А.	219
Пестов Н.Б.	97	Руденко В.Б.	219
Петракова Д.О.	77	Руденко Г.П.	219
Петренко А.Г.	93, 110, 111	Руденко Н.В.	32
Петренко Д.Е.	18, 30	Руденко П.А.	219
Петров Е.А.	31	Рыжов И.М.	70, 72, 77
Петров Е.Л.	32	Рынгач А.	156
Петрова Д.В.	65	Савина А.Д.	225
Пиголев А.В.	68	Савченко М.С.	77
Плескач Н.М.	117	Сажнев Н.А.	222
Плетнев Ф.И.	12	Сай А.В.	220
Плюта В.А.	118, 122	Салина Е.Г.	60
		Саляхутдинов Р.Р.	198
		Сапожников А.М.	194
		Сапожникова К.А.	215
		Сафонов А.В.	164

Сафронова В.Н.	36	Стрельникова И.А.	107
Сбарцалья В.А.	135	Стрельцова М.А.	99-101, 104, 194
Светлова А.О.	37	Строкач Н.Н.	102
Свищевская Е.В.	105, 205, 221	Студитский В.М.	26, 79
Семенов И.А.	108	Суворов Н.В.	182
Сергеев А.А.	221	Суконкина А.А.	125
Сергеева М.Г.	116	Супрунчук В.Е.	172
Сергиев П.В.	12	Сысоева М.А.	86
Серова О.В.	93, 110, 111	Терехова В.В.	222
Сивкина А.Л.	26	Терешин М.Н.	129, 150
Сивопляс Е.А.	53, 62	Тетерева Е.А.	222
Сидорова Д.Е.	122	Тимофеев В.И.	5, 18, 30
Сизиков А.А.	156	Титгат Я.	98
Симоненко С.Ю.	160	Тихонов А.Ю.	59
Симонян Т.Р.	87	Тихонова Т.В.	8, 38, 45
Синегубова М.В.	143, 166	Тишкин Г.В.	132
Сироткин А.С.	142, 177	Ткаченко В.К.	64
Сиунов А.В.	32	Толстова Т.В.	222
Скорб Е.В.	153	Третчикова О.А.	39
Скрипка М.И.	122, 167	Третьякова Д.С.	162
Скuredина А.А.	145, 168, 173, 185	Троицкая П.С.	223
Смирнов А.Ю.	80	Трофимова П.В.	82
Смирнов И.В.	207	Труфанова А.А.	171
Согомонян А.С.	169	Трушина Д.Б.	207
Сокол М.Б.	88, 114, 159, 171, 175, 183	Тузиков А.Б.	72, 77, 129
Соколов А.А.	63	Тuzова Е.С.	224
Соколов В.В.	123	Тычинина А.С.	168, 173
Соколова Е.А.	94	Тютяева В.В.	51
Соколова И.В.	150	Уверский В.Н.	27
Соловьев В.Д.	170, 204	Уграицкая В.М.	40
Соловьева А.Ю.	38	Украинская В.М.	103
Солонин А.С.	32	Усалка О.Г.	211
Сольев П.Н.	90, 91	Усик М.А.	125, 126
Соллос Г.М.	115, 124	Устюжанина М.О.	104
Соллос Е.М.	124	Фаттахова Г.В.	106
Сон Л.В.	167	Федорова О.А.	136
Соркина Е.	213	Феофанов А.В.	26, 79
Сорокин Д.Ю.	45	Фесенко И.А.	31
Сохранева В.А.	171	Филатова Ю.Г.	225
Сочилина А.В.	149	Филипенко Е.А.	49
Спасская Д.С.	51	Филиппова М.И.	88
Спирова Е.Н.	95	Финкина Е.И.	20, 102
Стародубова А.В.	210	Фирулева П.А.	174
Стафеев Ю.С.	213	Фомина-Агеева Е.В.	209, 227
Степаненко В.Н.	150	Фомичева М.В.	88, 114, 159, 171, 175, 183
Степанов А.В.	103, 134, 141	Фролова А.Ю.	132, 226
Столяренко А.Д.	58	Фуфина Т.Ю.	39

Хабибуллина А.Р.	177	Шевченко Н.А.	118
Хайрова А.Ш.	176	Шендер В.О.	108
Хасанов Т.А.	41	Шенкарёв З.О.	15, 21, 34, 42
Хасанова А.А.	177	Шерман Д.К.	90
Хахина А.О.	220	Шерстяных Г.Д.	93
Хейфец Е.В.	227	Шестакова М.	213
Хисамов М.М.	91	Шестопалова М.С.	74, 78, 217, 223
Хлопин В.А.	75	Шешукова Н.А.	216
Хмель И.А.	122	Шидловский Ю.В.	57, 160
Хорев А.С.	42	Шилкин Е.С.	46, 58, 65, 67, 155
Хренова М.Г.	38	Шилова Н.В.	70, 73, 75
Хрячкова А.Ю.	65	Шипков Н.С.	45
Царёв А.В.	21	Шипулин Г.А.	220
Царев А.В.	34	Шипунова В.О.	141, 144, 146, 154, 169, 170, 174, 181, 193, 204
Царегородцева Д.С.	105, 106	Шитова А.А.	107
Цветкова Д.В.	178	Шитова М.С.	47
Цетлин В.И.	92, 95, 167	Шлепова О.В.	112, 151
Чащина Г.В.	66	Шнайдер П.В.	108
Чевочкина Е.С.	43	Штиль А.А.	208
Чекова М.Д.	190, 212	Штыкова Э.В.	74
Черенко В.А.	49	Шулепко М.А.	21, 112, 151
Черников А.М.	179	Шульга А.А.	141
Черников И.В.	141	Щербакова А.С.	202, 229
Черногорцева М.В.	222	Щока Е.В.	182
Черных А.М.	35, 180	Эшмуратова О.Т.	88
Черных М.А.	98	Юдинцева Н.М.	148
Чернышов С.В.	178	Юрина Л.В.	128
Чертков О.В.	79	Яббаров Н.Г.	88, 114, 159, 171, 175, 183
Черткова Р.В.	29	Яголович А.В.	184, 207, 228
Чистяков Д.В.	116	Якубовская М.Г.	211
Чичварин В.А.	228	Якупова Л.Р.	145, 185
Чонтян Д.А.	198	Янишевская Е.С.	186
Чугунов А.О.	15, 24, 98	Яременко А.В.	147, 156, 187
Чудаков Д.Б.	106	Яременко Т.В.	187
Чудецкий И.С.	33	Яцкив А.А.	189
Чумакова Е.А.	127	Ячкула А.А.	188, 189
Чупров-Неточин Р.Н.	50	Zubkova O.	70
Чурсина М.А.	118		
Чухонцева К.Н.	6		
Шабалкина А.В.	44		
Шамсутдинова Л.П.	88		
Шаскольский Б.Л.	203		
Шатрова А.Н.	148		
Шахпаронов М.И.	92, 127, 190, 212, 216, 228		
Шварц А.М.	13		
Шебанова А.Д.	35, 180		
Шевцов М.А.	148		

СОДЕРЖАНИЕ

СЕКЦИЯ 1

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ. БИОКАТАЛИЗ

- 1.1. ИНТЕРФЕЙС МЕЖДУ МОНОМЕРАМИ В ДИМЕРЕ
ГИСТОНОПОДОБНОГО БЕЛКА HU КАК МИШЕНЬ ДЛЯ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНГИБИТОРОВ
Агапова Ю.К., Алтухов Д.А., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В. 5
- 1.2. НЕГИДРОЛИТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ A2 ИЗ ЯДА
ПЧЕЛЫ НА ЖИДКОФАЗНЫЕ И ГЕЛЕВЫЕ ФОСФОЛИПИДНЫЕ
БИСЛОИ
Алексеева А.С., Волынский П.Е., Водовозова Е.Л., Болдырев И.А. .. 6
- 1.3. ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ ЭМФОРИНА - НОВОГО БЕЛКОВОГО
ИНГИБИТОРА МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ
Бердышев И.М., Чухонцева К.Н., Карасева М.А., Демидюк И.В. ... 7
- 1.4. МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ОСТАТКОВ
ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ (TSDH) ПРЕДОТВРАЩАЕТ
ДВОЙНИКОВАНИЕ КРИСТАЛЛОВ ФЕРМЕНТА
*Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В.,
Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. 8*
- 1.5. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРИМЕМБРАННОГО И
ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНОВ РЕЦЕПТОРА TrkA
Васильева Е.В., Гончарук С.А., Кот Э.Ф., Минеев К.С. 9
- 1.6. СОДЕРЖАТ ЛИ ГЛИКОПРОТЕИНЫ ВИРУСА COVID-19 УЧАСТКИ С
ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ?
Воропаев Г.С., Данилкович А.В. 10
- 1.7. ПОЛУЧЕНИЕ ГЛАВНОЙ ПРОТЕАЗЫ SARS-CoV-2 В
РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЕ
Голубева А.К., Калиберда Е.Н., Захарова М.Ю. 11
- 1.8. ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ ГИПОТЕТИЧЕСКОЙ M5C-
РНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ NSUN7
Гусева Е.А., Плетнев Ф.И., Сергиев П.В. 12
- 1.9. МИНОРНАЯ КОРОТКАЯ ИЗОФОРМА СЕКУРИНА (PTTG1)
РЕГУЛИРУЕТ КЛЕТОЧНЫЙ РОСТ И ЛЕКАРСТВЕННУЮ
УСТОЙЧИВОСТЬ
Демин Д.Э., Шварц А.М. 13
- 1.10. ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИОЦИНОВ IIa КЛАССА С
НЕКАНОНИЧЕСКОЙ СТРУКТУРОЙ "ПЕДИОЦИНОВОГО БОКСА"
Еремчук С.И., Вершинина М.А., Баландин С.В. 14
- 1.11. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ 3D СТРУКТУРЫ
 α -ХОЛИНОРЕЦЕПТОРА В КОМПЛЕКСЕ С НЕЙРОНАЛЬНОЙ
МЕМБРАНОЙ И СЛАБЫМ ТОКСИНОМ WTX
Заиграев М.М., Чугунов А.О., Шенкарёв З.О., Люкманова Е.Н. ... 15
- 1.12. ВЛИЯНИЕ ГОРМОНОВ ЧЕЛОВЕКА НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА В
ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ
Карташова А.К., Панкратов Т.А. 16

- 1.13. СТРУКТУРА БЕЛКОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ В БОЛЕЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОМ СОСТОЯНИИ: МОДЕЛЬ И СВОЙСТВА
Князева С.В., Коноплева М.Н., Манухов И.В. 17
- 1.14. МОДЕЛИРОВАНИЕ NMDA-РЕЦЕПТОРА В ПОСТСИНАПТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ
Комолов А.С., Тимофеев В.И., Петренко Д.Е. 18
- 1.15. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР НЕЙРОТОКСИНОВ AMS3, AMS9.3.1 ИЗ ЯДА *METRIDIUM SENILE* И ТВ94 ИЗ ЯДА *TIBELLUS OBLONGUS*
Корнилов Ф.Д., Лушпа В.А., Малеева Е.Е., Владимиров А.А., Логашина Ю.А., Андреев Я.А., Арсеньев А.С., Минеев К.С. 19
- 1.16. РОЛЬ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ Arg45 И Tyr80 В СТРУКТУРЕ АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ *Len c 3*
Корупаева Е.Ю., Финкина Е.И., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. .. 20
- 1.17. СТРУКТУРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ДИНАМИКА "ТРЕХПЕТЕЛЬНЫХ" БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С НИКОТИНОВЫМИ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ
Кочаровская М.В., Парамонов А.С., Царёв А.В., Кульбацкий Д.С., Шулепко М.А., Люкманова Е.Н., Шенкарёв З.О. 21
- 1.18. ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО СЕМЕЙСТВА ПРОЛИН-БОГАТЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ПАРНОКОПЫТНЫХ
Кругликов Р.Н., Пантелеев П.В., Болосов И.А., Овчинникова Т.В. . 22
- 1.19. ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ КЛЕТКИ РЕКОВЕРИНА И КАВЕОЛИНА-1 *IN VITRO*
Лебедева А.Ю., Владимиров В.И., Авдюшкин А.С., Михайлова И.В., Казаков А.С.З., Пермьяков С.Е., Зерний Е.Ю., Зинченко Д.В. 23
- 1.20. САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ БОЛЕВОГО РЕЦЕПТОРА TRPV1 ВЫЯВИЛ СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ТЕПЛОВУЮ И КАПСАИЦИН-ОПОСРЕДОВАННУЮ АКТИВАЦИЮ КАНАЛА
Лубова К.И., Чугунов А.О., Андреев Я.А. 24
- 1.21. ПОЛУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ФАКТОРА РЕАКТИВАЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ RpfB *M. TUBERCULOSIS* В КЛЕТКАХ *E. COLI*
Макарова А.О., Кузницын Р.А., Лапенкова М.Б., Владимирский М.А., Грановский И.Э. 25
- 1.22. ВЛИЯНИЕ БЕЛКА Hmo1 НА СТРУКТУРУ НУКЛЕОСОМ *IN VITRO*
Малинина Д.К., Сивкина А.Л., Студитский В.М., Феофанов А.В. .. 26
- 1.23. НАЛИЧИЕ ВНУТРЕННЕЙ НЕУПОРЯДОЧЕННОСТИ В БЕЛКАХ, СВЯЗАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ
Мануйлов В.Д., Ильинский Н.С., Уверский В.Н. 27
- 1.24. ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ АНАЛОГОВ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ЧЕЧЕВИЦЫ Lc-LTP2
Никитина М.А., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. 28

- 1.25. МУТАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ ЦИТОХРОМА *c* С ЗАМЕНАМИ, ИМИТИРУЮЩИМИ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ОСТАТКОВ ТУР: ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКА
Никонова Д.Д., Беляков В.В., Пахомов Е.А., Гусев И.Д., Черткова Р.В. 29
- 1.26. КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ И КОМПЛЕКСОВ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В ИЗ *SERRATIA* *PROTEAMACULANS*
Петренко Д.Е., Тимофеев В.И., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. ... 30
- 1.27. ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССА НОНСЕНС-ОПОСРЕДОВАННОЙ ДЕГРАДАЦИИ РНК (NMD) НА ТРАНСКРИПЦИЮ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК У РАСТЕНИЙ
Петров Е.А., Фесенко И.А., Князев А.Н. 31
- 1.28. КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И С-ТЕРМИНАЛЬНЫЙ ДОМЕН ГЕМОЛИЗИНА II *VACILLUS CEREUS*
Петров Е.Л., Руденко Н.В., Каратовская А.П., Замятина А.В., Сиунов А.В., Андреева-Ковалевская Ж.И., Нагель А.С., Бровко Ф.А., Солонин А.С. 32
- 1.29. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХИМЕРЫ mEos3.2-MVPC И MVPC-mEos3.2 - ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ
Прудникова Д.А., Чудецкий И.С., Кузьменков А.И., Василевский А.А.... 33
- 1.30. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА НОВОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА КАПИТЕЛЛАЦИНА ИЗ ПОЛИХЕТЫ *CAPITELLA TELETA*
Резникова О.В., Царёв А.В., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В., Шенкарёв З.О. 34
- 1.31. НЕТИПИЧНЫЕ МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ОКСИДАЗЫ АСКОМИЦЕТОВ
Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Мясоедова Н.М., Шебанова А.Д., Гайдина А.С., Коломыцева М.П. 35
- 1.32. ИЗУЧЕНИЕ АНАЛОГОВ BRISNOS-АССОЦИИРОВАННОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА КАПИТЕЛЛАЦИНА ИЗ МОРСКОЙ ПОЛИХЕТЫ *CAPITELLA TELETA*
Сафронова В.Н., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В. 36
- 1.33. ПРОТЕАЗА S ИЗ *RHOTORHABDUS LUMINESCENS* ОБЛАДАЕТ БИОТЕРИОТОКСИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ
Светлова А.О., Карасева М.А., Демидюк И.В. 37
- 1.34. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДАМИ СТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ
Соловьёва А.Ю., Хренова М.Г., Тихонова Т.В., Попов В.О. 38
- 1.35. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БЕЛКОВОГО ОКРУЖЕНИЯ НА ПЕРВИЧНЫЙ ДОНОР ЭЛЕКТРОНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИИ RHODOBACTER SPHAEROIDES С ТРЕМЯ АМИНОКИСЛОТНЫМИ ЗАМЕЩЕНИЯМИ H(L173)L+(L177)H+F(M197)H
Третчикова О.А., Фуфина Т.Ю., Васильева Л.Г. 39

1.36.	ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК КОКАТЕМЕРНЫХ КАНАЛОВ ASIC3 ЧЕЛОВЕКА И КРЫСЫ <i>Уграицкая В.М., Осмаков Д.И., Королькова Ю.В.</i>	40
1.37.	ИЗУЧЕНИЕ ПЕПТИДА НОВОГО СТРУКТУРНОГО КЛАССА ИЗ ЯДА МОРСКОЙ АНЕМОНЫ, МОДУЛИРУЮЩЕГО РАБОТУ КИСЛОТО-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИОННОГО КАНАЛА 1a ТИПА <i>Хасанов Т.А., Осмаков Д.И., Андреев Я.А., Козлов С.А.</i>	41
1.38.	ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТОКСИНА PaurTx-3 С МЕМБРАНОМОДЕЛИРУЮЩИМИ СРЕДАМИ И НАТРИЕВЫМ КАНАЛОМ Nav1.4 <i>Хорев А.С., Мышкин М.Ю., Лукьянов Д.К., Беркут А.А., Василевский А.А., Шенкарёв З.О.</i>	42
1.39.	ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ pH-СЕНСОР НА ОСНОВЕ ЖЕЛТОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА ИЗ <i>RHIALIDIUM</i> SP. <i>Чевочкина Е.С., Мартынов В.И., Пахомов А.А.</i>	43
1.40.	ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ TLR ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДОМ ЯМР <i>Шабалкина А.В., Гончарук С.А.</i>	44
1.41.	ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗ СЕРООКИСЛЯЮЩЕЙ БАКТЕРИИ <i>THIOALOBACTER THIOCYANATICUS</i> <i>Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Тихонова Т.В., Сорокин Д.Ю., Попов В.О.</i>	45

СЕКЦИЯ 2

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

2.1.	ДНК-ПОЛИМЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ PRIMPOL ЧЕЛОВЕКА НА МАТРИЦЕ С ВНУТРИЦЕПЕЧНОЙ ЦИСПЛАТИНОВОЙ СШИВКОЙ <i>Болдинова Е.О., Шилкин Е.С., Гагаринская Д.И., Макарова А.В.</i> ...	46
2.2.	ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕЛОМЕРНОЙ РОЛИ БЕЛКА Ars2 В ЯИЧНИКАХ ДРОЗОФИЛЫ <i>Борисов Е.Е., Шитова М.С., Калмыкова А.И.</i>	47
2.3.	РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ ЧЕЛОВЕКА РЕПЛИКАТИВНЫМ ФАКТОРОМ PolDIP2 <i>Бушугева В.А., Болдинова Е.О., Макарова А.В.</i>	48
2.4.	РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНА ФИТОЕНДЕСАТУРАЗЫ <i>NICOTIANA TABACUM</i> С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННОЙ дцРНК <i>Голубева Т.С., Черенко В.А., Филипенко Е.А., Кочетов А.В.</i>	49
2.5.	ОТВЕТ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА С НОКАУТОМ ГЕНА <i>PRIMPOL</i> НА ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК <i>Громова А.С., Болдинова Е.О., Ким Д.В., Чупров-Неточин Р.Н., Жарков Д.О., Макарова А.В.</i>	50
2.6.	РАЗРАБОТКА НОВЫХ ФОРМ БЕЛКА SpyCas9 И ПРОВЕРКА ИХ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМЫ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> НА ОСНОВЕ ГЕНА-МИШЕНИ <i>ADE2</i> <i>Давлетшин А.И., Гарбуз Д.Г., Спасская Д.С., Тютяева В.В., Карпов Д.С.</i>	51

2.7.	ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА КЛЕТОК ЯИЧНИКА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА СНО-S СИСТЕМОЙ CRISPR/Cas <u>Даянова Л.К., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И.</u>	52
2.8.	ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА <i>Dras1</i> <u>Картамышева Л.В., Сивопляс Е.А., Куликов А.М.</u>	53
2.9.	ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ С ЦЕЛЮ ПАСПОРТИЗАЦИИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ БИОТИПОВ ОСИНЫ <u>Кондратьева А.М., Гродецкая Т.А.</u>	54
2.10.	НЕГАТИВНЫЙ ФАКТОР ЭЛОНГАЦИИ NELF УЧАСТВУЕТ В АКТИВНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ ЭКДИЗОНОВОГО КАСКАДА ДРОЗОФИЛЫ <u>Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е.</u>	55
2.11.	РОЛЬ КОНСЕРВАТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ СУБДОМЕНА ModN В АКТИВНОСТИ PrimPoL <u>Манукян А.А., Болдинова Е.О., Макарова А.В.</u>	56
2.12.	ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ КОАКТИВАТОРА ТРАНСКРИПЦИИ SAYP В АКТИВАЦИИ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <u>Мусабиров А.А., Менчиц Я.А., Гузь А.В., Лебедева Л.А., Качаев З.М., Шидловский Ю.В.</u>	57
2.13.	ВЫДЕЛЕНИЕ И АКТИВНОСТЬ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ REV1 ЧЕЛОВЕКА <u>Новикова А.А., Столяренко А.Д., Шилкин Е.С., Полтораченко В.А., Макарова А.В.</u>	58
2.14.	СЕЛЕКЦИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ КАРПОВЫХ (<i>CYPRINIDAE</i>) ИЗМЕНЯЕТ КОРОТКИЕ ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ? <u>Орлов М.А., Тихонов А.Ю.</u>	59
2.15.	МАЛАЯ РНК MTS1338 - ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ФАКТОР ВИРУЛЕНТНОСТИ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <u>Острик А.А., Григоров А.С., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г.</u>	60
2.16.	ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПРОКАРИОТИЧЕСКОГО БЕЛКА СЕМЕЙСТВА АРГОНАВТОВ <u>Пантелеев В.А., Кропачева Е.В.</u>	61
2.17.	ВЛИЯНИЕ микроРНК НА ЭКСПРЕССИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ВЫСОКОКОНСЕРВАТИВНОГО ГЕНА <i>Dras1</i> <u>Сивопляс Е.А., Максимчук М.Д., Белкина Е.Г., Лазебный О.Е., Куликов А.М.</u>	62
2.18.	СИСТЕМЫ DGR В АНТИВИРУСНОМ ИММУНИТЕТЕ БАКТЕРИЙ <u>Соколов А.А., Белалов И.Ш., Летаров А.В.</u>	63
2.19.	РАЗРАБОТКА МЕТОДА МАССИРОВАННОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РЕПЕРТУАРОВ ГЕНОВ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЧЕЛОВЕКА НА ПЛАТФОРМЕ OXFORD NANOPORE <u>Ткаченко В.К., Лебедев Ю.Б., Мамедов И.З., Комков А.Ю.</u>	64

- 2.20. АКТИВНОСТЬ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ X-СЕМЕЙСТВА ЧЕЛОВЕКА НА МЕТИЛИРОВАННЫХ ДНК-МАТРИЦАХ
Хрячкова А.Ю., Шилкин Е.С., Петрова Д.В., Жарков Д.О., Макарова А.В. 65
- 2.21. ЗОНДИРОВАНИЕ G-КВАДРУПЛЕКСНЫХ СТРУКТУР В ПРОТЯЖЕННОЙ ДНК ПРОМОТОРА ОНКОГЕНА МЫС
Чащина Г.В., Лукьянова А.В., Бениаминов А.Д., Калужный Д.Н. .. 66
- 2.22. ДНК-ПОЛИМЕРАЗНАЯ И ТРАНСЛЕЗИОННАЯ АКТИВНОСТИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ Р118L И Р365R POL ΙΟΤΑ ЧЕЛОВЕКА
Шилкин Е.С., Макарова А.В. 67

СЕКЦИЯ 3

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ, УГЛЕВОДОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

- 3.1. АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АЛЛЕНОКСИДСИНТАЗЫ В AOS-RNAi РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ
Буряк В.И., Пиголев А.В., Мирошниченко Д.Н., Клементьева А.А. .. 68
- 3.2. МЕХАНИЗМЫ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ N-АЦИЛДОФАМИНОВ НА КЛЕТКИ НЕОПЛАЗИЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ
Гамисония А.М., Акимов М.Г., Бобров М.Ю., Грецкая Н.М., Безуглов В.В. 69
- 3.3. ФУНКЦИОНАЛЬНО-СПЕЙСЕРИРОВАННЫЕ КОНСТРУКЦИИ КАК ИНСТРУМЕНТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВИРУСА ГРИППА
Ермолаева Д.Р., Рыжов И.М., Бовин Н.В., Zubkova O., Шилова Н.В. .. 70
- 3.4. D-SELF МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ГЛИКОГЕНА НА ОСНОВЕ ЭМПИРИЧЕСКИХ КОЭФФИЦИЕНТОВ АВТОМОДЕЛЬНОСТИ
Иванов-Ростовцев П.А. 71
- 3.5. ВСТРАИВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЛИКОЛИПИДОВ В БАКТЕРИИ И КЛЕТКИ
Комарова В.А., Рапопорт Е.М., Рыжов И.М., Попова И.С., Тузиков А.Б., Бовин Н.В. 72
- 3.6. УЧАСТИЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ В АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА
Липатников А.Д., Пазынина Г.В., Бовин Н.В., Шилова Н.В. 73
- 3.7. ЛИОТРОПНЫЕ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ НЕОГЛИКОЛИПИДОВ
Масленников А.М., Шестопалова М.С., Залыгин А.В., Штыкова Э.В., Олейников В.А. 74
- 3.8. ГЛИКОЭРРЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УГЛЕВОД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ РАСТЕНИЙ
Никифорова А.В., Патова О.А., Хлопин В.А., Бовин Н.В., Шилова Н.В. 75

- 3.9. СИНТЕЗ FSL-КОНСТРУКТА НА ОСНОВЕ КЛАСТЕРА (A_{TETRA}(ТИП 2))₃-β-DD
Петракова Д.О., Рыжов И.М., Тузиков А.Б., Бовин Н.В. 76
- 3.10. СИНТЕЗ А-ТРИСАХАРИДНОГО БЛОКА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕПТАСАХАРИДА А (ТИП 3)
Савченко М.С., Рыжов И.М., Попова И.С., Бовин Н.В. 77

СЕКЦИЯ 4

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

- 4.1. СИНТЕЗ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГКР-УСИЛИВАЮЩИХ КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРОВ СЕРЕБРА
Алтунина А.В., Шестопалова М.С., Залыгин А.В., Олейников В.А. ... 78
- 4.2. ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ОДИНОЧНЫХ ЧАСТИЦ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРУКТУРЫ МОНОНУКЛЕОСОМ
Андреева Т.В., Чертков О.В., Малюченко Н.В., Студитский В.М., Феофанов А.В. 79
- 4.3. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ pH-СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ АРИЛИДЕНИМИДАЗОЛОНОВ
Балеева Н.С., Баранов М.С. 80
- 4.4. НОВЫЕ СОЛЬВАТОХРОМНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КРАСИТЕЛИ НА ОСНОВЕ ХРОМОФОРА БЕЛКА Kaede
Зайцева Э.Р., Смирнов А.Ю. 81
- 4.5. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНКазной АКТИВНОСТИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
Калинин Д.С., Трофимова П.В., Ерем М.А., Грановский И.Э. 82
- 4.6. КООПЕРАТИВНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДИМЕРНОГО ФЕРМЕНТА ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ С СУБСТРАТОМ (АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТОЙ) И КОФАКТОРОМ ГЕМОМ
Кривошей А.В., Ефремов А.А., Матвейшина Е.К., Панова В.В., Вржещ П.В. 83
- 4.7. ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ЛИПИД-ДЕТЕРГЕНТНЫХ ЧАСТИЦ В СМЕСЯХ ТРИФТОРЭТАНОЛ-ВОДА
Мотов В.В., Кот Э.Ф., Гончарук С.А., Арсеньев А.С., Минеев К.С. . 84
- 4.8. НОВЫЕ ФЛУОРОГЕНЫ ДЛЯ БЕЛКА FAST С РАСШИРЕННЫМ ЦВЕТОВЫМ РАЗНООБРАЗИЕМ
Мяснянко И.Н., Балеева Н.С., Баранов М.С. 85
- 4.9. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА КОМПОЗИТА НА ОСНОВЕ МЕЛАНИНА *INONOTUS OBLIQUUS* (ЧАГИ) И СЕЛЕНОМЕТИОНИНА
Прозорова И.Ш., Сысоева М.А. 86
- 4.10. РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИЗМЕРЕНИЯ pH
Симонян Т.Р., Мамонтова А.В., Лукьянов К.А., Богданов А.М. 87

4.11.	КОНЬЮГАТ НАНОЧАСТИЦ С ТРЕТЬИМ ДОМЕНОМ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА: ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ И АНАЛИЗА ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ <i>Сокол М.Б., Зенин В.А., Яббаров Н.Г., Моллаева М.Р., Фомичева М.В., Никольская Е.Д.</i>	88
4.12.	ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРОСТРАНСТВЕННО-ЗАТРУДНЕННЫХ ФЕНОЛОВ <i>Филиппова М.И., Эшмуратова О.Т., Шамсутдинова Л.П.</i>	89
4.13.	СОЗДАНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФОСФОНАТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГРИЗЕОФУЛЬВИНА НА ОСНОВЕ ОКСИМОВ И ГИДРАЗОНОВ <i>Хисамов М.М., Сольев П.Н.</i>	90
4.14.	НОВАЯ РЕАКЦИЯ СОЧЕТАНИЯ ЭФИРОВ АЗОДИКАРБОКСИЛАТОВ С 8-ГИДРОКСИХИНОЛИНОМ - МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ С ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ АНТИ-ВИЧ АКТИВНОСТЬЮ <i>Шерман Д.К., Сольев П.Н.</i>	91

СЕКЦИЯ 5

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЗНАВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛ И ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В КЛЕТКЕ

5.1.	ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПЕРВИЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ <i>Гондаренко Е.А., Антипова Н.В., Павлюков М.С., Шахпаронов М.И., Цетлин В.И., Кудрявцев Д.С.</i>	92
5.2.	ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS 9 ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА ЧЕРЕЗ РЕЦЕПТОР GPR55 <i>Дегтярева К.О., Серова О.В., Акимов М.Г., Дудина П.В., Шерстяных Г.Д., Деев И.Е., Петренко А.Г., Безуглов В.В.</i>	93
5.3.	ИНГИБИТОР R13-КИНАЗЫ R1 828 ЯВЛЯЕТСЯ АНТАГОНИСТОМ МУСКАРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ <i>Дымова Е.А., Соколова Е.А.</i>	94
5.4.	ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ МЕТОДАМИ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ КАЛЬЦИЯ <i>Исаева А.С., Кудрявцев Д.С., Баркова Д.В., Спирина Е.Н., Кашеверов И.Е., Цетлин В.И.</i>	95
5.5.	КАРТИРОВАНИЕ ДОМЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ TRIM28 И Kaiso <i>Лобанова Я.В., Женило С.В.</i>	96
5.6.	ПОИСК НОВЫХ ИНТЕРАКТОРОВ R73 ПРИ ПОМОЩИ ПРОКСИМАЛЬНОГО МЕЧЕНИЯ <i>Луппов Д.В., Пестов Н.Б.</i>	97

- 5.7. ДВОЙНОЙ МУТАНТ ТОКСИНА ВЕМ9 СЕЛЕКТИВЕН К НАТРИЕВЫМ КАНАЛАМ НАСЕКОМЫХ
Черных М.А., Кульдюшев Н.А., Пеньёр С., Беркут А.А., Титгат Я., Ефремов Р.Г., Василевский А.А., Чугунов А.О. 98

СЕКЦИЯ 6

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА

- 6.1. ПЛАСТИЧНОСТЬ НК-КЛЕТОК *IN VITRO*: АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ KIR2DL2/DL3
Алексеева Н.А., Кобызева П.А., Стрельцова М.А., Ерохина С.А., Коваленко Е.И. 99
- 6.2. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ НК-КЛЕТОК, НАПРАВЛЕННАЯ НА УЛУЧШЕНИЕ ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСДУКЦИИ ГЕНА АДАПТОРНОГО БЕЛКА DAP12
Величинский Р.А., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И. 100
- 6.3. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕДУРЫ РЕТРОВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ ГЕНА iCasp9 В НК-КЛЕТКИ С ЦЕЛЬЮ ИХ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ЭЛИМИНАЦИИ
Паламарчук А.И., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И. 101
- 6.4. ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЭНДОЛИЗОСОМАЛЬНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА МАКРОФАГАМИ ЧЕЛОВЕКА
Строкач Н.Н., Богданов И.В., Финкина Е.И., Зиганшин Р.Х., Овчинникова Т.В. 102
- 6.5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ АНТИГЕН-ПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ ВЕЗИКУЛ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ CAR-T КЛЕТОК
Украинская В.М., Рубцов Ю.П., Габибов А.Г., Масчан М.А., Степанов А.В. 103
- 6.6. РЕТРОВИРУСНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ ГЕНА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ ПРОХОДИТ НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНО В KIR2DL2/DL3⁺ НК-КЛЕТКАХ
Устюжанина М.О., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И. 104
- 6.7. АКТИВАЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ОПРЕДЕЛЯЕТ СПАЕЧНЫЙ ПРОЦЕСС
Царегородцева Д.С., Коновалова М.В., Коцарева О.Д., Свирицевская Е.В. 105
- 6.8. ЭФФЕКТ ЧАСТИЦ ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА НА АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ
Чудаков Д.Б., Коновалова М.С., Царегородцева Д.С., Фаттахова Г.В. 106
- 6.9. ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИОКСИДОНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ МЫШЕЧНОЙ СТАДИИ ТРИХИНЕЛЛЕЗА
Шитова А.А., Медведева В.С., Стрельникова И.А., Россохин Д.С. . 107

СЕКЦИЯ 7

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

- 7.1. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ БЕЛКОВ СПЛАЙСОСОМЫ В
МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ И РАЗВИТИИ
ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
Баймуханова Ж.Ж., Иванова О.М., Шнайдер П.В., Семенов И.А.,
Шендер В.О. 108
- 7.2. ДЕГИДРОГЕНАЗА D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗМЕНЕНИЯ
ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ПИРУВАТА
Басс Д.Ю., Потехина Е.С., Белоусов В.В. 109
- 7.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НОКАУТА ГЕНА *INSRR*,
КОДИРУЮЩЕГО РЕЦЕПТОР IRR, НА РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ
Гавриленкова А.А., Ганцова Е.А., Деев И.Е., Серова О.В.,
Петренко А.Г. 110
- 7.4. ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА *INSRR* НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКОВ
ПОЧКИ МЫШИ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ
Ганцова Е.А., Серова О.В., Можжев А.А., Деев И.Е., Петренко А.Г. 111
- 7.5. ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА SLURP-1 НА РОСТ И
МИГРАЦИЮ КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ ЛИНИЙ МЕЛАНОМЫ
Кириченко А.В., Бычков М.Л., Шлепова О.В., Шуленко М.А.,
Люкманова Е.Н. 112
- 7.6. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ SYK И FLT3 В ВЫЖИВАНИИ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА И РАКА
ЛЕГКИХ
Михеева А.М., Лебедев Т.Д., Ваганова Э.Р., Прасолов В.С. 113
- 7.7. ОЦЕНКА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО УРОВНЯ АКТИВНЫХ ФОРМ
КИСЛОРОДА, ИНДУЦИРОВАННОГО КАТАЛИТИЧЕСКОЙ
СИСТЕМОЙ MnCLTФП/АК
Моллаева М.Р., Никольская Е.Д., Сокол М.Б., Фомичева М.В.,
Яббаров Н.Г. 114
- 7.8. TRPA1 КАНАЛ КУРИЦЫ КАК ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ИНТРУМЕНТ
ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТЬЮ НЕЙРОНОВ И АСТРОЦИТОВ
Мухаметшина Л.Ф., Солюс Г.М., Мальцев Д.И., Подгорный О.В. ... 115
- 7.9. ИНГИБИТОР СИНТЕЗА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ 4-MU КАК
МОДУЛЯТОР ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА В АСТРОЦИТАХ
Никольская А.И., Чистяков Д.В., Сергеева М.Г. 116
- 7.10. ИЗМЕНЕНИЕ ЯДЕРНОЙ ЛАМИНЫ ПРИ СИНДРОМЕ КОККЕЙНА
Ноздрачева А.В., Плескач Н.М., Куранова М.Л. 117
- 7.11. УСТОЙЧИВОСТЬ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ СОВМЕСТНОМ
ДЕЙСТВИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ; РОЛЬ
ГЛОБАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ
Падий Д.А., Шевченко Н.А., Чурсина М.А., Плюта В.А. 118

7.12.	РАННЯЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ <i>IN VITRO</i> СОПРЯЖЕНА С ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ ИММУНОСУБЪЕДИНИЦ ПРОТЕАСОМ <i>Поденкова У.И.</i>	119
7.13.	МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ, ХАРАКТЕРНЫЕ ДЛЯ ГАМК-ЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ НОРМАЛЬНОМ СТАРЕНИИ <i>Разенкова В.А., Коржевский Д.Э.</i>	120
7.14.	ПОИСК ВОЗМОЖНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ И РАКОВЫХ КЛЕТОК ПРИ КО-КУЛЬТИВАЦИИ В 3D КОЛЛАГЕНОВОМ ГЕЛЕ <i>Ракитина О.А., Дидыч Д.А., Алексеенко И.В., Кузьмич А.И.</i>	121
7.15.	ДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА БИОПЛЕНКИ <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> И НА QUORUM SENSING СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ <i>Сидорова Д.Е., Скрипка М.И., Плюта В.А., Хмель И.А.</i>	122
7.16.	ОДНОВРЕМЕННЫЙ МОНИТОРИНГ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО И РЕТИКУЛЯРНОГО КАЛЬЦИЯ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ СЕНСОРОВ <i>Соколов В.В., Рогачевская О.А.</i>	123
7.17.	УКОРОЧЕННАЯ ВЕРСИЯ КАНАЛА TRPV1 ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКОГО УПРАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТЬЮ КЛЕТОК МОЗГА <i>Солюс Е.М., Солюс Г.М., Мальцев Д.И., Подгорный О.В.</i>	124
7.18.	ПОДВИЖНОСТЬ И КЛЕТОЧНОЕ ДЫХАНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЛОДОВОЙ МУШКИ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРУЕМОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ <i>Суконкина А.А., Усик М.А.</i>	125
7.19.	ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРУЕМОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ И ГИПЕРГРАВИТАЦИИ <i>Усик М.А.</i>	126
7.20.	ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТЕОМА ВЕЗИКУЛ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ ГЛИОБЛАСТОМЫ В ПРОЦЕССЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ТРАНСФОРМАЦИЙ <i>Чумакова Е.А., Зиганин Р.Х., Шахпаронов М.И., Павлюков М.С.</i> ..	127

СЕКЦИЯ 8

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

8.1.	ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЙТОВ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ФИБРИНОГЕНА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ БАЗЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА <i>Азарова Д.Ю., Гаврилина Е.С., Юрина Л.В., Васильева А.Д., Бугрова А.Е., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А.</i> ..	128
------	---	-----

8.2.	ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ СОРТАЗЫ А <i>Антипов А.Д., Мелихова Т.Д., Макаров Д.А., Терешин М.Н., Тузиков А.Б., Зинченко А.А.</i>	129
8.3.	КОЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ β -КОМПОНЕНТА ЛАНТИБИОТИКА ЛИХЕНИЦИДИНА И МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ЕГО ФЕРМЕНТА LchM2 В КЛЕТКАХ <i>E. COLI</i> <i>Антошина Д.В., Овчинникова Т.В., Баландин С.В.</i>	130
8.4.	ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ МЕДНО-ЦИНКОВОГО КОНЦЕНТРАТА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ МЫШЬЯКА <i>Артыкова А.В., Меламуд В.С., Булаев А.Г.</i>	131
8.5.	ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В БЕЛКЕ DARP _{in} 9_29 НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЕГО СВЯЗЫВАНИЯ С ЦЕЛЕВЫМ РЕЦЕПТОРОМ HER2/neu <i>Безвинова Е.А., Тишкин Г.В., Фролова А.Ю., Мартынов В.И., Пахомов А.А.</i>	132
8.6.	ИЗУЧЕНИЕ <i>IN VIVO</i> ТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ГЕРМАНИЯ <i>Беляев Я.Б., Зелепукин И.В., Деев С.М.</i>	133
8.7.	ПРИМЕНЕНИЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО CD19/CD3 АНТИТЕЛА ДЛЯ КОНТРОЛЯ АКТИВНОСТИ Т-КЛЕТОК, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ХИМЕРНЫМ АНТИГЕННЫМ РЕЦЕПТОРОМ CD3 ϵ -CAR <i>Волков Д.В., Калинин Р.С., Степанов А.В., Масчан М.А., Габибов А.Г.</i>	134
8.8.	СОЗДАНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО И ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ВЫДЕЛЕНИИ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ COVID-19 AMР <i>Гончарова Е.А., Долгова А.С., Кассиров И.С., Сбарцалья В.А., Дедков В.Г.</i>	135
8.9.	ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ <i>IN VITRO</i> КЛОНОВ ТОПОЛЯ К ВОЗДЕЙСТВИЮ СОЛЕВОГО СТРЕССА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ И СЕРЕБРА <i>Гродецкая Т.А., Федорова О.А., Евлаков П.М.</i>	136
8.10.	МЕТАЛЛ-ОРГАНИЧЕСКИЕ КАРКАСНЫЕ СТРУКТУРЫ ТИПА MIL-101 (Fe) ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ПРЕПАРАТОВ В ЛЕГКИЕ <i>Грязнова О.Ю., Зелепукин И.В., Деев С.М.</i>	137
8.11.	ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ НА БИООКИСЛЕНИЕ СУЛЬФИДНОГО КОНЦЕНТРАТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ <i>Ёлкина Ю.А., Булаев А.Г.</i>	138
8.12.	КЛЕТОЧНАЯ БЛОКИРОВКА СИСТЕМЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ <i>Зелепукин И.В., Никитин М.П., Деев С.М.</i>	139
8.13.	СЕЛЕКЦИЯ АУТОРЕАКТИВНЫХ В-КЛЕТОК ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ <i>Ишина И.А., Ломакин Я.А.</i>	140

- 8.14. КОНТРОЛИРУЕМЫЕ Т-КЛЕТКИ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ХИМЕРНЫМИ АНТИГЕННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ, НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА БАРНАЗА-БАРСТАР ДЛЯ АДОПТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА
Калинин Р.С., Черников И.В., Зенкова М.А., Шипунова В.О., Шульга А.А., Деев С.М., Степанов А.В., Габитов А.Г. 141
- 8.15. РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЕКТИНОВ В ОБРАЗОВАНИИ БИОПЛЕНОВ
Клементьев С.В., Кобелев А.В., Сироткин А.С. 142
- 8.16. ПОЛУЧЕНИЕ СВОБОДНОГО ОТ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА SARS-CoV-2 В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ
Колесов Д.Э., Синегубова М.В., Орлова Н.А., Воробьев И.И. 143
- 8.17. СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА АДРЕСНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ СВЕТОИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРТЕРМИИ РАКОВЫХ КЛЕТОК
Комедчикова Е.Н., Шипунова В.О., Прошкина Г.М., Деев С.М. . 144
- 8.18. ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛ- β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА СВЯЗЫВАНИЕ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ
Копнова Т.Ю., Скуреева А.А., Якупова Л.Р., Кудряшова Е.В. ... 145
- 8.19. КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ
Котельникова П.А., Шипунова В.О., Деев С.М. 146
- 8.20. ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИХ НАНОАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК
Кочарян А.Г., Яременко А.В., Никитин М.П. 147
- 8.21. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ СУПЕРПАРАМАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И КОНЦЕНТРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА СТЕВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*
Красавина Д.А., Бобков Д.Е., Шатрова А.Н., Шевцов М.А., Юдинцева Н.М. 148
- 8.22. МАКРОПОРИСТЫЕ ХИТОЗАНОВЫЕ ГУБКИ С ПАМЯТЬЮ ФОРМЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЗАДАЧ
Крупкин Е.А., Сочилина А.В., Акасов Р.А., Вихров А.А. 149
- 8.23. РАЗРАБОТКА ПИЛОТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СУБСТАНЦИИ ТЕРИПАРАТИДА
Крюкова А.В., Степаненко В.Н., Макаров Д.А., Воробьева Т.В., Соколова И.В., Терешин М.Н., Мягких И.В. 150
- 8.24. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НИКОТИНОВОГО РЕЦЕПТОРА ТИПА $\alpha 7$ В КЛЕТКАХ НЕК293
Кукушкин И.Д., Бычков М.Л., Шулепо М.А., Евдокимова А.О., Шлепова О.В., Люкманова Е.Н. 151

- 8.25. СУПРАМОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА НА ОСНОВЕ МЕЛАМИНА И
ЦИАНУРАТА ДЛЯ ИНКАПСУЛЯЦИИ ДНК
Куракина Т.А., Дубовиченко М.В., Кацуба К.Е., Колпацников Д.М.,
Скорб Е.В. 153
- 8.26. РАЗРАБОТКА И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ВЫСОКОАФФИННЫХ АГЕНТОВ НА ОСНОВЕ СКАФФОЛДОВЫХ
РАСПОЗНАЮЩИХ БЕЛКОВ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ
HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ
Макаров А.Д., Шипунова В.О., Прошкина Г.М., Деев С.М. 154
- 8.27. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТА И ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТА
ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТ ГИДРОЛАЗЫ *IDEONELLA SAKAIENSIS*
Макарова Анна В., Макарова Алёна В., Болдинова Е.О.,
Шилкин Е.С. 155
- 8.28. СОЗДАНИЕ ВРЕТ-КОНЪЮГАТОВ ЛЮЦИФЕРАЗЫ И КВАНТОВЫХ
ТОЧЕК С ЦЕЛЬЮ УЛУЧШЕНИЯ БИОВИЗУАЛИЗАЦИИ
Маркелова Е.Е., Сизиков А.А., Волкова Е.А., Рынгач А.,
Яременко А.В., Никитин М.П. 156
- 8.29. БЛОКИРОВКА СИСТЕМЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ
НАНОАГЕНТАМИ В РАЗЛИЧНЫХ ИММУННЫХ СОСТОЯНИЯХ
Миркасымов А.Б., Зелепукин И.В., Никитин П.И., Никитин М.П.,
Деев С.М. 157
- 8.30. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ТРУДНООБОГАТИМЫХ
ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКИХ РУД
Нечаева А.В., Меламуд В.С., Булаев А.Г. 158
- 8.31. АДРЕСНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ
ПРЕПАРАТОВ
Никольская Е.Д., Сокол М.Б., Моллаева М.Р., Фомичева М.В.2,
Яббаров Н.Г. 159
- 8.32. ЭФФЕКТ МАКРОЭЛЕМЕНТОГО СОСТАВА СРЕДЫ СОДЕРЖАНИЯ НА
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ *DROSOPHILA MELANOGASTER*
Обозина А.С., Симоненко С.Ю., Исатаева Д., Дегтярёвская Т.Ю.,
Ларина С.Н., Шидловский Ю.В., Былино О.В. 160
- 8.33. НАПРАВЛЕННАЯ ПРЕЗЕНТАЦИИ ПЕПТИДОВ В СОСТАВЕ ГКГС
КЛАССА II С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ
Овчинникова Л.А., Ломакин Я.А. 161
- 8.34. БЕЛКОВАЯ КОРОНА ЛИПОСОМ - ДРУГ ИЛИ ВРАГ ЭФФЕКТИВНОЙ
ТЕРАПИИ?
Онищенко Н.Р., Третьякова Д.С., Водовозова Е.Л. 162
- 8.35. МИКРОМИЦЕТЫ *ASPERGILLUS RAPERI* И *ASPERGILLUS CANDIDUS*
КАК ПРОДУЦЕНТЫ ФЕРМЕНТОВ С АКТИВНОСТЬЮ К БЕЛКАМ
СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА
Очнева А.Г., Осмоловский А.А. 163

8.36.	ПОДБОР ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ ДЛЯ СТИМУЛИРОВАНИЯ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПОДЗЕМНЫХ ВОД ПРИ <i>IN SITU</i> БИОРЕМЕДИАЦИИ <u>Попова Н.М., Сафонов А.В.</u>	164
8.37.	ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ КОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ НАЦЕЛЕННОЙ ДОСТАВКИ МОКСИФЛОКСАЦИНА К АЛЬВЕОЛЯРНЫМ МАКРОФАГАМ ЛЕГКОГО <u>Рокосовина В.В., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В.</u>	165
8.38.	ПОЛУЧЕНИЕ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ШИПОВИДНОГО БЕЛКА SARS-CoV-2 В СТАБИЛЬНО ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ЛИНИИ СНО <u>Синегубова М.В., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И.</u>	166
8.39.	ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ <u>Скрипка М.И., Сон Л.В., Кудрявцев Д.С., Кашеверов И.Е., Цетлин В.И.</u>	167
8.40.	ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ ПОЛИМЕРОВ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ <i>E. COLI</i> <u>Скуредина А.А., Тычинина А.С., Гольшиев С.А., Белогурова Н.Г., Кудряшова Е.В.</u>	168
8.41.	ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ БИМОДАЛЬНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> <u>Согомонян А.С., Шипунова В.О., Деев С.М.</u>	169
8.42.	МЕХАНОИНДУЦИРУЕМАЯ КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ, ВЫЗВАННАЯ НИЗКОЧАСТОТНЫМ ВЫСОКОГРАДИЕНТНЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ <u>Соловьев В.Д., Шипунова В.О., Зелепукин И.В., Деев С.М.</u>	170
8.43.	ПРОИЗВОДНЫЕ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СОСТАВЕ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ <u>Сохранева В.А., Яббаров Н.Г., Труфанова А.А., Гроза Н.В., Моллаева М.Р., Сокол М.Б., Фомичева М.В., Никольская Е.Д.</u>	171
8.44.	РАЗРАБОТКА БИОКОМПОЗИТНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ТРОМБОВ <u>Супрунчук В.Е., Денисова Е.В.</u>	172
8.45.	ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФТОРХИНОЛОНА С ЛИПОСОМАМИ И КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНОЙ <u>Тычинина А.С., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В.</u>	173
8.46.	ПОЛИМЕРНЫЕ PLGA НАНОЧАСТИЦЫ, ЗАГРУЖЕННЫЕ ПЛАЗМОННЫМИ ЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА И МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АДРЕСНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ ДЛЯ ДОСТАВКИ К HER2- СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИМ РАКОВЫМ КЛЕТКАМ <u>Фирулева П.А., Шипунова В.О., Деев С.М.</u>	174

8.47.	НАНОЧАСТИЦЫ С ДАУНОРУБИЦИНОМ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК <i>Фомичева М.В., Моллаева М.Р., Сокол М.Б., Яббаров Н.Г., Никольская Е.Д.</i>	175
8.48.	ПОЛУЧЕНИЕ ХИТИН- И ХИТОЗАН-МЕЛАНИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ МУХИ ЧЕРНАЯ ЛЬВИНКА <i>Хайрова А.Ш., Лопатин С.А., Варламов В.П.</i>	176
8.49.	АСПЕКТЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ФОСФОРА В МИКРОБНОЙ ДЕФОСФОТАЦИИ СТОЧНЫХ ВОД <i>Хасанова А.А., Хабибуллина А.Р., Вдовина Т.В., Перушкина Е.В., Сироткин А.С.</i>	177
8.50.	ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД ЭКСТРАКЦИИ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ РОДА <i>BACILLUS</i> <i>Цветкова Д.В., Чернышов С.В., Микулинская Г.В.</i>	178
8.51.	ТЕПЛОВАЯ АГРЕГАЦИЯ ДРОЖЖЕВОЙ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ. ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И (2-ГИДРОКСИПРОПИЛ)- β - ЦИКЛОДЕКСТРИНА <i>Черников А.М., Борзова В.А., Михайлова В.В., Курганов Б.И.</i>	179
8.52.	ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ РАЗЛАГАТЬ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМЕРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ <i>Шебанова А.Д., Ренфельд Ж.В., Казакова А.А., Черных А.М., Гайдина А.С., Мясоедова Н.М., Коломыцева М.П.</i>	180
8.53.	ГИБРИДНЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ ДЛЯ ОНКОТЕРАНОСТИКИ <i>Шипунова В.О., Деев С.М.</i>	181
8.54.	НАНОКОМПЛЕКС Хлорина Е ₆ И НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА <i>Цока Е.В., Суворов Н.В., Никитин А.А., Миронов А.Ф., Грин М.А.</i> ..	182
8.55.	НОВЫЕ УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ЛИНКЕРЫ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ АНТИТЕЛ <i>Яббаров Н.Г., Сокол М.Б., Никольская Е.Д., Моллаева М.Р., Фомичева М.В.</i>	183
8.56.	TRAIL DR5-В-КОНЬЮГИРОВАННЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛИ <i>Яголович А.В., Артыков А.А., Гаспарян М.Э., Курбанова Л.А., Марквичева Е.А., Куликов П.П., Кусков А.Н.</i>	184
8.57.	ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ <i>Якупова Л.Р., Копнова Т.Ю., Скуреедина А.А., Кудряшова Е.В.</i> ...	185
8.58.	БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕДНО-НИКЕЛЕВОЙ РУДЫ <i>Янишевская Е.С., Меламуд В.С., Булаев А.Г.</i>	186
8.59.	НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕДЕНИЯ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В КРОВОТОКЕ <i>Яременко А.В., Зелепукин И.В., Миркасымов А.Б., Яременко Т.В., Деев С.М., Никитин П.И., Никитин М.П.</i>	187

- 8.60. ДЕЙСТВИЕ ПЕРСУЛЬФАТОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ И СОДЕРЖАНИЕ
КАРОТИНОИДОВ В КУЛЬТУРАХ ДРОЖЖЕЙ
Ячкула А.А., Делеган Я.А., Антипова Т.В., Вайнштейн М.Б. 188
- 8.61. ПРИМЕНЕНИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА
RAENIVACILLUS ДЛЯ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ СИЛИКАТНЫХ РУД
Ячкула А.А., Якуив А.А., Быков А.Г., Абашина Т.Н.,
Вайнштейн М.Б. 189

СЕКЦИЯ 9

БИМЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- 9.1. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ СТЕПЕНИ АКТИВНОСТИ МИОМЫ МАТКИ У
ПАЦИЕНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА
Азадова Г.Я., Леваков С.А., Мамедова А.Э., Павлюков М.С.,
Маслякова М.И., Чекова М.Д., Шахпаронов М.И., Антипова Н.В. ..190
- 9.2. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БОГАТОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ НА
КЛЕТКИ ЭНДОМЕТРИЯ КРЫСЫ
Артемова Д.А., Вишнякова П.А. 191
- 9.3. ВЗАИМОСВЯЗЬ КАЛЬЦИЕВОГО ОТВЕТА НЕЗРЕЛЫХ
ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК В ТИПИЧНЫХ МЕСТАХ РАЗВИТИЯ
АТЕРОСКЛЕРОЗА С ЛИПОПРОТЕИДАМИ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ
Балацкий А.В., Ожигалов И.Д., Балацкая М.Н., Попов В.С.,
Калинина Н.И. 192
- 9.4. СЕРЕБРЯНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ
ФОТОТЕРМИЧЕСКИ-ИНДУЦИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ HER2-
СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК
Белова М.М., Шипунова В.О., Деев С.М. 193
- 9.5. ОТСУТСТВИЕ ХАРАКТЕРНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ
ИЗМЕНЕНИЙ В ПОПУЛЯЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА
Вавилова Ю.Д., Бойко А.А., Стрельцова М.А., Ерохина С.А.,
Коваленко Е.И., Сапожников А.М. 194
- 9.6. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОДУКТОВ
ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ ДЕСТРУКЦИИ НОСИТЕЛЕЙ,
ИСПОЛЗУЮЩИХСЯ ПРИ СОЗДАНИИ КОМПЛЕКСНОГО
ПЕРЕВЯЗОЧНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГНОЙНО-
НЕКРОТИЧЕСКИХ РАН
Ванюшенкова А.А., Белов А.А. 195
- 9.7. ВЛИЯНИЕ РИФАМПИЦИНА НА СОДЕРЖАНИЕ мРНК ГЕНОВ
ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПРИЛЕЖАЮЩЕМ ЯДРЕ МОЗГА
КРЫС
Васильева В.Ю., Данильченко Е.А., Ереско С.О., Айрапетов М.И. .196
- 9.8. МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ОТБОРА С ПОМОЩЬЮ ГЕННЫХ СЕТЕЙ
Ваулин А.Н., Касьянов А.С., Морозова И.Ю. 197
- 9.9. ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНАХ У
МЫШЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ МИЛДРОНАТА
Вишняков А.В., Горелов Е.Н., Валов С.Л., Саляхутдинов Р.Р.,
Чонтян Д.А. 198

- 9.10. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕПАТОЦИТАХ ПРИ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С: ИССЛЕДОВАНИЕ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ СРЕДЕ
Голиков М.В. 199
- 9.11. ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕЗАЗУРИНА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В КОЛЛАГЕНОВОМ ГИДРОГЕЛЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
Гречаная Ю.С., Журенков К.Э., Александрова О.И. 200
- 9.12. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ САМООРГАНИЗУЮЩИХСЯ СУПРАМЕРОВ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ С ЦИКЛОДЕКСТРИНОВОЙ ГРУППОЙ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ
Заец К.В., Васкан И.С., Залыгин А.В., Олейников В.А. 201
- 9.13. ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ НА РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА ГЕПАТИТА С
Земская А.С., Щербакова А.С., Кондукторов К.А., Кочетков С.Н., Козлов М.В. 202
- 9.14. *NEISSERIA GONORRHOЕAE*: ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ В РОССИИ И В МИРЕ
Кандинов И.Д., Кравцов Д.В., Дементьева Е.И., Грядунов Д.А., Шаскольский Б.Л., Кубанов А.А., Комягина Т.М., Дерябин Д.Г. .. 203
- 9.15. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ТЕРАПИИ HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ
Колесникова О.А., Шипунова В.О., Соловьев В.Д., Деев С.М. 204
- 9.16. ИММУНОСУПРЕССИЯ У ВРАЧЕЙ, РАБОТАЮЩИХ С БОЛЬНЫМИ COVID-19
Коновалова М.В., Пырегов А.В., Полтавцева Р.А., Свищевская Е.В. . 205
- 9.17. АНАЛИЗ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ ПЕПТИДНОГО ПАТТЕРНА СЫВОРОТКИ/ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ПОИСКА ПЕПТИДНЫХ БИОМАРКЕРОВ
Кузьмина Е.О., Арапиди Г.П. 206
- 9.18. ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КАПСУЛЫ ДЛЯ АКТИВНОЙ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ
Курбанова Л.А., Гилева А.М., Яголович А.В., Смирнов И.В., Трушина Д.Б., Марквичева Е.А. 207
- 9.19. РОЛЬ СТАТУСА P53 В ОТВЕТЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ИОНИЗИРУЮЩЕЕ ИЗЛУЧЕНИЕ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ CDK8/19
Кучур О.А., Штиль А.А. 208
- 9.20. НОВЫЕ ПОЛИФАРМАКОФОРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ К ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИМ НЕЙРОНАМ
Лаврова А.В., Акимов М.Г., Фомина-Агеева Е.В., Грецкая Н.М., Безуглов В.В. 209

9.21.	ОЦЕНКА ВИТАМИННОГО СТАТУСА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДАМИ ЯМР-МЕТАБОЛОМИКИ <i>Ларичева Д.И., Марьясина С.С., Вараева Ю.Р., Стародубова А.В., Польшаков В.И.</i>	210
9.22.	ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ФУНГИЦИДА ТИРАМА <i>Макимова В.П., Усалка О.Г., Попова В.Г., Якубовская М.Г., Курсанов К.И.</i>	211
9.23.	РОЛЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В РАЗВИТИИ ЭНДОМЕТРИОЗА ЯИЧНИКОВ <i>Мамедова А.Э., Леваков С.А., Азадова Г.Я., Павлюков М.С., Маслякова М.И., Чекова М.Д., Шахпаронов М.И., Антипова Н.В.</i> ..	212
9.24.	СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ ГЛЮКАГОН-ПОДОБНОГО ПЕПТИДА 1 ЛИРАГЛУТИД УЛУЧШАЕТ ИНСУЛИНОВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АДИПОЦИТОВ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ 3T3-L1 И ВЛИЯЕТ НА КИНЕТИКУ МИТОГЕННОЙ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ КИНАЗ <i>Мамонтова Е.Д., Мичурина С.С., Подкуйченко Н.В., Соркина Е., Стафеев Ю.С., Меньшиков М.Ю., Шестакова М., Парфенова Е.В.</i>	213
9.25.	БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЛИНКЕРЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИЛАМИНА ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ КАРБОНИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ <i>Мелешкина Е.Г., Говтвань А.О., Волков Т.М., Брылёв В.А., Коришун В.А., Сапожникова К.А.</i>	214
9.26.	ЗНАЧЕНИЕ lincROR И lincSURV В РАЗВИТИИ ДИСПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ <i>Обухова Е.А., Павлюков М.С., Шахпаронов М.И., Леваков С.А., Шешукова Н.А., Антипова Н.В.</i>	216
9.27.	РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОННОЙ ПЛОТНОСТИ В МИЦЕЛЛАХ НА ОСНОВЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ СО СПЕЙСЕРНОЙ ГРУППОЙ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ <i>Приходько А.Т., Шестопалова М.С., Залыгин А.В., Олейников В.А.</i>	217
9.28.	ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТРИХИНЕЛЛЕЗНОЙ ИНВАЗИИ НА СЕЛЕЗЕНКУ <i>Родыгин Д.А., Погудина Д.К., Ершова М.И.</i>	218
9.29.	ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОБИОТИКОТЕРАПИИ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ <i>Руденко Г.П., Руденко П.А., Руденко В.Б., Руденко А.А.</i>	219
9.30.	ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ NGS <i>Сай А.В., Мацвай А.Д., Киселев Д.А., Гордукова М.А., Хахина А.О., Михайлов И.М., Шипулин Г.А.</i>	220
9.31.	ЦИТОКИНОВЫЙ ШТОРМ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ <i>Сергеев А.А., Коновалова М.В., Константинова Е.В., Богданова А.А., Свирицевская Е.В.</i>	221

9.32.	БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПЛЕНКИ И МАКРОПОРИСТЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ <i>Толстова Т.В., Мамедова А.Р., Терехова В.В., Тетерева Е.А., Дроздова М.Г., Демина Т.С., Сажнев Н.А., Черногорцева М.В., Кильдеева Н.Р., Марквичева Е.А.</i>	222
9.33.	ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЦЕНТРАЦИОННОЙ ЗАВИСИМОСТИ МИЦЕЛЛ НЕОГЛИКОЛИПИДА А (ТУРЕ 2) sp-Ad-DE МЕТОДОМ МУРР <i>Троицкая П.С., Шестопалова М.С., Залыгин А.В., Олейников В.А.</i>	223
9.34.	ДЕЙСТВИЕ НА КОЛЛАГЕН ПРОТЕАЗ В ПРИСУТСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ <i>Тузова Е.С., Белов А.А.</i>	224
9.35.	КОЛИЧЕСТВО НЕЗРЕЛЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК В АОРТЕ МЫШЕЙ УВЕЛИЧИВАЕТСЯ С ВОЗРАСТОМ <i>Филатова Ю.Г., Савина А.Д., Балацкая М.Н., Попов В.С., Калинина Н.И., Балацкий А.В.</i>	225
9.36.	ГИБРИДНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА рН1Р И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ К РАКОВЫМ КЛЕТКАМ И ИХ ЭЛИМИНАЦИИ В УСЛОВИЯХ АЦИДОЗА <i>Фролова А.Ю., Пахомов А.А., Мартынов В.И.</i>	226
9.37.	СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НОВЫХ АНАЛОГОВ ИНГИБИТОРА ТРАНСПОРТЁРА ДОФАМИНА GBR12909 <i>Хейфец Е.В., Лаврова А.В., Акимов М.Г., Фомина-Агеева Е.В., Грецкая Н.М.</i>	227
9.38.	ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ TRAIL НА МУЛЬТИФОРМНУЮ ГЛИОБЛАСТому <i>Чичварин В.А., Яголович А.В., Антипова Н.В., Павлюков М.С., Гаспарян М.Э., Шахпаронов М.И.</i>	228
9.39.	ИНГИБИРОВАНИЕ ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ КИНАЗ 4 И 6 В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ ЧЕЛОВЕКА ИМИТИРУЕТ ДЕЙСТВИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С <i>Щербакова А.С., Земская А.С., Кочетков С.Н., Козлов М.В.</i>	229
	АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	230