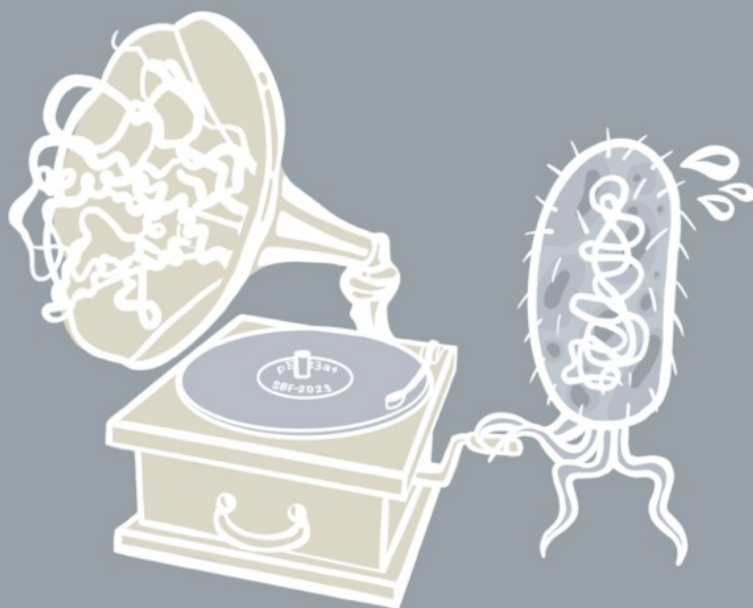


том I

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

III СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ



12—13 марта 2023 года



КАФЕДРА БИОХИМИИ

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет
Кафедра биохимии

III межвузовская студенческая конференция

СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2023

12-13 марта 2023 г.
Материалы конференции

Том I

УДК 577
ББК 28.07

*Оргкомитет благодарит руководство биологического факультета
МГУ за помощь в проведении конференции и издании настоящего
сборника*

Оргкомитет конференции

А.Г. Катруха (председатель оргкомитета), Д.В. Серебряная
(ответственный секретарь), М.В. Судницына, М.В. Уфимцева,
Ю.В. Храмова, Р.И. Раевский, Д.А. Адашева, Е.П. Альтшулер

СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2023: III
межвузовская студенческая конференция: 12-13 марта 2023 г.,
Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет:
Материалы конференции, том I / Отв. ред. А.Г. Катруха. Сост.
Е.П. Альтшулер

Научное издание

III межвузовская студенческая конференция
СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2023
12-13 марта 2023 г.

Составление и верстка: Е.П. Альтшулер
Дизайн обложки: Е.С. Беличенко

УДК 577
ББК 28.07

12 МАРТА воскресенье

9.00–10.00

Регистрация и размещение постеров на стендах; утренний кофе в рекреации перед Большой Биологической Аудиторией (ББА)

10.00–10.10

Открытие форума, вступительное слово декана биологического факультета МГУ д.б.н., академика РАН М.П. Кирпичникова

10.10–11.00

Пленарная лекция (аудитория ББА)

М.А. Лагарькова, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН.

Биохимия плюрипотентности

Секция «Биохимия»

(аудитория ББА, председатель – д.б.н. Н.Н. Случанко)

11.00–11.40

к.б.н., с.н.с В.А. Попков

(НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского)

Почки, митохондрии и окислительный стресс

11.40–11.55

Р.А. Маллаев, А.А. Полянский

(Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, лаборатория моделирования биомолекулярных систем)

Изучение аллостерической коммуникации биомолекул с использованием теории информации

11.55–12.25

перерыв (кофе, рекреация перед аудиторией ББА)

Секция «Молекулярная и клеточная биология» (аудитория ББА, председатель – к.б.н. К.Ю. Кулебякин)

12.25–13.05

д.б.н М.П. Никитин

(Московский Физико–Технический Институт,
университет «Сириус»)

Молекулярная коммутация: новый механизм хранения информации в ДНК

13.05 –13.20

**И.В. Копылова¹, В.О. Шендер^{1,2}, Г.П. Арапиди¹, Е.И. Шарова¹,
Л.О. Скородумова¹, А.Н. Богомазова^{1,2}, М.А. Лагарькова¹, О.С.
Лебедева^{1,2}**

**Подходы к моделированию болезни Паркинсона,
вызванной мутацией G2019S в киназе LRRK2, на изогенной
клеточной модели**

¹ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России, Россия, Москва

²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России

13.20 –13.35

**Б.М. Иванов¹, О.М. Антипова¹, Н.С. Самойленкова², В.А.
Брылев³, Г.В. Павлова^{2,4}, А.М. Копылов¹**

**Применение аптамеров к EGFR для таргетной доставки
доксирубина в клетки глиобластомы**

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

²Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко,

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,

⁴Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН

13.35-13.50

Д.К. Малинина¹, А.Л. Сивкина¹, А.В. Феофанов¹, В.М. Студитский^{1,2}

Белок Hmo1 влияет на структуру нуклеосом и обеспечивает АТФ-независимое разворачивание нуклеосом белковым комплексом FАСТ

¹Биологический факультет Московского государственного университета имени М. -В.Ломоносова, Москва, 119991, Россия;

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

13.50-14.50

перерыв (кофе, рекреация перед аудиторией ББА)

Секция «Физиология и медицинская биохимия»

(председатель – д.б.н. О.С. Тарасова)

14.50-15.30

к.б.н. О.В. Подгорный

(ИБХ РАН, отдел метаболизма и редокс-биологии)

Синтетические нейротехнологии в моделировании и терапии патологий мозга

15.30-15.45

А.П. Трифонова, Д.А. Котова, А.Д. Иванова, М.С. Почечуев, Ю.В. Храмова, М.А. Судоплатов, В.А. Катруха, А.Д. Сергеева, Р.И. Раевский, М.А. Солотенков, Федотов А.Б, В.В. Белоусов, А.М. Жёлтиков, Д.С. Билан

In vivo исследование роли пероксида водорода в развитии ишемического инсульта в модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета I типа у крыс *Rattus norvegicus* с помощью генетически кодируемого биосенсора HyPer7

ФГБУН Институт Биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Группа метаболических основ патологии, Москва, Россия

15.45–16.00

М.А. Орлова^{1,2}, Н.С. Курочкина¹, М.А. Виговский², Т.Ф. Вепхвадзе^{1,2}, П.А. Махновский¹, О.А. Григорьева², Е.М. Леднев¹, А.Ю. Ефименко², Д.В. Попов^{1,2}

Экспрессия высокопредставленных белков скелетной мышцы человека при старении

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

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

16.00–16.30

перерыв (кофе; рекреация перед аудиторией ББА)

Секция «Биоинженерия и биотехнология»

(председатель – к.б.н. Г.А. Носов)

16.30–17.10

к.б.н. Д.С. Билан

«Флуоресцентные сенсоры для биологии и медицины»

ИБХ РАН, группа метаболических основ патологий

17.10–17.25

С.С. Сабинин¹, В.С. Овечкина^{1,2}, А.В. Балацкий³, А.А. Ланин⁴, Д.Джэппи³, Е.С. Фетисова^{1,2}, И.В. Кельмансон^{1,2}, А.В. Розов³, А.Б. Федотов⁴, А.А. Можаяев^{1,2,5,6}, В.В. Белоусов^{1,2,3}

Управление активностью кардиомиоцитов и секретирующих гормоны клеток с помощью термогенетики

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН;

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова;

³Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва;

⁴МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет;

⁵ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН;

⁶НИУ ВШЭ, факультет биологии и биотехнологии

17.25-17.40

П.В. Филатов, Д.А. Горбенко, Палехова А.В., Д.Р. Дададжанов
Исследование кинетики хемилюминесценции,
индуцированной образованием гуанинового
квадруплекса, для детекции уникальных
последовательностей РНК организмов

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург

18.00-22.00

Культурная программа

13 МАРТА понедельник

10.00-11.30

Постерная сессия

все секции (просмотр постеров участниками других секций), рекреации перед аудиториями Малая 1(М1), ББА и рекреация на 2м этаже перед спуском на кафедру биохимии

11.30-12.00

перерыв (кофе; рекреация перед аудиторией ББА)

12.00-15.00

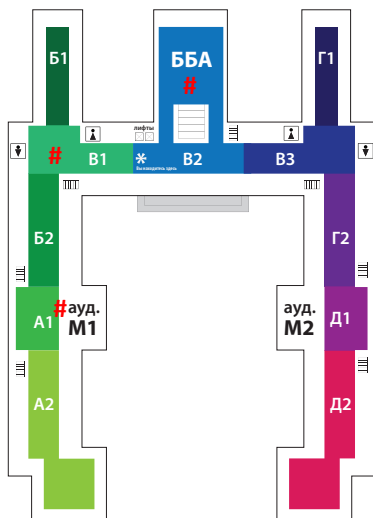
Постерная сессия (время обязательного присутствия у постера, беседа с жюри, рекреации перед аудиториями М1, ББА и рекреация на 2м этаже перед спуском на кафедру биохимии)

16.00-17.00

Закрытие форума, вручение призов победителям форума (аудитория ББА)

Схема здания биологического факультета

этаж сектор	2	3	4	5
A2	204-224 201-219	301-307 302-324	401-417 402-420	501-517 502-514
A1	M-1 220, 222a	317a-317b	4-4a	5-5a
B2	221-227 226-234	319-329 326-338	419-431 422-440	519-535 516-530
B1	229-239 236-250	331-343 340-360	433-445 442-458a	537-545 532-546
B1	241-245 230, 254-256	345-355 362a-370	449-459 460-464	547-555 548-552
B2	ББА 258	357-363	461-463 466-468	557-559г 500, 556
B3	247-255 260-266	365-375 372-380	497-499г 494-498ж	559a-571б 558-566
Г1	257-271 268-280	377-389 382-392	487-495 482-492	579-587 568-580
Г2	273-285 282-294	391-399 394-398	497-499г 494-498ж	582-594 589-599б
Д1	M-2	399e-399д		5д
Д2	287-299 296-298	399ж-399п 398a-398с	499e-499р 498и-498д	599в-599м 598-598и



Источник: <http://www.bio.msu.ru> (с модификациями)

На схеме символом «#» обозначены места, в которых будут проходить различные мероприятия конференции.

Контакты организаторов конференции



+7 916 173-47-10 Серебряная Дарья Владимировна
 +7 977 376-00-96 Уфимцева Мария Витальевна
 +7 985 923-22-48 Катруха Алексей Генрихович

Секция «Доклады»

Д1. Применение аптамеров к EGFR для таргетной доставки доксорубина в клетки глиобластомы

Б.М. Иванов (ivanovb661@yandex.ru)¹, О.М. Антипова¹, Н.С. Самойленкова², В.А. Брылев³, Г.В. Павлова^{2,4}, А.М. Копылов¹

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

²Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

⁴Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН

Введение. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) – значимый молекулярный маркер глиобластомы (ГБ), злокачественной опухоли головного мозга [1]. Доксорубин (ДОКС) – химиотерапевтический агент, связывается с двухцепочечной ДНК (дцДНК), блокирует топоизомеразу II и препятствует репарации ДНК, что приводит к гибели клеток. ДОКС проявляет высокую токсичность для здоровых клеток. Возможным решением этой проблемы является нацеливание на клетки ГБ с помощью таргетирующего агента. Аптамеры к EGFR – олигонуклеотиды, которые с высокой эффективностью и специфичностью узнают рецептор. В настоящей работе для нацеливания использовали ДНК аптамер к EGFR – GR20 [2].

Материалы и методы. Методом клик-химии по кето-группе ДОКСа получали ковалентный конъюгат с аптамером GR20. В альтернативном подходе ДОКС интеркалировали в аптамер с дополнительным участком, гибридным с комплементом, интеркаляция в “хвост”. Эффективность сборки комплекса анализировали методом флуоресцентного титрования, а эффективность действия комплекса и конъюгата на клетках определяли с помощью клеточного анализатора exCelligence.

Результаты. ДОКС эффективно интеркалирует в двухцепочечный “хвост” аптамера GR20 в микромолярных концентрациях. Полученный комплекс цитотоксичен для клеток фибробластов и клеток опухолевой культуры ГБ Sus.

Выводы. Доставка ДОКСа к опухолевым клеткам в составе нековалентного комплекса аптамера эффективна. Впервые проведено прямое сравнение действия ДОКСа, конъюгированного ковалентно с аптамером и интеркалированного в комплекс дцДНК. Для нековалентного комплекса ДОКСа с аптамером GR20 цитотоксичность выше чем у конъюгата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по соглашению №075-15-2020-809 (вн. номер 13.1902.21.0030).

Литература

1. Yang K, Wu Z, Zhang H *et al.*, Mol Cancer. 2022;21(1):39.
2. Zavyalova E, Turashev A, Novoseltseva A, *et al.*, 2020 ;30(3):175-187.

Д2. Подходы к моделированию болезни Паркинсона, вызванной мутацией G2019S в киназе LRRK2, на изогенной клеточной модели

И.В. Копылова (*ikopylova.msu@gmail.com*)¹, В.О. Шендер^{1,2}, Г.П. Арапиди¹, Е.И. Шарова¹, Л.О. Скородумова¹, А.Н. Богомазова^{1,2}, М.А. Лагарькова¹, О.С. Лебедева^{1,2}

¹ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России, Россия, Москва

²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России

Введение: Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, вызванное гибелью дофаминэргических нейронов (ДАН) чёрной субстанции. Наиболее частая причина наследственных форм БП – мутации в гене *PARK8*, кодирующем киназу LRRK2, которая участвует в ряде клеточных процессов: регуляции везикулярного транспорта, обмене митохондрий, аутофагии. Аутосомно-доминантная мутация G2019S в LRRK2 приводит к усилению киназной активности белка, рассматриваемой как фактор патогенеза. Предмет нашего исследования – инициаторные молекулярные события БП, ассоциированной с мутацией G2019S.

Материалы и методы: С помощью технологии CRISPR/Cas9 были созданы изогенные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с различными аллельными состояниями гена *PARK8* по мутации G2019S. Полученные с помощью направленной дифференцировки культуры ДАН охарактеризовали и на клеточном уровне анализировали с использованием проточной цитофлуориметрии, HPLC, Patch-clamp и иммунохимических методов. Постмитотические ДАН были собраны для транскриптомного, протеомного и фосфопротеомного анализов.

Результаты: На зрелых ДАН продемонстрировали различия в локализации и количестве аутофагосом и митохондрий в зависимости от состояния гена *PARK8*. Нейроны изогенной системы, у которых присутствует минимум один нормальный аллель *PARK8*, более чувствительны к действию протонофора CCCP по сравнению со здоровыми ДАН. Индуктор аутофагии трегалоза, рассматриваемый как возможный компонент вспомогательной терапии БП, стимулирует митофагию у всех нейронов.

По результатам фосфопротеомного анализа был определен круг потенциальных мишеней LRRK2. С помощью протеомного и транскриптомного анализа культур ДАН были выявлены дифференциально экспрессированные гены. Были обнаружены различия в экспрессии коллагенов между зрелыми ДАН, не содержащими мутацию G2019S в LRRK2, и нейронами, имеющими данную мутацию в гомо- и гетерозиготном состояниях.

Выводы: Полученные результаты расширяют имеющееся представление о характере ранних нейрональных нарушений, вызванных мутацией G2019S, и позволяют выявить ряд перспективных путей для более детального изучения.

Д3. Белок Hmo1 влияет на структуру нуклеосом и обеспечивает АТФ-независимое разворачивание нуклеосом белковым комплексом FACT

Д.К. Малинина (*daria99malinina@gmail.com*)¹, А.Л. Сивкина¹, А.В. Феофанов¹, В.М. Студитский^{1,2}

¹Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

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

Введение. Белок Hmo1 - представитель семейства ядерных негистоновых белков HMGB (high mobility group B) у *Saccharomyces cerevisiae*. Он участвует в транскрипции генов рибосомальных белков и рРНК, и стимулирует активность некоторых АТФ-зависимых ремоделеров 1-2[1]. Высказывалось мнение, что Hmo1 стабилизирует хроматин, выступая в роли линкерного гистона 3[2]. Известно, что В-домен белка Hmo1 гомологичен HMGB-домену белка Nhr6. Белок Nhr6 не влияет на структуру нуклеосом, но является необходимым фактором для работы АТФ-независимого ремоделирующего комплекса дрожжей FACT (facilitates chromatin transcription) 4[3]. В представляемой работе изучали воздействие на структуру нуклеосом как самого белка Hmo1, так и Hmo1 в присутствии дрожжевого комплекса FACT.

Материалы и методы. В работе использовались 4 типа моноклональных антител, содержащих пару флуоресцентных меток Cy5 и Cy3 на соседних витках ДНК в коровой области нуклеосомы или в спиральных линкерной ДНК. Комплексы нуклеосом с Hmo1 в присутствии и отсутствии FACT исследовали методами анализа изменения электрофоретической подвижности (EMSA) и FRET-микроскопии одиночных молекул в растворе (spFRET).

Результаты. Показано, что Hmo1 формирует комплексы с нуклеосомами. Методом spFRET-микроскопии установлено, что Hmo1 вносит обратимые изменения в укладку ДНК на октамере гистонов и увеличивает расстояние между спиральными линкерной ДНК нуклеосом и хроматосом. Обнаружено, что Hmo1

способствует связыванию комплекса FACT с нуклеосомой и обратимому FACT-зависимому, АТФ-независимому разворачиванию нуклеосом.

Выводы. Hmo1 обратимо влияет на укладку ДНК на октамере гистонов и изменяет конформацию линкерной ДНК как в нуклесоме, так и в хроматосомах, и, таким образом, не является аналогом линкерного гистона дрожжей. Hmo1 аналогично Nhr6 способствует АТФ-независимому ремоделированию нуклеосом белковым комплексом FACT.

Литература

1. DB Hall et al., Molecular and cellular biology **26** (9), 3672 (2006).
2. MI Hepp et al., Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms **1860** (3), 316 (2017).
3. A Panday and A Grove, Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **81** (1) (2017).
4. ME Valieva et al., Nature structural & molecular biology **23** (12), 1111 (2016).

Д4. Изучение аллостерической коммуникации биомолекул с использованием теории информации

P.A. Маллаев (mallaeв.ra@phystech.edu), A.A. Полянский (newant@gmail.com)

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, лаборатория моделирования биомолекулярных систем

Аллостерическая коммуникация является важным внутренним механизмом, регулирующим функционирование биомолекул в клетке. Например, связывание эффектора в аллостерическом сайте фермента приводит к конформационным изменениям, благодаря которым происходит изменение конфигурации активного центра и его каталитической активности. Изучение аллостерии имеет фундаментальное значение и прикладное значение, в частности, в разработке лекарств.

В настоящее время существует множество экспериментальных и вычислительных методов изучения аллостерии. Из экспериментальных методов следует отметить ЯМР, как мощный инструмент исследования конформационной динамики биомолекул и связанных аллостерических эффектов. Разрабатываются также теоретические модели аллостерической коммуникации, основанные на анализе пространственной структуры белков и/или данных молекулярной динамики (МД) [1].

Мы предлагаем универсальный теоретико-информационный подход исследования аллостерии, реализованный в виде написанного на Python/C++ пакета программ. В основе метода лежит анализ матрицы взаимной информации для всех пар остатков внутри белка, полученной по данным МД [2].

Белок разбивается на кластеры, представляющие собой обособленные с точки зрения взаимной информации домены, и проводится анализ обмена

информацией между полученными кластерами. Для известного активного сайта осуществляется поиск потенциального аллостерического сайта — участка молекулы, наиболее связанного с активным центром с точки зрения взаимной информации. Проведена апробация подхода на глюкокиназе человека (PDB ID: 1V4S) с использованием данных микросекундных МД расчетов. В частности, выявленный в белке аллостерический сайт включает ряд остатков, установленных ранее экспериментально [3].

Таким образом, был разработан и реализован метод анализа аллостерической коммуникации белков с использованием данных МД и теории информации. Отличительной особенностью данного алгоритма является то, что априори не делается никаких предположений о специфической структуре молекулы и о природе самой аллостерии, что позволяет применять данный метод для исследования неупорядоченных и неструктурированных систем.

Литература

1. Verkhivker, G. M., Agajanian, S., Hu, G., & Tao, P. (2020). Allosteric Regulation at the Crossroads of New Technologies: Multiscale Modeling, Networks, and Machine Learning. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 7). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00136>
2. Fleck, M., Polyansky, A. A., & Zagrovic, B. (2016). PARENT: A Parallel Software Suite for the Calculation of Configurational Entropy in Biomolecular Systems. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(4). <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b01217>
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004966>
3. Kamata, K., Mitsuya, M., Nishimura, T., Eiki, J. I., & Nagata, Y. (2004). Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure*, 12(3). <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.02.005>

Д5. Экспрессия высокопредставленных белков скелетной мышцы человека при старении

М.А. Орлова^{1,2}, Н.С. Курочкина¹, М.А. Виговский², Т.Ф. Венхвадзе^{1,2}, П.А. Махновский¹, О.А. Григорьева², Е.М. Леднев¹, А.Ю. Ефименко², Д.В. Попов^{1,2}

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

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

Введение. Скелетные мышцы составляют до 40% массы тела человека и в норме положительно влияют на функции различных тканей и органов. Возраст-зависимое снижение массы и функции скелетных мышц (инсулиновая чувствительность, окислительные возможности, работоспособность) является одним из маркеров старения. Цель работы – исследовать изменение протеомного профиля скелетной мышцы человека при старении и выявить особенности регуляции содержания мышечных белков на уровне мРНК.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 19 молодых здоровых добровольцев (медиана возраста 35 лет, межквартильный разброс [28-38] лет) и 37 пожилых пациентов (72[69-77] лет) с первичным артрозом коленного/тазобедренного сустава – модель старения на фоне выраженного снижения двигательной активности и системного воспаления. В биопсических пробах *m. vastus lateralis* оценивали протеомный и транскриптомный профиль методами панорамной количественной масс-спектрометрии (с использованием изобарической изотопной метки) и РНК секвенирования, соответственно.

Результаты. Во всех исследуемых образцах было детектировано более 1000 (преимущественно высокопредставленных) белков; из них изменило экспрессию более 150 белков. Среди белков снизивших экспрессию были митохондриальные ферменты, среди увеличивших – коллагены, гистоны, шапероны и провоспалительные белки. Оказалось, что изменения содержания белков не всегда коррелирует (регулируется) на уровне их мРНК. Анализ функционального обогащения показал, что при старении регуляция содержания белков зависит от их функции, в частности, снижение митохондриальных белков и увеличение белков внеклеточного матрикса регулируется на уровне мРНК, тогда как увеличение ядерных белков происходит без изменения экспрессии соответствующих мРНК.

Выводы. Возраст-зависимые изменения протеома, выявленные в нашем исследовании, хорошо согласуются с данными литературы. Белки, выполняющие различные функции, по-разному регулируются на уровне соответствующих мРНК.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-15-00405.

Д6. Управление активностью кардиомиоцитов и секретирующих гормоны клеток с помощью термогенетики.

С.С. Сабинин (sabinin.semyon@gmail.com)¹, В.С. Овечкина^{1,2}, А.В. Балацкий³, А.А. Ланин⁴, Д. Джэппи³, Е.С. Фетисова^{1,2}, И.В. Кельмансон^{1,2}, А.В. Розов³, А.Б. Федотов⁴, А.А. Можжев^{1,2,5,6}, В.В. Белоусов^{1,2,3}

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

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

³Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва

⁴МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет

⁵ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

⁶НИУ ВШЭ, факультет биологии и биотехнологии

Введение. Существующие на данный момент методы изучения возбудимых клеток и тканей, такие как хемотропика и оптогенетика имеют ряд недостатков, которые ограничивают возможности их широкого использования. К таким недостаткам относятся низкая скорость активации и необходимость

хирургического вмешательства соответственно. Термогенетика, основанная на термочувствительных каналах из семейства TRP, показала в опытах с клетками нервной системы, что она лишена вышеупомянутых недостатков. Отсутствие применения термогенетики на не нейрональных клетках побудило нас разработать методы по активации кардиомиоцитов и бета-клеток поджелудочной железы с перспективой от изучения процессов, происходящих в данных клетках, до разработки методов лечения патологий сердца и поджелудочной железы.

Материалы и методы. Мы использовали выбранный на основе ранее проведённых экспериментов термочувствительный канал человека hTRPV1 для получения конструкций под специфичными промоторами для экспрессии в кардиомиоцитах или бета-клетках, в которые такие конструкции доставлялись с помощью аденоассоциированных вирусов. Далее различными методами нагрева: нихромовой петлёй, ПЦР-машиной, инфракрасным лазером – проводили активацию клеток. Активность оценивали при помощи измерения динамики внутриклеточной концентрации кальция, мембранного потенциала методом patch-clamp, частоты сердечных сокращений для кардиомиоцитов и количества секретируемого инсулина для бета-клеток.

Результаты. Для кардиомиоцитов, экспрессирующих hTRPV1, удалось навязать частоту сокращения путём нагрева *in vitro*. В экспериментах с неонатальными кардиомиоцитами *in vitro* показано, что нагрев клеток, экспрессирующих hTRPV1, сопровождался повышением внутриклеточной концентрации кальция и деполяризацией клетки. Для бета-клеток островков Лангерганса показано, что нагрев клеток, экспрессирующих hTRPV1, *in vitro* приводит к росту внутриклеточной концентрации кальция и к увеличению количества секретируемого инсулина более чем в 2 раза.

Выводы. Продемонстрирована с помощью методов термогенетики принципиальная возможность управления кальций зависимой активностью кардиомиоцитов, а также секрецией гормонов.

Д7. *In vivo* исследование роли пероксида водорода в развитии ишемического инсульта в модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета I типа у крыс *Rattus norvegicus* с помощью генетически кодируемого биосенсора HyPer7

А.П. Трифонова (trifonova.ap@phystech.edu), Д.А. Котова, А.Д. Иванова, М.С. Почечуев, Ю.В. Храмова, М.А. Судоплатов, В.А. Катруха, А.Д. Сергеева, Р.И. Раевский, М.А. Солотенков, А. Федотов, В.В. Белоусов, А.М. Жёлтиков, Д.С. Билан

ФГБУН Институт Биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Группа метаболических основ патологии, Москва, Россия

Введение. Сахарный диабет – значимый фактор усугубления последствий ишемического инсульта. Однако, механизм влияния гипергликемического статуса

на метаболизм ишемизированных тканей изучен недостаточно. Целью данной работы стала оценка влияния гипергликемии на динамику генерации H_2O_2 в матриксе митохондрий нейронов во время развития инсульта.

Материалы и методы. Исследование проводили на крысах линии SHR с нормальным и повышенным гликемическим статусом с использованием модели окклюзии средней мозговой артерии. Гипергликемию вызывали инъекциями стрептозотоцина, токсичного для β -клеток поджелудочной железы. Для экспрессии в области стриатума флуоресцентного индикатора H_2O_2 HyPer7 с митохондриальной локализацией инъецировали суспензию частиц аденоассоциированного вируса, несущего ген сенсора под нейрональным промотором. Для регистрации сигнала HyPer7 в режиме реального времени в ходе развития инсульта в область инъекции устанавливали оптоволоконные зонды. Регистрацию проводили на высокочувствительной установке, собранной в лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии МГУ.

Результаты. Исследование динамики H_2O_2 в ишемизированном полушарии мозга не выявило различий между животными из группы гипергликемии и контроля как в острой фазе инсульта, так и спустя 24 часа после операции. Оценка метаболической активности клеток мозга, проведенная путем окрашивания срезов мозга 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом, показала, что у животных с гипергликемией объем инсульта в 2,6 раз больше, чем у контрольных. Также у них был отмечен более высокий уровень смертности по сравнению с контрольной группой (25%), в которой не наблюдали летального исхода до выведения животного из эксперимента.

Выводы. Данное исследование показало, что гипергликемический статус не изменяет динамику H_2O_2 , как в острой фазе, так и спустя 24 часа после окклюзии, однако усугубляет ишемическое повреждение тканей мозга и снижает выживаемость.

Д8. Исследование кинетики хемилюминесценции, индуцированной образованием гуанинового квадруплекса, для детекции уникальных последовательностей РНК организмов.

П.В. Филатов (filatov@scamt-itmo.ru)¹, Д.А. Горбенко¹, А.В. Палехова¹, Д.Р. Дададжанов¹

¹Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург

Введение.

На сегодняшний день создание компактных и чувствительных тест-систем для своевременного обнаружения ДНК или РНК возбудителей заболеваний является одной из ключевых задач в молекулярной диагностике и медицине. Несмотря на то, что существует ряд эффективных методов обнаружения уникальных последовательностей нуклеиновых кислот высокая стоимость оборудования и

реагентов и необходимость в высококвалифицированном персонале создает потребность в разработке новых диагностических тестов для развивающихся стран и ограниченных условий тестирования, которые будут сравнимы с существующими методами по селективности и чувствительности.

Одним из перспективных направлений обнаружения целевых нуклеиновых кислот являются сенсорные методики на основе гуаниновых квадруплексов (G-4), способных образовывать с геминем комплексы, обладающие пероксидазной активностью.

Известны несколько вариантов тест-систем на основе G-4, которые используют различные субстраты пероксидазы хрена для сообщения о присутствии целевого участка РНК или ДНК: колориметрические, хемилюминесцентные и др.

В данной работе предложен метод, основанный на регистрации хемилюминесцентного сигнала, вызванного окислением люминола для обнаружения возбудителя нозокомиальных инфекций *S. aureus*.

Материалы и методы.

Оборудование: счетчик фотонов The H11890 (Hamamatsu), микрофлюидный проточный чип.

Реактивы: синтетический анализит *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (Евроген), иттд пробы (2nd arm-core, tile-3rd arm-core, 4th arm-tile-1st arm), NaOH, H₂O₂, люминол, гемин.

Результаты.

Исследована кинетика хемилюминесценции, индуцированной образованием G-4, при гибридизации ДНК-наносенсора на основе G-4 с целевой последовательностью нуклеиновых кислот инфекций *S. aureus*.

Было показано, что интенсивность хемилюминесценции в реакции с собранным ДНК-наносенсором статистически значимо отличается от фонового перекисного усиления сигнала хемилюминесценции.

Выводы. Предложенный метод обнаружения уникальных последовательностей нуклеиновых кислот показал высокий уровень селективности и чувствительности. Обнаружение происходило в течении нескольких минут, что делает данный метод конкурентным по сравнению с существующими протоколам детекции нуклеиновых кислот.

Секция «Биохимия»

БХ1. Исследование нековалентных взаимодействий сывороточного альбумина человека с олигонуклеотидными производными, содержащими липофильные группы

И.А. Бауэр (i.bauer@g.nsu.ru), А.С. Павлова, С.А. Жуков, Т.О. Жарков, М.С. Купрюшкин, Е.В. Дмитриенко

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия; институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Одним из вызовов современной биомедицинской химии является разработка высокоизбирательных терапевтических препаратов на основе олигонуклеотидов. Такие агенты характеризуются высокой селективностью связывания с молекулами-мишенями за счет комплементарности азотистых оснований взаимодействующих цепей. Однако основной проблемой на пути к их широкому клиническому применению является наличие ряда ограничений: деградация нуклеазами, отрицательный заряд, быстрое выведение из организма. Данное исследование направлено на преодоление этих проблем посредством связывания терапевтического олигонуклеотида с сывороточным альбумином человека (HSA).

Альбумин является мажорным белковым компонентом сыворотки крови человека с длительным периодом полувыведения и повышенным сродством к гидрофобным лигандам. В ходе работы исследовано взаимодействие альбумина с модельными олигонуклеотидами, содержащими от одной до трех модификаций по межнуклеотидным фосфатам, несущих алифатические остатки разной длины. Методами задержки в геле, а также флуоресцентного титрования показано, что исследуемые олигонуклеотиды образуют стабильные комплексы с HSA ($K_d = 0,6 - 1,5$ мкМ). Показано, что длина алифатического остатка прямо пропорциональна степени сродства олигонуклеотидов к альбумину. Немодифицированный олигонуклеотид также взаимодействует с белком с аналогичными значениями K_d . Однако данный комплекс не устойчив в условиях электрофореза. Методом динамического светорассеяния установлено, что олигонуклеотиды с липофильными группами имеют тенденцию к образованию мицеллоподобных структур, что также показано в экспериментах по определению критической концентрации агрегирования. Предположительно, самосборка исследуемых производных происходит с образованием мицеллярных частиц, состоящих из гидрофобного ядра внутри и гидрофильного олигонуклеотида снаружи. При взаимодействии с HSA мицеллы, скорее всего, разрушаются. Полученные данные свидетельствуют о высоком потенциале использования комплексов альбумина с липофильными производными олигонуклеотидов для конструирования препаратов на их основе.

БХ2. Биохимический анализ амилоидогенности фрагментов белка вителлогенина *Gallus gallus domesticus* в дрожжевой модельной системе

А.А. Валина (annavalina@mail.ru)¹, В.А. Синюкова², Т.А. Белашова^{1,2}, С.А. Галкина¹, А.П. Галкин^{1,2}

¹Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский филиал ИОГен РАН, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Амилоиды представляют собой белковые фибриллярные агрегаты, имеющие упорядоченную межмолекулярную кросс-бета структуру. Ранее в нашей лаборатории было показано, что амилоид-специфичный краситель Тиофлавин S окрашивает ооциты, а также клетки фолликулярного эпителия курицы *Gallus domesticus* на ранних стадиях развития ооцитов. С помощью разработанного в нашей лаборатории метода протеомного скрининга, основанного на таком свойстве амилоидных фибрилл как устойчивость к ионному детергенту додецилсульфату натрия (SDS) [1], среди кандидатов на роль амилоидов в ооцитах курицы, был выявлен белок Vitellogenin-2 (VTG2), выполняющий функцию главного предшественника запасных белков яичного желтка. На основании результатов предсказания амилоидогенных регионов биоинформатическим алгоритмом «ArchCandy» [2], в последовательности VTG2 были выбраны три фрагмента, которые были проанализированы на предмет способности формировать детергент-устойчивые агрегаты в дрожжевой модельной системе.

Материалы и методы. Были сконструированы плазмиды, продуцирующие в клетках дрожжей *S. cerevisiae* химерные белки, содержащие фрагменты VTG2, слитые с репортерной последовательностью флуоресцирующего белка YFP. Был проведен анализ агрегации химерных белков с помощью метода фракционирования дрожжевых клеточных лизатов. Кроме того, был проведен анализ устойчивости агрегирующих фрагментов VTG2 к обработке ионным детергентом, для чего клеточные лизаты предварительно обрабатывали 1% SDS в течение 10 минут при комнатной температуре.

Результаты. С помощью биохимических методов мы показали, что все три фрагмента VTG2 находятся в осадке, и образуют в клетках *S. cerevisiae* агрегаты. После предварительной обработки 1% SDS было обнаружено, что фрагмент VTG2-1, слитый с YFP, присутствует как в растворимой, так и в осадочной фракциях. Два других фрагмента VTG2, слитые с YFP, детектировались исключительно в супернатанте.

Выводы. Таким образом, N-терминальный фрагмент VTG2 формирует в дрожжевых клетках агрегаты, которые демонстрируют относительную устойчивость к SDS.

Литература

1. Ryzhova T.A., Sopova J.V., Zadorsky S.P., Siniukova V.A., Sergeeva A.V., Galkina S.A., Nizhnikov A.A., Shenfeld A.A., Volkov K.V. and Galkin A.P. Screening for amyloid proteins in the yeast proteome // *Curr Genet*. 2018. V. 64. № 2. P. 469–478.
2. Ahmed A.B., Znassi N., Château M.T. and Kajava A.V. A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis // *Alzheimers & Dementia*. 2015. V. 11. № 6. P. 681–690.

БХ3. Иммунохимические исследования тропонина I сердца позвоночных фауны Звенигородской биологической станции с использованием моноклональных антител различной эпитопной специфичности.

Д.С. Васенко, М.В. Владыкина, Э.И. Киреева, Я.А. Климова, Г.И. Кондрашев, Ф.О. Коряко, М.С. Ланцова, М.А. Тетюркина

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

Введение. Белки тропонинового комплекса играют важную роль в регуляции сокращения сердечной мускулатуры и являются специфичными маркерами повреждения сердечной мышцы, что позволяет использовать их для диагностики сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) человека и животных. В этой связи исследование взаимодействия различных антител с тропонинами в сердцах позвоночных представляет собой актуальную задачу. Целью настоящего исследования было изучение взаимодействия моноклональных антител, специфичных к одному из белков тропонинового комплекса тропонину I (TnI), в сердцах таких видов позвоночных, как *Apodemus flavicollis*, *Clethrionomys glareolus*, *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax lessonae*, *Rana temporaria*, *Esox Lucius* и *Bos Taurus*.

Материалы и методы. Разделение белков в экстрактах сердец позвоночных проводили методом-электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях по системе Лэммли. Идентификацию TnI в экстрактах сердец позвоночных проводили методом иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител клонов 19C7, MF4, 560 и 625. Биоинформатический поиск потенциальных эпитопов антител у позвоночных осуществляли, используя базу данных Uniprot.

Результаты. Было обнаружено, что TnI детектируется всеми четырьмя антителами в экстракте сердца быка (*Bos taurus*). Антитела 19C7 и MF4 выявляют TnI в экстрактах сердец рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) и желтогорлой мыши (*Apodemus flavicollis*). Антитела 625 детектируют исследуемый белок у травяной (*Rana temporaria*) и озерной (*Pelophylax ridibundus*) лягушек. В случае антител 560 TnI детектируется у щуки (*Esox lucius*) и травяной лягушки (*Rana temporaria*).

Выводы. Таким образом, была продемонстрирована способность различных антител детектировать TnI у позвоночных. Сравнение данных о последовательностях выявленных участков у исследуемых видов с данными из Uniprot показало, что близость родства не обязательно коррелирует с единством аминокислотных последовательностей.

БХ4. Структура и динамика латеральной гетерогенности бислоев ДОФХ/ДОФС: результаты компьютерного моделирования

И.И. Веретененко (veretenenko.ii@phystech.edu)^{1,2}, Ю.А. Трофимов^{1,3}, Р.Г. Ефремов^{1,2,4}

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

²*Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный*

³*Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва*

⁴*Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва*

Латеральной гетерогенностью биологических мембран называется неоднородное динамическое распределение липидов в плоскости бислоя, проявляющееся, в частности, на масштабах порядка 10-100 Å (т.н. “нанодомены”). Известно, что латеральная гетерогенность может участвовать в функционировании клеточных мембран, например, регулируя работу мембранных белков. Однако, несмотря на появление методов сверхвысокого разрешения, экспериментальное исследование нанодоменов остается сложной задачей из-за их небольшого размера и малого времени жизни. Поэтому их часто изучают вычислительными методами.

В настоящей работе методом молекулярной динамики исследовали нанодомены в бислоях, состоящих из смеси цвиттер-ионного диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) и отрицательно заряженного диолеилфосфатидилсерина (ДОФС). Для характеристики латеральной гетерогенности в работе был предложен метод разделения липидов на “кластеризованные” и “некластеризованные” в зависимости от наличия или отсутствия в окрестности центров масс липидных головок избыточной плотности атомов других липидов. Далее кластеризованные головки, расположенные на расстоянии менее 8.1 Å для ДОФХ и 7.3 Å для ДОФС, были объединены в группы - т.н. “кластеры”.

Показано, что структура и динамика выявленных кластеров оказалась различной для ДОФХ и ДОФС: кластеры ДОФС характеризуются меньшим средним размером (8 липидов ДОФХ и 6 для ДОФС) и более медленным распадом ($\tau \approx 2,6$ нс) по сравнению с ДОФХ ($\tau \approx 0,7$ нс). Кроме того, характер кластеризации ДОФХ похож на кластеры в случайно сгенерированной системе из того же количества липидов в бислое.

Наблюдаемые различия в характере латеральной гетерогенности объясняются наличием у ДОФС большего количества липид-липидных взаимодействий (водородных связей липид-липид и связей липид-ион-липид), образующихся

преимущественно между кластеризованными липидами. Кроме того, данный эффект является причиной возникновения более выраженной неоднородности в распределении гидрофильных/гидрофобных свойств поверхности мембраны ДОФС по сравнению с ДОФХ.

БХ5. Получение рекомбинантной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) человека в бактериальной системе экспрессии и определение ее удельной активности

В.М. Вострикова (varvara.vost@gmail.com), Э.А. Васильева (vasilyeva-elina.com@mail.ru)

Кафедра биохимии, Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Введение. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) – ключевой фермент гликолиза, катализирующий образование 1,3-бисфосфоглицерата из глицеральдегид-3-фосфата. Помимо участия в гликолитическом пути, ГАФД может оказывать влияние на экспрессию некоторых белков, связывая их мРНК, участвует в регуляции апоптоза и построении цитоскелета, может связывать теломерную ДНК опухолевых клеток, что способствует увеличению их жизнеспособности. Таким образом, рекомбинантная очищенная ГАФД человека необходима для исследования вышеупомянутых процессов. Целью нашей работы являлось получение рекомбинантной ГАФД человека, изучение ее иммунохимических свойств и определение удельной ферментативной активности.

Материалы и методы. Клетки штамма *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS, трансформированные плазмидой для экспрессии ГАФД, были любезно предоставлены к.б.н., доцентом НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского Е.В.Шмальгаузен. На основе вектора pET22b+ получали молекулярно-генетическую конструкцию, содержащую ген ГАФД человека. ГАФД экспрессировали в штамме *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS с использованием автоиндукционной среды. Выделение целевого белка проводили методом дробного высаливания сульфатом аммония. Методом иммуоферментного анализа «сэндвич»-типа в паре антител 4G5-6C5 анализировали иммунохимическую активность ГАФД. Удельную активность препарата ГАФД определяли, измеряя оптическую плотность пробы, содержащей реакционный буфер, глицеральдегид-3-фосфат, NAD^+ и фермент, при 340 нм.

Результаты. В результате дробного высаливания бактериальной культуры после экспрессии было получено 10 мг препарата рекомбинантной ГАФД человека с чистотой 80%. Общий выход ГАФД на литр бактериальной культуры составил 27 мг. Полученная ГАФД обладала иммунохимической активностью, существенно превышающей (в 6 раз) таковую у ГАФД кролика. Удельная ферментативная активность полученного препарата ГАФД человека составила 9 мкмоль/мин*мг белка, что приблизительно в 3 раза ниже, чем активность ГАФД кролика.

Выводы. На основе полученных данных можно заключить, что описанный в работе метод подходит для получения энзиматически-активной рекомбинантной ГАФД человека. Однако метод требует дальнейшей оптимизации с целью получения ГАФД с более высокой ферментативной активностью.

БХ6. Внутриядерные концентрации одновалентных катионов определяются концентрациями этих ионов во внеядерной среде

А.М. Горбунов (gor2903@mail.ru)

Биологический факультет МГУ, кафедра биохимии, научная группа изучения роли Na^+ , K^+ -АТФазы в функционировании клеток и проведении сигналов

Введение. В цитоплазме животных клеток благодаря активности Na, K -АТФазы (НКА) концентрация K^+ в норме на порядок превышает концентрацию Na^+ . Показано, что в ряде физиологических и патофизиологических процессов внутриклеточное Na/K соотношение может увеличиваться. Возникает вопрос: как при этом изменяется внутриядерная концентрация этих ионов?

Материалы и методы.

Клетки HeLa дезинтегрировали в гипотоническом буфере (содержащем 10 mM Na^+ и 1 mM K^+) при помощи гомогенизатора Даунса с последующим осаждением ядерной фракции при 700 g. Определяли плотность ядерного осадка, фиксируя его массу и объем. Изолированные ядра суспендировали в двух солевых растворах (каждый в двух объемах: 150 мкл и 1,5 мл), имитирующих ионный состав цитоплазмы в норме (10 mM Na^+ , 100 mM K^+) и при максимальном ингибировании НКА (100 mM K^+ , 10 mM Na^+). После инкубации проб ядерную фракцию вновь осаждали, измеряя ее массу. Зная плотность ядер, рассчитывали их объем. Затем ядра преципитировали в 5% растворе ТХУ и определяли внутриядерное содержание Na^+ и K^+ методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

В другом эксперименте ядра HeLa выделяли в гипотоническом буфере (10 mM Li^+ , 1 mM Rb^+), содержащем ионы альтернативных щелочных металлов. В ядерном осадке определяли содержание Li^+ и Rb^+ , нормируя полученные значения на массу белка в пробе.

Результаты. Изменение внутриядерных концентраций Na^+ и K^+ происходило в соответствии с концентрациями этих ионов в среде инкубации и не зависело от объема среды и, как следствие, от внеядерного количества ионов. При выделении ядер в Li/Rb -буфере ионы Li^+ и Rb^+ были обнаружены внутри ядер в соотношении, близком к средовому.

Выводы. Полученные результаты указывают, что между нуклеоплазмой и цитоплазмой устанавливается концентрационное равновесие по одновалентным ионам, по-видимому, за счет диффузии через ядерные поры. Таким образом,

можно предполагать, что внутри живых клеток внутриядерные концентрации Na^+ и K^+ определяются их цитоплазматическими концентрациями.

БХ7. Биохимическая характеристика полиферментных комплексов дегидрогеназ 2-оксоглутарата и 2-оксоадипата в гомогенатах мозга крысы

А.Д. Гуреев (alexdm@fbb.msu.ru)¹, И.С. Карлина (aniram0107@mail.ru)², В.И. Буник (bunik@belozersky.msu.ru)^{1,2,3}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119992 Москва, Россия

³Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

Введение. Недавно открытый изофермент 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДГ) – 2-оксоадипатдегидрогеназа (ОАДГ) – участвует в деградации лизина и триптофана. Дисфункция ОАДГ ассоциирована с развитием диабета. Для осуществления катализа оба фермента образуют комплекс с дигидролипоилсукцинилтрансферазой и дигидролипоилдегидрогеназой. Однако биохимическая характеристика нативных ферментов практически не проводится из-за перекрёстной субстратной специфичности рекомбинантных ОГДГ и ОАДГ и диссоциации нативных полиферментных комплексов при очистке.

Целью данной работы является изучение особенностей регуляции комплексов ОАДГ и ОГДГ мозга крысы. В этой связи решалась задача подбора условий для дискриминации их активностей в гомогенатах мозга.

Материалы и методы. Гомогенаты коры головного мозга самцов крыс готовили, озвучивали и солюбилизовали с детергентами по разработанным ранее методикам. Активность комплексов ОГДГ и ОАДГ измеряли на планшетном ридере CLARIOstar по флуоресценции НАДН. Реакцию инициировали добавлением гомогената в среду.

Результаты. В использованных нами условиях комплексы ОГДГ и ОАДГ не показывают перекрёстной реактивности, катализируя реакции лишь с собственными субстратами, 2-оксоглутаратом и 2-оксоадипатом, соответственно. Максимальная скорость ОГДГ реакции достигается после периода задержки (лаг-периода), не наблюдаемого для ОАДГ реакции. При длительном хранении гомогената в присутствии 3 мМ ЭДТА наблюдается падение скорости ОАДГ реакции, но не ОГДГ реакции. Измерение в присутствии специфических ингибиторов (сукцинилфосфоната и адипоилфосфоната) показывает разную степень ингибирования детектируемых реакций. Добавление в среду кофермента

– тиаминдифосфата – повышает скорость ОАДГ реакции; при этом скорость ОГДГ реакции остаётся практически неизменной, однако лаг-период снижается.

Выводы. Разработан способ дискриминации активностей изоферментов ОГДГ и ОАДГ в гомогенатах мозга крысы. Установлено, что изоферменты имеют разную кинетику накопления продукта НАДН и разные механизмы активации коферментом.

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ № 20-54-7804

ВХ8. Получение рекомбинантного полноразмерного IGFBP-4 в бактериальной экспрессионной системе и определение уровня его протеолиза под действием PAPP-A в первичной культуре головного мозга крыс разного возраста

Д.А. Гуцеваров (danil.gushevarov@inbox.ru)¹, О.Е. Квитко¹, Г.А. Дя¹, М.М. Артемьева², Н.А. Медведева², Д.В. Серебряная¹

¹Кафедра биохимии, Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

²Кафедра физиологии человека и животных, Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Введение. Инсулиноподобные факторы роста (IGF) – ключевые регуляторы роста и развития клеток и тканей. Биодоступность IGF для клеток регулируется двумя путями: 1) за счет секреции IGF клетками, 2) в результате расщепления комплекса IGF-IGF-связывающие белки (IGFBP) специфическими протеазами. Известно, что секреция IGF в нервной ткани выше в неонатальном периоде, чем во взрослом. Однако возрастная динамика протеолиза комплекса IGF-IGFBP в мозге на сегодняшний день не изучена. Таким образом, целью этого исследования являлось получение IGFBP-4 в рекомбинантной форме и сравнение уровня его специфического расщепления протеазой PAPP-A в культурах ткани головного мозга крыс разных возрастов.

Материалы и методы. IGFBP-4 экспрессировали в штамме *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS при 37° в течение 3 ч. IGFBP-4 очищали из растворимой фракции методом аффинной хроматографии. Иммунохимическую активность IGFBP-4 анализировали методом ФИА «сэндвич»-типа в парах антител IBP182-180Eu* и IBP185-154Eu*. Первичную культуру нервной ткани получали из мозга 2- и 12-дневных крыс. Характеристику полученной культуры проводили методом иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител, специфичных к глиальному кислому белку. Протеолиз IGFBP-4 осуществляли в кондиционированной среде клеток при добавлении субстратной смеси и измеряли его уровень через 1 ч и 3 ч методом ФИА-«сэндвич»-типа с использованием пары антител IBP3-IBP180Eu*, специфично распознающих неоэпитоп NT-IGFBP-4, образующийся в результате PAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4.

Результаты. Выделенный IGFBP-4 обладал иммунохимическими свойствами, сходными с IGFBP-4, полученным в эукариотической системе экспрессии. Глиальный кислый белок детектировался приблизительно в 80% клеток культуры мозга крысы. В культуре головного мозга 12-дневных крыс уровень RAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 возрастал примерно в 2 раза по сравнению с аналогичной культурой 2-дневных крыс.

Выводы. Таким образом, можно сделать вывод о том, что RAPP-A-зависимый протеолиз IGFBP-4 во взрослом мозге крыс протекает интенсивнее, чем в неонатальном мозге.

БХ9. Антибактериальная активность внеклеточных вторичных метаболитов мха *Ceratodon purpureus*.

С.М. Джабраилова (saidabio@icloud.com), Е.В. Шакиров, Л.Р. Валеева

Институт Фундаментальной медицины и биологии КФУ, Казань

Растущая угроза резистентности патогенных микроорганизмов к существующим антибиотикам ставит глобальную задачу поиска новых антимикробных соединений. Биологически активные соединения, выделенные из растений, известны своими уникальными свойствами и используются человеком в качестве противомикробных препаратов на протяжении столетий. Одними из наименее изученных источников новых антимикробных метаболитов являются бриофиты (зеленые и антоцеротовые мхи, печеночники). Механизмы защиты от абиотического и биотического стресса этих растений во многом основаны на выработке большого числа уникальных вторичных метаболитов, для которых показана антибиотическая, противоопухолевая и антиоксидантная активности. Однако недооцененными остаются их внеклеточные метаболиты, которые также имеют большой антимикробный потенциал. Целью работы являлось определение антибактериальной активности секретируемых метаболитов мха *Ceratodon purpureus*.

Растения *Ceratodon purpureus* линии R40 (мужское растение) культивировали в жидкой среде BCD в течение 4 недель. Внеклеточные метаболиты из экссудатов выделяли путем фильтрации среды и адсорбции на ионообменной гидрофобной смоле Amberlite XAD-16. Метаболиты экстрагировали метанолом и высушивали на роторном испарителе при 30 °С. Оценку антибактериальной активности проводили диско-диффузионным методом на бактериальных тест-культурах грамположительного (*Staphylococcus aureus* ATCC25923) и грамотрицательного (*Serratia marcescens* SM6) морфотипов.

Показано, что внеклеточные метаболиты *C. purpureus* линии R40 подавляли рост грамположительных бактерий *S. aureus* ATCC25923 при концентрации 5 мг сухого вещества/диск (диаметр зоны подавления роста $10 \pm 0,2$ мм), но не оказывали антибактериального действия в отношении грамотрицательных бактерий *S. marcescens* SM6.

Таким образом, выделены и получены фракции низкомолекулярных соединений из экссудатов бриофита *Ceratodon purpureus* R40. Показана антибактериальная активность полученных внеклеточных метаболитов по отношению к грамположительным бактериям *S. aureus*. В дальнейшем планируется идентификация биоактивных компонентов в полученных фракциях внеклеточных метаболитов, а также изучение их физико-химических и дополнительных биоактивных и антимикробных свойств.

БХ10. Количественное определение и метаболизм витамина К у *Drosophila melanogaster*

А.И. Дьяченко (anigd_1999@mail.ru)¹, Л.О. Усольцева², В.А. Иоутси², О.И. Клычников¹, Л.Н. Нефедова¹

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

²ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Россия, Москва

Витамины группы К – это жирорастворимые витамины, которые в природе синтезируются растениями (витамин К₁) и бактериями (витамин К₂). В разных царствах живых организмов витамины К играют разную роль: у бактерий и растений он является переносчиком электронов, у позвоночных животных он является кофактором фермента гамма-глутамилкарбоксилазы (ГТК), осуществляющего посттрансляционную модификацию ряда белков содержащие т.н. Gla домены. У насекомых до сегодняшнего дня не было показано присутствие витамина К, хотя у *Drosophila melanogaster* присутствуют белки-гомологи белков позвоночных, отвечающее за его метаболизм (ГТК и эпоксиредуктаза витамина К – ВКОР). Целью этого исследования является изучение их возможной роли в метаболизме витамина К у насекомых.

В нашей работе мы использовали водорастворимую форму синтетического витамина К₃ – менадиона натрия бисульфит, а также ингибитора ВКОР – варфарина, с целью изучения метаболизма витамина К у *D. melanogaster*.

Для определения количества витамина К₂ нами был разработан протокол его экстракции органическими растворителями из гомогената имаго мух. Хромато-масс-спектрометрический анализ методом мониторинга множественных реакций с применением стандартов известной концентрации позволил количественно определять содержание витамина К₂. В контроле оно составило 0,26±0,07нг/г, что соответствовало средней концентрации К₂ у млекопитающих. Анализ имаго дрозофил, получавших витамин К₃ (3.5мМ) на стадии личинки, показал, что К₂ в них повышен по сравнению с контролем (6,34±0,17нг/г). При совместном добавлении в корм варфарина (1мМ) и К₃ (3.5мМ) происходило снижение содержание К₂ по сравнению с образцом без ингибитора (3,85±0,85нг/г).

Таким образом, нами была впервые показано наличие витамина К у *D. melanogaster*, биосинтез К₂ из К₃, а также ингибиторный эффект варфарина. Мы

предполагаем, что цикл витамина К, описанные ранее у хордовых, также представлен и у насекомых.

ВХ11. Ускорение ферментативного гидролиза с помощью ультразвука и микроволн: 100 образцов за 3 часа для протеомного анализа с помощью сверхбыстрой хроматомасс-спектрометрии

Д.Д. Емеева^{1,2}, Т.Т. Куцаинова^{1,2}, Л.А. Гарибова^{1,2}, И.И. Фёдоров^{1,2}, И.А. Тарасова (iatarasova@yandex.ru)²

¹ИНЭПХФ им. В.Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН, Москва, Россия

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

Хроматомасс-спектрометрия является одним из наиболее информативных методов исследования молекулярных механизмов в живых системах на уровне протеома. В последнее время активно разрабатываются методы высокопроизводительного профилирования протеомов, позволяющие анализировать до 200-300 образцов в сутки. При этом возникает необходимость усовершенствовать подготовку образцов так, чтобы производительность биохимической пробоподготовки соответствовала производительности прибора. В нашей работе представлены результаты сравнения методов ускорения реакций восстановления и алкилирования дисульфидных связей белков и их ферментативного гидролиза по сравнению с традиционным подходом.

Протоколы ускоренного гидролиза были апробированы на клетках мультиформной глиобластомы человека DBTRG-05MG (ATCC) и тканях 7-дневных проростков озимой пшеницы *Truticum aestivum* L.. Для экстракции белков клетки глиобластомы инкубировали в детергент-содержащем лизис-буфере (ProteaseMax surfactant, Promega) в течении 10 мин при 25 С. Растительные ткани измельчались в криомельнице CryoMill (Retsch GmbH, Berlin, Germany), гомогенат суспендировали в солевом фосфатном буфере, центрифугировали и отбирали супернатант. Восстановление и алкилирование дисульфидных связей и гидролиз белков трипсином осуществляли: 1) в ультразвуковой ванне, 2) в термошейкере при 37 С и при 50 С; и 3) в микроволновой печи, сократив время реакций в 6-18 раз. Результаты оценивались с помощью метода ультрабыстрого масс-спектрометрического профилирования DirectMS1 и сравнивались со стандартным протоколом [PMID: 32077687].

Показано, что микроволновое излучение и ультразвуковые волны эффективно ускоряют реакции восстановления / алкилирования дисульфидных связей и ферментативного гидролиза белков по сравнению контрольным протоколом на основе 18-часового гидролиза в детергент-содержащем буфере без существенных потерь в количестве идентифицированных белков.

Таким образом, определены эффективные методики ускорения реакции ферментативного гидролиза белков для протеомных исследований хроматомасс-спектрометрическим методом.

Работа поддержана РФФ №22-26-00109.

БХ12. Регуляция разделения фаз жидкость-жидкость, иницируемого N-белком SARS-COV-2 и вирусной РНК

Е.К. Книжник (knizhnik.ek@phystech.edu)¹, Ю.И. Светлова², А.М. Варижук², А.В. Аралов³, В.А. Манувер², Е.В. Матюгина⁴

¹*Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия*

²*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия*

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

⁴*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

В процессе репликации SARS-CoV-2 особую роль играет внутриклеточное разделение фаз типа “жидкость-жидкость” (liquid-liquid phase separation, далее - LLPS) с образованием конденсатов нуклеокапсидного белка (N) и геномной РНК вируса. LLPS участвует в процессе блокирования иммунного ответа клетки вирусом, а также влияет на сборку вирусного капсида. Известно, что LLPS происходит за счёт взаимодействия N-белка со специфическими участками вирусной РНК. Однако механизм образования конденсатов, а также способы влияния на него, пока остаются до конца не изученными. Поэтому поиск соединений, влияющих на образование конденсатов, в частности ингибиторов LLPS SARS-CoV-2 особенно актуален.

В данной работе в бесклеточной системе были реконструированы и визуализированы методом флуоресцентной микроскопии конденсаты N-РНК с использованием флуоресцентно меченого рекомбинантного белка N и синтетических олигонуклеотидов (фрагментов вирусного генома). В полученной модельной системе выполнен скрининг регуляторов LLPS – протестированы противовирусные препараты, выбранные на основе их предполагаемой способности конкурировать с РНК за конкретные N-сайты или вмешиваться в неспецифические взаимодействия п-п/катион-п. Набор потенциальных модуляторов LLPS включал флексимеры, 5'-норкарбоциклические и перилен-содержащие нуклеозидные аналоги, а также ненуклеозидные амфифильные и гидрофобные производные перилена.

Было установлено, что гидрофобные производные перилена являются важными участниками LLPS лишь в модельных системах, в то время как 5'-норкарбоциклические производные нуклеозидов перспективны для нацеливания на вирусные конденсаты в клетках. Однако, ввиду значительной токсичности

последних, необходимы дальнейшие исследования их взаимодействия со стрессовыми гранулами и другими немембранными органеллами клетки-хозяина.

Полученные результаты показывают, что электростатические взаимодействия РНК с N-белком, наряду с гидрофобными взаимодействиями N-N, вносят вклад в формирование конденсатов и этот процесс можно регулировать низкомолекулярными нуклеотидными и полиароматическими лигандами.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации № МД-5000.2022.3.

БХ13. Влияние химических шаперонов на кинетику агрегации бычьего сывороточного альбумина при облучении ультрафиолетовым светом

О.В. Короленко (olkoroltd@gmail.com)

ФИЦ Биотехнологии РАН, лаб. структурной биохимии белка

Введение. Бычий сывороточный альбумин (БСА) является одним из распространенных модельных белков для изучения агрегации. Оценка способности различных соединений (химических шаперонов) подавлять агрегацию белков может применяться в биотехнологии при получении белковых препаратов.

Материалы и методы. Термостабильность УФ-облученного БСА и кинетика его тепловой агрегации при 50 °С изучались методами дифференциальной сканирующей калориметрии и динамического светорассеяния, соответственно.

Результаты.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии было показано, что при УФ-облучении происходит потеря нативной структуры белка и уменьшение максимума температуры денатурации.

Установлено, что при УФ-облучении возрастает средний гидродинамический радиус молекул БСА, что связано, скорее всего, с формированием небольших агрегатов (димеров) при денатурации под действием ультрафиолета.

Определен кинетический режим агрегации УФ-облученного БСА. Показано, что порядок агрегации УФ-облученного БСА при различных дозах облучения равен 2 и не зависит от начальной концентрации белка. Скорость-лимитирующей стадией является агрегация развернутых белковых молекул.

Установлено, что низкие концентрации аргинина и лизина (до 300 мМ) ускоряют агрегацию УФ-облученного БСА, а более высокие концентрации начинают оказывать защитный эффект. Бетаин подавляет агрегацию при концентрациях выше 100 мМ. Трегалоза и 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин обладают выраженной антиагрегационной активностью при всех изученных концентрациях.

Выводы. Изучена кинетика тепловой агрегация БСА, предварительно подвергнутого УФ-облучению, при 50 °С. Скорость-лимитирующей стадией процесса является агрегация развернутых молекул белка. Охарактеризована термостабильность БСА при УФ-облучении. Подобраны условия для использования УФ-облученного БСА в качестве модельного объекта для изучения и количественной оценки влияния различных агентов на кинетику агрегации белка. Показано, что наиболее эффективно подавляет агрегацию трегалоза и 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин.

ВХ14. Получение поликлональных антител, специфичных к белку VPg Y вируса картофеля

В.Ю. Корчинская (KorchinskayaV@yandex.ru)^{1,2}, В.Д. Карлов², О.И. Клычников¹

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

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, Москва

Введение. Вирус Y является экономически значимым патогеном для семейства пасленовых, включая картофель [1]. Ключевую роль в репродукции данного вируса играет белок VPg, ковалентно связанный с 5'-концом вирусной РНК. Взаимодействие VPg с фактором инициации трансляции 4E (eIF4E) приводит к рекрутированию комплекса трансляции клетки-хозяина [2]. Для растений картофеля не было установлено *in planta*, какие именно изоформы eIF4E использует вирус Y. При этом было показано, что в распространении потивирусов и развитии инфекции могут быть задействованы и другие вирусные белки, например, HC-Pro [3][4]. Идентификация белков, входящих в комплекс вирусной трансляции, облегчит понимание механизмов заражения и формирования устойчивости. Целью нашего исследования является получение антител, специфичных к вирусному белку VPg, которые могут быть использованы для ко-иммунопреципитации комплекса вирусной трансляции.

Материалы и методы. Нами была создана генетическая конструкция для экспрессии рекомбинантного VPg в клетках *E. coli*, содержащая в своем составе His-tag для очистки VPg и сайт для специфического протеолиза тага. После очистки белка, была проведена иммунизация и получена сыворотка кроличьих поликлональных антител. Антитела аффинно очищали с помощью белка VPg, иммобилизованного на сефарозе. Полученные поликлональные антитела тестировали вестерн-блоттингом и дот-блоттингом и установили, что они способны связывать VPg как в денатурированной, так и в нативной форме в количестве 0.1мкг и менее. Для проверки взаимодействия антител и VPg в условиях *in planta* использовались зараженные Y вирусом растения, которые предварительно проверяли ОТ-ПЦР РВ на наличие вируса.

Результаты. В результате проделанной работы были получены поликлональные антитела, успешно детектировавшие VPg вируса Y в лизате листьев зараженного картофеля

Выводы. Полученные антитела могут быть использованы для ко-иммунопреципитации комплекса вирусной трансляции и определению входящих в него белковых компонентов.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (Грант №21-76-10050).

Литература

1. Quenouille J., Vassilakos N., Moury B. (2013) Potato virus Y: A major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.*, 14, 439–452. 10.1111/mpp.12024.
2. Borden K., Volpon L. (2020) The diversity, plasticity, and adaptability of cap-dependent translation initiation and the associated machinery. *RNA Biol.*, 17(9), 1239–1251. 10.1080/15476286.2020.1766179
3. Seo J.-K., Kang S.-H., Seo B.Y., Jung J.K., Kim K.-H. (2010) Mutational analysis of interaction between coat protein and helper component-proteinase of Soybean mosaic virus involved in aphid transmission. *Mol Plant Pathol.* 11(2): 265–276. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00603.x
4. De S., Pollari M., Varjosalo M., Mäkinen K. (2020) Association of host protein VARICOSE with HCPro within a multiprotein complex is crucial for RNA silencing suppression, translation, encapsidation and systemic spread of potato virus A infection. *PLoS Pathog.* 16(10): e1008956. doi: 10.1371/journal.ppat.1008956

БХ15. Характеристика свойств обычного и серповидноклеточного гемоглобинов при образовании нековалентного комплекса с глутатионом.

Ю.Д. Кулешова (*juliakuleshovaa@yandex.ru*), И.Е. Петрушанко

ФГБУН институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук

Гемоглобин является мажорным белком эритроцитов, основная функция которого заключается в снабжении тканей кислородом. Единичная аминокислотная замена глутаминовой кислоты на валин в β -субъединице приводит к образованию серповидноклеточного гемоглобина (HbS), который при деоксигенации образует тяжи и обладает сниженным сродством к кислороду(1). В недавней работе Fenk at al (2) было обнаружено, что гемоглобин способен образовывать нековалентный комплекс с восстановленным глутатионом (GSH). При этом сродство к кислороду повышается. В данной работе мы оценили, как образование нековалентного комплекса с глутатионом влияет на структуру обычного и серповидноклеточного гемоглобина. С этой целью было охарактеризовано изменение спектров кругового дихроизма (КД) в ультрафиолетовой области и полосе Соре, а также изменение

флуоресценции триптофанов гемоглобина вблизи сайтов связывания до и после образования комплекса с GSH.

В результате образования нековалентного комплекса гемоглобина с глутатионом мы наблюдали сдвиг в коротковолновую область пика в спектре КД в полосе Соре. Максимум спектра поглощения также сдвинулся в коротковолновую область. Таким образом, мы можем говорить об изменениях в геми/гемовом окружении при образовании нековалентного комплекса. В случае серповидно клеточного гемоглобина образование нековалентного комплекса приводило к еще более выраженному сдвигу в коротковолновую область спектра КД и спектра поглощения. Установлено, что образование нековалентного комплекса обычного и серповидноклеточного гемоглобина с восстановленным глутатионом не приводит к изменению вторичной структуры.

Образование нековалентного комплекса приводит к увеличению амплитуды пика спектра триптофановой флуоресценции. Это свидетельствует об изменениях в триптофановом окружении вблизи сайтов связывания. При этом пик спектра HbS имеет меньшую амплитуду относительно обычного гемоглобина, что согласуется с данными литературы, а добавление глутатиона приводит к значительному увеличению амплитуды (до уровня обычного гемоглобина).

Таким образом, образование нековалентного комплекса оказывает влияние на конформацию гемоглобина, что может быть причиной повышения аффинности к кислороду.

Литература

1. Amgad Abdu; José Gómez-Márquez; Thomas K. Aldrich (2008). The oxygen affinity of sickle hemoglobin. 161(1), 0–94.
2. Fenk, Simone & Melnikova, Elizaveta & Anashkina, Anastasia & Poluektov, Yuri & Zaripov, Pavel & Mitkevich, Vladimir & Tkachev, Yaroslav & Kaestner, Lars & Minetti, Giampaolo & Mairbäurl, Heimo & Goede, Jeroen & Makarov, Alexander & Petrushanko, Irina & Bogdanova, Anna. (2022). Hemoglobin is an oxygen-dependent glutathione buffer adapting the intracellular reduced glutathione levels to oxygen availability. Redox Biology. 58. 102535.

БХ16. Получение рекомбинантного химерного белка, состоящего из фрагмента сердечной изоформы тропонина I (20-190 АК) и полноразмерного тропонина С человека, и исследование его иммунохимических свойств

Д.Р. Луцицкий (lisitskiivulpes@gmail.com), Е.А. Елесина (elesina.ek@gmail.com), М.П. Пестрякова (m.pestryakova20@gmail.com)

МГУ, биологический факультет, кафедра биохимии

Введение. Иммунохимическая детекция сердечной изоформы тропонина I (TnI) в крови является одним из основных методов диагностики инфаркта миокарда. В

крови больных с инфарктом TnI представлен в виде комплексов с тропонином C (TnC) и/или тропонином Т (TnT). Важным компонентом диагностической системы является белок-стандарт, относительно которого определяется концентрация биомаркера в клиническом образце. Одним из вариантов создания белка-стандарта может быть химерный белок, состоящий из TnC и стабильного центрального фрагмента TnI, содержащего 20–190 аминокислотные остатки белка.

Цель. Получить рекомбинантный химерный белок, состоящий из фрагмента TnI (20-190 АК) и полноразмерного TnC человека, соединенных гибким (GGGGGS)₄ линкером, (TnI(20-190)TnC) в прокариотической экспрессионной системе (*E. coli*) и исследовать его иммунохимические свойства.

Материалы и методы. Методом ПЦР с перекрывающимися праймерами был получен ген, кодирующий TnI(20-190)TnC. Полученную конструкцию клонировали в вектор pET22b(+) и трансформировали в экспрессионный штамм *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS. Экспрессированный TnI(20-190)TnC очищали с помощью аффинной хроматографии на аффинном носителе с антителами, специфичными к различным участкам TnI. Концентрацию полученного белка определяли с помощью сэндвич-ИФА. Возможность связывания химеры с TnT изучали, смешивая TnI(20-190)TnC с рекомбинантным TnT в эквимольном соотношении, а затем измеряя иммунохимическую активность, используя пары антител, специфичные к разным компонентам тропонинового комплекса.

Результаты. Методом ПЦР с перекрывающимися праймерами получили ген, кодирующий TnI(20-190)TnC. С помощью аффинной хроматографии получен очищенный препарат TnI(20-190)TnC. TnI(20-190)TnC способен образовывать комплекс с TnT, однако с меньшей эффективностью, чем рекомбинантный комплекс TnI:TnC.

Выводы. Получен рекомбинантный белок, который может быть использован в качестве стандарта для иммунохимического определения TnI, а также для исследования взаимодействия белков тропонинового комплекса.

БХ17. Изоформы тропомиозина, участвующие в онкотрансформации: структурные и функциональные особенности

А.С. Логвинов (logvinov.andrew@mail.ru)

Лаборатория структурной биохимии белка, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Тропомиозин (Trpm) – белок, который формируют протяженный тяж вдоль актина. Trpm определяет функциональные особенности актинового филамента и играет важную роль в его регуляции. В различных тканях человека экспрессируется около 30 изоформ Trpm. Известно, что при онкологических заболеваниях в тканях происходит изменение изоформного состава Trpm: экспрессия Trpm2.1, Trpm2.2,

Трм4.1 снижается, а количество Трм3.1, Трм4.2 в клетках увеличивается. В нашей работе мы исследовали структурно-функциональные свойства этих изоформ Трм. В работе использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии для оценки стабильности изоформ Трм; метод регистрации светорассеяния для измерения температурной стабильности комплексов Трм с F-актином. В рамках функциональных исследований методом коседиментации при высокоскоростном центрифугировании определяли сродство изучаемых изоформ Трм к F-актину, а также влияния Трм на работу кофилина-1. Кофилин-1 - белок, который определяет динамику актинового цитоскелета и способствует его деполимеризации.

Изоформы Трм, экспрессируемые в раковых клетках, имели более высокую термостабильность чем те, которые обычно встречаются в здоровых тканях. Также оказалось, что термостабильность комплексов актин-тропомиозин хорошо соотносится с термостабильностью свободного Трм. Сродство Трм к F-актину было практически одинаковым для всех изучаемых изоформ Трм, кроме Трм4.2, аффинность которой была в 2 раза выше. В экспериментах с кофилином-1 мы обнаружили, что изоформа Трм4.2 выделяется среди остальных Трм, Трм4.2 способствует деполимеризации актина. Изоформа Трм3.1 отличалась тем, что даже при низких концентрациях кофилина-1 позволяла ему связываться с F-актином, что может способствовать быстрой разборке F-актина в определенных условиях. Таким образом, обе изоформы Трм, экспрессия которых увеличивается при онкологических заболеваниях, влияют на работу кофилина-1.

В ходе работы были установлены различия в структурно-функциональных свойствах Трм. Полученные данные могут частично объяснять роль различных Трм в онкотрансоформации.

БХ18. Локализация каротиноид-связывающего участка в белке AstaP из зеленой водоросли

Д.А. Лунегова (*dasha-lun@mail.ru*)¹, Ю.Б. Слонимский¹, Н.А. Егоркин¹, Н.Н. Случанко¹

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

Каротиноиды - природные антиоксиданты, применение которых в биотехнологии и медицине перспективно, но ограничено низкой растворимостью в водных растворах. Одним из способов решения этой проблемы является применение водорастворимых каротиноид-связывающих белков. Перспективным кандидатом является атаксантин-связывающий белок (AstaP) из зеленых водорослей рода *Scenedesmus* благодаря небольшой молекулярной массе и широкому репертуару связываемых каротиноидов. На основе предсказания структуры AstaP нейросетью AlphaFold2 и анализа множественного выравнивания последовательностей белка AstaP-orange1 и его гомологов AstaP-pink1 и AstaP-pink2, была предположена каротиноид-связывающая роль центральной части молекулы - фасциклинового домена, однако роль разупорядоченных N- и C-концевых сегментов оставалась

неясна. Целью данной работы было выяснение функционального значения центрального и концевых участков AstaP-orange1 при исследовании ряда мутантных форм белка.

Апоформы AstaP были получены в обычных клетках *E. coli* BL21(DE3). Для получения холоформ экспрессию проводили в каротиноид-продуцирующих штаммах BL21(DE3), либо реконструировали каротинопротеины при добавлении каротиноидов к апоформам *in vitro*. Белки очищали методом вычитающей никель-аффинной и гель-хроматографии.

Обнаружено, что как AstaP-orange1, лишенный N- и C-концевых сегментов (AstaP Δ NC), так и гомолог AstaP-pink1, соответствующий по длине фасциклиновому домену, эффективно образовывали холоформы с зеаксантином, кантаксантином и астаксантином. Связывание каротиноида приводило к почти полному тушению флуоресценции единственного остатка триптофана-79 в центральном домене, что однозначно локализовало участок связывания в рамках этого домена. Для белка SynAstaP, гомолога с естественной заменой W79F, показано отсутствие взаимодействия с зеаксантином как при экспрессии в *E. coli*, так и при добавлении каротиноида *in vitro*. В то же время AstaP, содержащий замену W79F, сохранил способность связывать каротиноид зеаксантин.

Наши результаты свидетельствуют о том, что участок связывания каротиноида расположен в фасциклиновом домене AstaP. Остаток W79 расположен вблизи молекулы каротиноида в комплексе из-за чего претерпевает полное тушение флуоресценции, однако он не является принципиально необходимым для связывания. Ведутся работы по установлению структуры комплекса AstaP с астаксантином. Частично поддержано грантом РФФИ 20-54-12018.

ВХ19. Биологическая активность вторичных метаболитов, выделенных из твердофазной культуры гриба *Camarosporomyces flavigenus* 32.43

К.Д. Львова (kseniya.lvova.99@mail.ru)¹, А.А. Далинова²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений"

Введение. Вторичные метаболиты *Camarosporomyces flavigenus* 32.43 могут выступать в качестве новых перспективных средств защиты растений или лекарств. Так как экстракты гриба проявляют антимикробную активность в отношении возбудителей бактериозов растений, также фитотоксическую активность в отношении арабидопсиса и пырея ползучего.

Материалы и методы. *C. flavigenus* 32.43. культивировали на автоклавированной пшениной крупе в темноте в течение 3-х недель при температуре 24°C. Метаболиты экстрагировали в УЗ-ванне с помощью системы МеОН:Н₂О (1:1, по объему). Затем

водную вытяжку экстрагировали методом жидкость-жидкостной экстракции хлористым метилом. Индивидуальные вещества из экстрактов выделяли при помощи хроматографии среднего и высокого давления

Результаты. С помощью методов УФ-, масс- и ЯМР-спектроскопии были идентифицированы как уже известные вещества – 6-гидроксимеллеин, 7-хлор-6-метоксимеллеин, вермелхотин и клаватол, а также ранее не описанное вещество – 7-хлор-8-метоксимеллеин.

Меллеины проявили фитотоксическую активность только на одном тест-растении и проявляют слабую антимикробную активность. Вермелхотин и клаватол проявляют сильную фитотоксичность на обоих тест-растениях, антимикробная активность отсутствует. Все вещества не токсичны по отношению к инфузориям. Активность хлорированных меллеинов оценена впервые в рамках нашей работы.

Выводы. *C. flavigenus* 32.43 является продуцентом БАВ, которые проявляют биологическую активность, перспективную в защите растений.

БХ20. Улучшение гетерологической биолюминесцентной системы грибов путем использования гомологичных ферментов гиспидин-3-гидроксилаз

А.К. Малышевская (alenamal00@gmail.com)

Лаборатория Химии метаболических путей ИБХ РАН

Введение. Биолюминесценция широко используется исследователями как инструмент визуализации биологических процессов, в том числе *in vivo*. Большинство биолюминесцентных систем требует внесения в исследуемый организм субстрата – люциферина, что делает исследование сложнее и дороже. Автономная биолюминесцентная система из грибов лишена этого недостатка – в ней люциферин синтезируется автономно из предшественника – и применима для эукариот, что делает ее уникальной и незаменимой на сегодняшний день. Актуальной задачей является улучшение этой системы для увеличения интенсивности биолюминесценции и, как следствие, чувствительности этого метода визуализации. Данная работа направлена на оптимизацию биосинтеза люциферина из гиспидина путем использования гиспидин-3-гидроксилаз, гомологичных исходному ферменту.

Материалы и методы. Получали стабильные линии дрожжей, экспрессирующих гены люциферазы и одной из выбранных гиспидин-3-гидроксилаз, на колонии дрожжей наносили раствор гиспидина, получали изображения колоний в темноте и программно анализировали уровень биолюминесценции колоний с каждой из гидроксилаз. С помощью агроинфильтрации растительной культуры клеток *Nicotiana tabacum* BY-2 и тканей листа *Nicotiana benthamiana* проводили временную экспрессию генов гиспидин-3-гидроксилаз и всех остальных ферментов,

необходимых для биолуминесценции. Анализировали уровень биолуминесценции аналогично.

Результаты. Мы проанализировали 18 ферментов гиспидин-3-гидроксилаз из последовательностей геномов грибов и обнаружили ферменты из *Armillaria ostoyae* и *Armillaria fuscipes*, которые увеличивают интенсивность биолуминесценции колоний дрожжей в присутствии 10 мМ гиспидина по сравнению с исходной приблизительно в 25 и в 20 раз, соответственно. Также обнаружили фермент из *Muscena citricolor*, который увеличивает по сравнению с исходной интенсивность биолуминесценции растительных организмов в 1,5-3 раза в зависимости от используемой системы.

Выводы. С помощью исследования гомологичных ферментов гиспидин-3-гидроксилаз удалось улучшить биолуминесцентную систему грибов, что позволит в дальнейшем увеличить чувствительность биолуминесцентного метода визуализации для использования в различных областях науки.

БХ21. Анализ аминокислотных остатков пептида Ms11a-3 функционально значимых для связывания с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами.

Д.В. Николаева (daniva0103@gmail.com)¹, И.Е. Кашеверов², Е.Е. Малеева², Я.А. Андреев^{1,2}

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

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

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) – ионотропные лиганд-зависимые рецепторы, участвующие в синаптической передаче и различных сигнальных каскадах в центральной и периферической нервной системе. В ядре морской анемоны *Metridium senile* найдены новые пептиды-ингибиторы различных подтипов nAChR. Установлено, что они имеют структуру, отличную от уже известных ингибиторов nAChR (модификация укладки пептида типа «цистеиновый узел» с удлинённой петлей между Cys5 и Cys6), поэтому могут служить новыми фармакологическими инструментами. Пептид Ms11a-3 продемонстрировал уникальный профиль селективности, эффективно блокируя нейрональные $\alpha 9\alpha 10$ и, в меньшей степени, мышечные подтипы nAChR.

Для выявления аминокислотных остатков функционально значимых в связывании с nAChR проведен сайт-направленный мутагенез синтетического гена пептида Ms11a-3 клонированного в плазмидный вектор. Путём экспрессии в *E. coli* получены мутанты этого пептида, содержащие следующие замены: остатки аргинина в позициях 11 и 14 заменены на остатки аланина (мутанты R11A и R14A). Также получен мутант, содержащий замену шести аминокислотных остатков между Cys2 и Cys3 на гомологичный участок токсина из структурного класса 11a тарантула *Psalmopoeus cambridgei*. Эффективность связывания и ингибирования

наХР мышечного подтипа полученными мутантами проверяли, используя метод радиолигандного анализа.

Эффективность связывания ни одного из полученных мутантных пептидов в значительной степени не отличалась от Ms11a-3 дикого типа, из чего следует, что аргинин в позициях 11 и 14, а также участок пептида между Cys2 и Cys3 не участвуют в связывании Ms11a-3 с мышечным подтипом наХР.

Установление сайта связывания пептида Ms11a-3 с различными типами наХР требует проверки других аминокислотных остатков, предположительно участвующих в связывании. На данный момент исследуются мутантные пептиды с заменами на аланин в позициях Y27, W35, с двумя заменами R23 и R24, а также с четырьмя заменами R23, R24, R31, R39 и R41.

ВХ22. Влияние условий молекулярного краудинга на агрегацию лизоцима белка куриного яйца

Н.Н. Никульцева (natalie.nikul@gmail.com)^{1,2}, В.А. Борзова¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, лаб. структурной биохимии белка

²Российский университет дружбы народов

Введение. Амилоидные агрегаты (фибриллы) представляют собой повторяющиеся белковые структуры, богатые β-слоями. Все биофизические и биохимические процессы в клетке, в том числе агрегация белков, протекают в условиях макромолекулярного краудинга. Таким образом, изучение агрегации белков в условиях краудинга *in vitro* позволяет приблизиться к пониманию механизмов этого процесса *in vivo*.

Материалы и методы. Агрегация лизоцима белка куриного яйца (HEWL) изучалась при 57°C с перемешиванием (300 rpm) и без перемешивания. Использовались методы флуоресцентного окрашивания тиофлавином Т и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). В качестве краудинг-агентов использовались фикоил и декстран с молекулярной массой 70 кДа, полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 2 кДа и 20 кДа.

Результаты.

При инкубировании без перемешивания флуоресценции окрашенных тиофлавином Т агрегатов HEWL, полученных в условиях краудинга ниже, чем без краудинг-агентов.

При перемешивании интенсивность флуоресценции окрашенных тиофлавином Т агрегатов HEWL с фикоиллом, ПЭГ 2 кДа и 20 кДа выше, а с декстраном ниже, чем без краудинг-агентов.

При сравнении агрегатов, полученных без краудинг-агентов, показано, что интенсивность флуоресценции тиофлавина Т при перемешивании ниже, чем в случае без перемешивания.

На снимках ПЭМ видно, что в образцах, полученных без краудинг-агентов образуются длинные и разветвленные фибриллы. Аморфные агрегаты отсутствуют. В образцах с краудинг-агентами присутствуют аморфные агрегаты, а сами фибриллы менее разветвленные.

Выводы. При инкубировании без перемешивания все использованные краудинг-агенты в большей или меньшей степени подавляют амилоидную агрегацию HEWL. При перемешивании подавление агрегации происходит только в присутствии декстрана. Остальные краудинг-агенты в этом случае усиливают агрегацию. В присутствии краудинг-агентов формируются как фибриллярные, так и аморфные агрегаты. Кроме того, фибриллы в присутствии краудинг-агентов менее разветвленные, чем в отсутствие последних.

ВХ23. Влияние природных пептидов с высокой аффинностью к «кислотному лоскуту» гистонового димера H2A/H2B на разворачивание нуклеосом комплексом FACT

П.Д. Олейников (*pasha.olejnikoff@yandex.ru*)¹, А.Л. Сивкина¹, В.М. Студитский^{1,2}, А.В. Феофанов^{1,3}, А.К. Шайтан^{1,4}

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

²Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США

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

⁴Факультет компьютерных наук, НИУ «Высшая школа экономики», Москва, Россия

Введение. Гистоновые белки и ядерная ДНК, в виде хроматина, обеспечивают организацию жизненно-важных процессов в ядрах эукариотических клеток. Поверхность нуклеосом содержит область с отрицательным электростатическим потенциалом, известную как кислотный участок, функционирующий как платформа для связывания пептидных мотивов белков, регулирующих функционирование хроматина. Одним из таких пептидов, исследуемых в данной работе, является пептид белка LANA – вирусного антигена, обеспечивающего сохранение вирусной эписомы герпесвируса KSHV. Вторым исследуемым пептидом стал фрагмент белка CENP-C, участвующего в сборке кинетохора в процессе митоза.

Материалы и методы. Нуклеосомы для экспериментов были собраны на ДНК-матрице с флуоресцентными метками с использованием донорного хроматина из эритроцитов цыплят. Контроль сборки осуществлялся с помощью электрофореза в 4% полиакриламидном геле. Для анализа взаимодействия нуклеосом с пептидами и белковым комплексом использовали spFRET-микроскопию (изучение монопептида на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии).

Результаты. Выявлено стабилизирующее действие LANA-пептида при взаимодействии с нуклеосомами, а также характерное взаимодействие CENP-C с

нуклеосомами, которое может объясняться частичным разворотом супервитков нуклеосомной ДНК под влиянием пептида. Нами также показано, что связывание исследуемых пептидов снижает эффективность разворачивания нуклеосом АТФ-независимым ремодулирующим комплексом FACT.

Выводы

1. Выявлено стабилизирующее действие LANA-пептида при взаимодействии с нуклеосомами, а также специфичное взаимодействие CENP-C с нуклеосомами.
2. Для экспериментов с влиянием пептидов на взаимодействие нуклеосом с ремодулирующим комплексом была подобрана концентрация, при которой 50% нуклеосом развернуты.
3. Показано, что исследуемые пептиды снижают процент нуклеосом, разобранных ремодулирующим комплексом.

Полученные результаты расширяют представления о механизмах взаимодействия белков хроматина с кислотным лосткутом и о потенциальном применении нуклеосом-связывающих пептидов для направленной регуляции функционирования генома. Работа выполнена при поддержке гранта Министерства Науки и Высшего Образования (номер 075-15-2021-1354).

БХ24. Динамика каталитической активности

γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы в зеленых листьях кукурузы (*Zea mays L.*) при гипоксии

Е.В. Плотникова (*kate_plotnikova36@mail.ru*), Г.Б. Анохина, А.Т. Епринцев

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»

Введение. Недостаток кислорода в среде оказывает огромное влияние на клеточный метаболизм. Известно, что нарушение работы цикла Кребса, вызванное гипоксией, приводит к активации шунта γ -аминомасляной кислоты. Однако механизм регуляции работы энергетического и пластического метаболизма в этих условиях изучен недостаточно. γ -гидроксibuтиратдегидрогеназа (ГБДГ, КФ 1.1.1.61) – энзим, обеспечивающий альтернативное превращение полуальдегида янтарной кислоты – одного из интермедиатов ГАМК-шунта, в γ -гидроксibuтират.

Материалы и методы. В качестве основного объекта исследований выступали листья кукурузы (*Zea mays L.*). Постановка эксперимента по действию гипоксии на проводилась в вакуум-эксикаторах без доступа света. В эксикатор с опытной группой в течение 24ч подавался N_2 из баллона. Контрольная группа находилась в среде с непрерывной подачей воздуха.

Определение общей ферментативной активности γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы проводили спектрофотометрически по

скорости образования НАДН при $\lambda=340$ нм в реакционной среде, содержащей: 16 мМ гидроксibuтирата натрия, 1 мМ НАД⁺, 100 мМ Tris-HCl буфер (pH 9.0).

Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли спектрофотометрически по реакции взаимодействия с 2-тиобарбитуратом, приводящей к образованию хромогена при $\lambda=532$ нм.

Результаты. Для подтверждения наличия стрессового воздействия на растительный организм был проведен анализ уровня малонового диальдегида в условиях проведенного эксперимента. Установлено увеличение уровня МДА в листьях кукурузы уже в первые часы инкубации. Максимум зарегистрирован на 24 час гипоксического воздействия (увеличение в 1.7 раза). Анализ динамики ферментативной активности ГБДГ позволил выявить существенные изменения в функционировании данного энзима. К третьему часу она достигала своего максимума, превышая первоначальные значения в 2.7 раза.

Выводы. Показано, что в первые часы гипоксического стресса наблюдается компенсаторная активация ответвления ГАМК-шунта посредством увеличения скорости функционирования гидроксibuтиратдегидрогеназы, что способствует образованию ГОМК из сукцинилового полуальдегида.

ВХ25. Определение аффинности аптамеров к EGFR и EGFRvIII методами поляризации флуоресценции и интерферометрии биослоев

А.А. Рыбина (aarybina98@gmail.com), О.М. Антипова, С.А. Еремин, А.М. Копылов

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

Введение. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) представляет собой значимый онкомаркер глиомы, сверхэкспрессированный в 40 % случаев. Иногда на злокачественных клетках представлен мутантный вариант рецептора EGFRvIII. Маркер EGFR послужил мишенью для селекции целого ряда аптамеров.

Материалы и методы. Описанные в литературе аптамеры: 2'-F-пиримидил-РНК-аптамер ME07 (48 н), ДНК-аптамеры U2 и U31 (76 н) – сравнивались с предложенными в нашей лаборатории вариантами, ДНК-аптамерами GR20 (46 н) и Gol1 (49 н). Кажущиеся константы диссоциации определяли методами поляризации флуоресценции и интерферометрии биослоев, что позволило оценить связывание аптамеров с белками в растворе и на поверхности.

Результаты. Кажущиеся константы диссоциации (K_d) комплексов аптамер-EGFR/EGFRvIII хорошо коррелируют с опубликованными ранее K_d , определенными другими методами [1].

Выводы. Полученные методом поляризации флуоресценции и методом интерферометрии биослоев K_d отличаются примерно двухкратно. Исследуемые аптамеры демонстрируют высокую аффинность к рекомбинантному белку EGFR

как в растворе, так и на поверхности биосенсоров. Предложенные укороченные варианты, ДНК-аптамеры GR20 и Gol1, также показывают высокую аффинность к EGFR.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации [проект № 075-15-2020-809 (13.1902.21.0030)].

Список литературы.

1. Cheng S. et al. PET imaging of EGFR expression using an ¹⁸F-labeled RNA aptamer // Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2019. Vol. 46(4). P. 948-956.

ВХ26. Получение рекомбинантной быстрой скелетной изоформы тропонина I человека и исследование ее иммунохимических свойств

В.П. Филимонова (alicekitova@yandex.ru), В.К. Сулягин (sulyaginvk@gmail.com)

Кафедра биохимии, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

Введение. Тропонин I (TnI) – это небольшой белок, который вместе с тропонинами С (TnC) и Т (TnT) входит в состав тропонинового комплекса – регулятора мышечных сокращений. В организме человека он представлен тремя изоформами: сердечной, быстрой и медленной скелетными. Скелетные изоформы TnI являются маркерами миопатий и аутоиммунных заболеваний. Целью работы было получение рекомбинантной быстрой скелетной изоформы TnI (hfsTnI) человека и изучение иммунохимических свойств изолированного белка и белка в составе тропонинового комплекса.

Материалы и методы. На основе вектора pET22b+ получили генно-инженерную конструкцию, кодирующую hfsTnI. Белок экспрессировали в штамме *E.coli* BL21. Очистку hfsTnI проводили методом ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе. С использованием полученного hfsTnI, а также рекомбинантных быстрых и медленных скелетных TnT и TnC конструировали тройные тропониновые комплексы. Иммунохимические свойства hfsTnI исследовали методами иммуноблоттинга, ИФА «сэндвич»-типа и иммунопреципитации. Локализацию TnI в мышечных миоцитах (C2C12) определяли иммуноцитохимическим методом.

Результаты. Получили очищенный рекомбинантный hfsTnI. Методом ИФА «сэндвич»-типа показали, что иммунохимическая активность выделенного белка и белка-стандарта совпадают. Некоторые пары антител показали перекрестное взаимодействие с медленной скелетной изоформой TnI. На основе выделенного hfsTnI был сконструирован тропониновый комплекс с быстрыми изоформами TnT и TnC и показана возможность формирования комплекса hfsTnI с медленными изоформами TnT и TnC. Продемонстрирована локализация TnI в мышечных миоцитах.

Выводы

1. Получили генно-инженерную конструкцию для экспрессии hfsTnI человека в *E.coli*.
2. В ходе экспрессии, выделения и очистки получили 7 мг электрофоретически чистого hfsTnI.
3. Иммунохимические свойства выделенного hfsTnI и белка-стандарта совпадают.
4. Выделенный hfsTnI образует комплекс как с быстрыми, так и с медленными скелетными изоформами TnT и TnC.
5. Определили локализацию TnI в дифференцированных мышечных миобластах линии C2C12.

Секция «Молекулярная и клеточная биология»

МБ1. Висцеральные стволовые клетки жировой ткани увеличивают накопление липидов в здоровых адипоцитах

М.Ю. Азарёва (amarrgo1999@gmail.com)^{1,2}, Ю.С. Стафеев¹, С.С. Мичурина^{1,3}, М.А. Болдырева^{1,4}, Е.А. Шестакова⁵, А.О. Гаврилова⁵, М.С. Синеокая⁵, М.Ю. Меньшиков¹, М.В. Шестакова⁵, Е.В. Парфенова^{1,3}

¹ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

²МИРЭА - Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Москва

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

⁴Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва

⁵ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Введение. Висцеральная жировая ткань (вЖТ) играет важную роль в развитии сахарного диабета 2 типа (СД2Т). Висцеральные адипоциты способны высвобождать в кровоток свободные жирные кислоты (СЖК), а мезенхимальные стволовые клетки висцеральной жировой ткани (вМСК) оказывают паракринное действие на различные органы и ткани, что в совокупности позволяет предположить о влиянии вЖТ на запасующую функцию подкожной жировой ткани (пЖТ). Целью работы является изучение влияния вМСК пациентов с наличием/отсутствием СД2Т на здоровые адипоциты.

Материалы и методы. Сокультивирование осуществляли в системе Transwell на пулированных культурах МСК пЖТ здоровых доноров и МСК вЖТ доноров с ожирением и СД2Т. Совместный адипогенез проводили с вМСК и пМСК, параллельно осуществляли сокультивирование здоровых адипоцитов с вМСК. Для определения включения радиоактивной метки, адипоциты инкубировали с [¹⁴C]-глюкозой, экстрагировали и омыляли. Размер липидных капель оценивали с помощью красителя BODIPY493/503. Экспрессию липогенных маркеров контролировали методом иммуноблоттинга.

Результаты. В ходе работы было обнаружено, что при сокультивировании с вМСК наблюдается увеличение уровня СЖК, при этом уровень глицерина меньше при сокультивировании с вМСК пациентов без СД2Т. Совместный адипогенез приводит к одинаковому содержанию глицерина и увеличению СЖК при сокультивировании с вМСК пациентов с СД2Т. При этом наблюдается подавление экспрессии рACC-S79 в здоровых адипоцитах после совместной дифференцировки с вМСК. Обнаружено, что размер жировых капель увеличивается при совместном адипогенезе с вМСК пациентов с СД2Т.

Выводы. Паракринное действие ВМСК приводит к увеличенному накоплению триацилглицеридов в здоровых адипоцитах. При этом обмен нутриентами при совместном адипогенезе пМСК и ВМСК пациентов с СД2Т способствует накоплению жирных кислот в здоровых адипоцитах и увеличению размера липидных капель.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 22-15-00365.

МБ2. Итаконат регулирует продукцию цитокинов посредством ингибирования сукцинатдегидрогеназы

Д.Э. Анисов (denis.anisoff@gmail.com)^{1,2}, М.С. Друцкая^{1,3}, О.А. Намаканова^{1,2}, А.С. Яковлева^{1,2}, С.А. Недоспасов^{1,2,3}, М.А. Носенко⁴

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

²Кафедра иммунологии биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

³Научно-технологический университет «Сириус», ФТ Сириус, Россия

⁴Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland

Метаболиты, помимо их основных функций в обмене веществ или в качестве источников энергии, могут непосредственно регулировать работу иммунной системы. Одним из иммунорегуляторных метаболитов является итаконовая кислота, или итаконат. Итаконат способен ингибировать сукцинатдегидрогеназу (СДГ), а также регулирует активность ряда транскрипционных факторов. Эндогенный итаконат играет роль в течение различных заболеваний, а его производные рассматриваются как потенциальные терапевтические средства. В связи с этим мы решили изучить иммунорегуляторные эффекты итаконата в модели системного воспаления у мышей.

Эксперименты проводили на первичной культуре макрофагов, полученных из костного мозга мыши. Кроме того, мышам внутрибрюшинно вводили растворы итаконата, диметилитаконата, диметилмалоната и сукцината с последующей индукцией воспаления бактериальным липополисахаридом (ЛПС).

Диметилитаконат подавлял продукцию TNF, IL-6, IL-10 в культуре макрофагов при их активации ЛПС. Однако *in vivo* системная продукция IL-6 и IL-10 при введении итаконата и ЛПС наоборот возрастала. Также введение итаконата приводило к снижению продукции IFN γ в крови у мышей. Изменения продукции IL-6, IL-10 и IFN γ были подтверждены на уровне экспрессии генов в тканях и органах. Введение диметилмалоната, другого ингибитора СДГ, приводило к схожему с диметилитаконатом паттерну изменения продукции IL-6, IL-10 и IFN γ , тогда как инъекция сукцината наоборот вызывала подавление системной продукции IL-6 и повышению IFN γ . Наконец, добавление антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина

усиливало эффекты диметилитаконата на продукцию IL-6 и IL-10, однако не влияло на падение уровней IFN γ .

Полученные результаты свидетельствуют о том, что итаконат регулирует продукцию IL-6, IL-10 и IFN γ в условиях воспаления посредством подавления активности СДГ. Частично это может быть обусловлено изменением уровней активных форм кислорода.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (проект № 19-75-30032).

МБ3. Нокаут генов протеазы S и ее ингибитора усиливает инсектотоксичность культуральной среды бактерии *Photorhabdus laumondii*

Д.Р. Бекмансуров (riodan44a@gmail.com), М.А. Карасева

Лаборатория функциональной энзимологии НИЦ «Курчатовский институт»

Протеаза S (PrtS) – протеализинподобная металлопротеаза (ППМ) энтомопатогенной люминесцентной бактерии *Photorhabdus laumondii*. Считается, что PrtS является фактором патогенности, участвует в подавлении иммунной защиты насекомых. Однако прямых подтверждений этому нет. В геноме *P. laumondii* ген *prtS* локализован с геном фоторина (Phin) – белка, относящегося к семейству эмфориноподобных ингибиторов ППМ. Данных о функциях Phin в настоящее время нет, но, по-видимому, он регулирует активность PrtS.

Для изучения роли PrtS и Phin в патогенезе мы получили вариант *P. laumondii*, в котором их гены инактивированы при помощи делеции без нарушения рамки считывания. Сравнение бактерий дикого типа (WT) с нокаутным вариантом (КО) показало, что их кривые роста и профили биолюминесценции не отличаются. В то же время у КО снижена способность к образованию биопленок и роению. Инсектотоксичность бактерий и культуральной среды была исследована на модели *Galleria mellonella*. При инъекции клеток WT и КО в гемолимфу гусениц заметных различий в гибели насекомых не наблюдалось. Однако инсектотоксичность культуральной среды КО была значительно выше, чем у WT: через 72 ч после инъекции погибало в 6 раз больше животных.

Таким образом, нами впервые получены данные о том, что PrtS влияет на свойства *P. laumondii*, которые могут быть важны для развития инфекции. Это свидетельствует в пользу гипотезы об участии протеазы в патогенезе. Однако нам не удалось выявить влияния нокаута генов *prtS* и *phin* на гибель насекомых, что, возможно, связано с особенностями экспериментальной системы. Полученный вариант *P. laumondii* позволяет продолжить исследования роли PrtS и Phin в патогенезе с использованием других подходов, а также начать работы по выяснению механизмов, определяющих изменения фенотипа бактерии при нокауте.

МБ4. Влияние теплового стресса на RAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 в кардиомиоцитах человека, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Т.К. Булгаков (*locusts2001@gmail.com*)¹, А.А. Грузель (*antekgri@mail.ru*)¹, Г.А. Дя¹, Д.А. Адашева¹, Д.В. Голиусова², О.С. Лебедева², М.А. Лагарькова², Д.В. Серебряная¹

¹Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра биохимии

²ФГБУ ФМБА ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина, лаборатория клеточной биологии

Введение. Инсулиноподобные факторы роста (IGF) – ключевые регуляторы клеточной миграции, пролиферации и дифференцировки, оказывающие кардиопротекторное действие. Основной механизм, регулирующий биодоступность IGF, – образование комплекса IGF с IGF-связывающими белками (IGFBP), а также расщепление последних специфичными протеазами с высвобождением IGF. Так, IGFBP-4, который связывает IGF, расщепляется протеазой RAPP-A с образованием протеолитических фрагментов NT-IGFBP и CT-IGFBP-4. Подобный механизм может являться компенсаторным и активироваться в ответ на стрессовые воздействия, поэтому целью работы было изучение влияния теплового стресса на RAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 в кардиомиоцитах человека, используя рекомбинантный NT-IGFBP-4 в качестве стандарта.

Материалы и методы. NT-IGFBP-4 экспрессировали в штамме *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS и очищали из растворимой фракции методом аффинной хроматографии на сефарозе, конъюгированной с антителами IBP180, специфичными к IGFBP-4. Иммунохимическую активность NT-IGFBP-4 определяли методом ФИА «сэндвич»-типа с использованием пары антител IBP17-IBP180Eu³⁺. Культуру кардиомиоцитов человека, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (КМ-ИПСК), характеризовали методом иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител клона 406, специфичных к кардиомаркеру тропонину Т. Тепловой стресс моделировали, инкубируя КМ-ИПСК в течение 1 часа при 42°C. Об эффективности прохождения теплового стресса судили, определяя в клетках концентрацию белка HSPB5 до и после его моделирования. Концентрацию NT-IGFBP-4 в кондиционированной среде КМ-ИПСК определяли методом ФИА «сэндвич»-типа с использованием пары антител IBP3-IBP180Eu³⁺, специфичной к неоэпиту, образуемому при RAPP-A-зависимом расщеплении IGFBP-4.

Результаты. При моделировании теплового стресса содержание белка теплового шока HspB5 возрастало в КМ-ИПСК в 1,6 раза. При тепловом стрессе уровень RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 в КМ-ИПСК возрастал в 1,5 раза.

Выводы. При моделировании теплового стресса в КМ-ИПСК уровень RAPP-A-специфичного протеолиза возрастает в 1,5 раза, что может говорить об активации высвобождения IGF при тепловом стрессе.

МБ5. Оценка совместного действия онколитического вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact и темозоломида в отношении клеток глиомы человека *in vitro*

А.А. Бывакина (a.byvakina@g.nsu.ru)^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Виротерапия является одной из наиболее перспективных технологий в лечении опухолей, в том числе глиом. Однако на данный момент в первой линии лечения глиальных опухолей применяют адъювантную химиотерапию темозоломидом. Ранее был разработан рекомбинантный штамм вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, обладающий высокой цитотоксической активностью и противоопухолевой эффективностью в отношении глиом человека.

Цель данной работы – оценить цитотоксическое действие VV-GMCSF-Lact в комбинации с темозоломидом в отношении клеток иммортализованных линий и персонализированных культур глиом человека.

Для достижения цели была проведена оценка действия VV-GMCSF-Lact в комбинации с темозоломидом по двум схемам: (1) клетки обрабатывали вирусным препаратом в дозе, равной CD50, затем добавляли темозоломид либо одновременно с VV-GMCSF-Lact, либо через 24/60 часов; (2) клетки обрабатывали темозоломидом, затем через 24 часа добавляли вирусный препарат.

Согласно полученным данным, наиболее устойчивая к действию VV-GMCSF-Lact культура BR5.21 характеризуется наибольшей чувствительностью к комбинации «вирус-темозоломид». Клетки других культур демонстрируют устойчивость при добавлении химиопрепарата через 24 часа после обработки вирусом. При добавлении темозоломида через 60 часов наблюдается синергический или аддитивный эффект для всех культур, кроме U87MG. Совместное действие по схеме «темозоломид-вирус» демонстрирует синергический или аддитивный эффекты для большинства культур, кроме наиболее чувствительной к VV-GMCSF-Lact культуры BR2.20, для нее характерен антагонистический эффект.

Полученные данные позволяют предположить, что VV-GMCSF-Lact способен ингибировать действие темозоломида в клетках глиом, что необходимо учитывать при разработке терапевтической схемы. Применение VV-GMCSF-Lact в клинике предполагает, в том числе, обработку вирусом резекционного поля. Поскольку, по данным фармакокинетических исследований вирус осповакцины характеризуется двумя волнами распространения в организме (3 и 7 суток), темозоломид необходимо вводить в схему терапии не ранее 8 суток после применения онколитического вируса.

МБ6. Изучение влияния гетерологичных сигнальных пептидов на уровень секреции гликопротеидных гормонов

П.А. Волковинская (polinavolkovinskaya@gmail.com), Д.Э. Колесов, М.В. Синегубова, И.И. Воробьев, Н.А. Орлова

ФИЦ Биотехнологии РАН

Введение. Тиреотропный гормон (ТТГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и хорионический гонадотропин человека (ХГч) образуют семейство гликопротеидных гормонов и представляют собой гетеродимерные обильно гликозилированные секретируемые белки. Они состоят из двух цепей: альфа- и бета-, при этом альфа-цепь является общей для всего семейства, а бета-цепь специфична для каждого гормона. Для секретируемых белков одной из лимитирующих стадий биосинтеза является перемещение в эндоплазматический ретикулум, на скорость которой могут оказывать существенное воздействие сигнальные пептиды, что в конечном счете влияет на общий уровень секреции белка.

Материалы и методы. Культивирование клеток *in vitro*, липосомальная трансфекция, сэндвич-ИФА

Результаты. Для четырех гормонов - ТТГ, ЛГ, ФСГ и ХГч - были созданы 4 генетические конструкции, в которых бета-цепи предшествовали следующие сигнальные пептиды: азуроцидина (Az), человеческого сывороточного альбумина (HSA), альфа-цепи гликопротеидных гормонов (alpha) и нативный сигнальный пептид бета-цепи соответствующего гормона (beta). Данными конструкциями трансфицировали клетки яичника китайского хомячка с помощью липосомального реагента GenJect-39. Для транзиентных трансфектантов измерили титр секретируемого белка с помощью сэндвич-ИФА. Установлено, что для ХГч при использовании сигнального пептида HSA уровень секреции был значительно ниже, чем в случае остальных исследованных сигнальных пептидов Az, alpha и beta.

Выводы

1. Гетерологичные сигнальные пептиды оказывают влияние на секрецию гликопротеидных гормонов в клетках яичника китайского хомячка.
2. Сигнальный пептид HSA значительно понижает титр секретируемого ХГч по сравнению с другими исследованными сигнальными пептидами Az, alpha и beta.

МБ7. Поиск анти-рестрикционного белка бактериофага T5

А.К. Головинский (golov10122005@gmail.com)¹, М.А. Скutel (mikhail.skutel@skoltech.ru)²

¹АНО ОИ ЦПМ

Бактериофаг T5 - облигатный литический фаг энтеробактерии *Escherichia coli*, обладающий устойчивостью к различным иммунным системам бактерий, работающим по принципу расщепления ДНК, таким как системы рестрикции-модификации (R-M), CRISPR-Cas и Dnd. Механизмы анти-рестрикции фага T5 на данный момент не установлены, однако данная функция предположительно связана с экспрессией пред-ранних генов. Мы показали, что одновременная инфекция культуры *E. coli* фагом T5 и фагами чувствительными к R-M системе II типа EcoRV не приводит к инаktivации EcoRV рестрикции и не защищает ко-инфицирующих фагов. Это предполагает, что механизм избегания рестрикции T5 связан с защитой собственной ДНК.

Феномен анти-рестрикции характерен для фагов рода *Tequintavirus*, в то время как фаги близкого рода *Epseptomavirus* являются чувствительными к рестрикции. Мы предположили, что получение гибридного варианта фага T5 и Bas27 позволит установить участки генома связанные с анти-рестрикцией. Клетки *E. coli*, кодирующие EcoRV были заражены смесью 2-х фагов и после этого фаголизат был высеян на штамм *ΔfluA*, не поддерживающий развитие T5. Таким образом, лишь гибридные варианты фага Bas27, приобретшие фрагмент генома T5 отвечающие за анти-рестрицию могли пройти через сито отбора. Анализ генома полученных гибридных фагов подтвердил приобретение фрагментов пред-раннего участка генома T5. Таким образом, был определен набор генов, потенциально кодирующих анти-рестрикционный белок. Проводится клонирование и проверка функциональной активности отобранных генов-кандидатов.

Было известно, что фаг T5 также избегает метилирования, что предполагало связь данной активности с анти-рестрикционной функцией. Мы подтвердили, что геном фага T5 лишен метилирования по Dam сайтам, однако, геном фага Bas27, чувствительного к рестрикции, также оказался гипометилирован, что предполагает наличие 2-х независимых механизмов для ингибирования модификационной и рестрикционной функций R-M систем T5-подобными фагами.

Исследование поддержано грантом РФФИ (22-14-00004) и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (075-10-2021-114).

МБ8. Фоторегулируемые системы редактирования генома CRISPR/Cas9 с использованием циклических фоторасщепляемых олигонуклеотидных компонентов

Е.С. Горленко (e.gorlenko@g.nsu.ru)^{1,2}, Л.В. Саковина^{1,2}, Д.С. Новопашина^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Введение. Неинвазивная регуляция путем облучения светом определенной длины волны позволяет эффективно управлять активностью различных молекулярно-биологических систем. Введение фоточувствительных компонентов в состав нуклеотидных конструкций дает возможность регулировать их активность с высоким пространственным и временным разрешением. Целью работы является разработка подходов к созданию систем редактирования генома, действие которых можно «включать» или «выключать» путем УФ-облучения.

Материалы и методы. Фотомодифицированные олигонуклеотиды, содержащие функциональные группы на 3'- и 5'-концах для осуществления циклизации, получали твердофазным фосфитамидным методом с использованием специально полученного фосфитамида на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (PL). Циклизацию олигонуклеотидов проводили методом азид-алкинового циклоприсоединения в присутствии Cu(I). В качестве модельного субстрата для проверки эффективности действия использовали плазмиду, содержащую участок узнавания системой CRISPR/Cas9 и мотив PAM. Облучение с целью линейаризации циклических олигонуклеотидов проводили с использованием света с длиной волны 365 нм.

Результаты. Продемонстрирована способность циклических фоторасщепляемых олигонуклеотидов линейаризоваться при облучении УФ-светом. Для «включения» системы использовали циклические направляющие crРНК, содержащие 2'-модифицированные рибонуклеотиды и один или два фоторасщепляемых линкера и способные линейаризоваться при облучении светом. Показано увеличение эффективности расщепления ДНК после облучения системы. Для «выключения» системы разработаны циклические блокирующие олигонуклеотиды, содержащие фоторасщепляемые линкеры и способные после линейаризации связывать направляющую РНК и блокировать действие системы. При использовании блокирующих олигонуклеотидов наблюдали уменьшение эффективности расщепления ДНК на 15% после облучения.

Выводы. Полученные результаты подтверждают перспективность предложенных подходов к использованию фоторасщепляемых циклических олигонуклеотидов в составе системы редактирования генома CRISPR/Cas9 для регуляции ее активности.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-14-00294.

МБ9. МСК жировой ткани пожилых доноров демонстрируют гетерогенность в дифференцировочном, пролиферативном потенциалах и инсулиновой сигнализации

А.А. Зиновьева (zinovevaanna356@gmail.com)¹, Е. Бахчинян¹, Е.С. Войнова¹, К.Ю. Кулебякин^{1,2}, В.Ю. Сысоева¹, П.А. Тюрин-Кузьмин¹, А.Ю. Ефименко¹, В.И. Чечехин¹, Н.С. Волошин¹

¹*Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет Фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва;*

²*Лаборатория молекулярной эндокринологии, Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Введение. Старение — это биологический процесс постепенной деградации частей и систем организма человека и последствия этого процесса. Важную роль в прогрессии процесса старения играет неизбежное истощение резервов стволовых клеток организма, что ведет к снижению способности к поддержанию гомеостаза, а также к нарушению функционирования и восстановления тканей и органов. Целью нашей работы было оценить изменения, происходящие с резидентными стволовыми клетками жировой ткани – мезенхимными стволовыми клетками при старении.

Материалы и методы.

В нашей работе использовались МСК контрольной группы (возраст доноров не более 65 лет) и полученные от пожилых доноров (старше 65 лет). Кроме того, нами использовались МСК, индуцированные к накоплению старческих признаков за счет продолжительного культивирования (более 10 пассажей: группа репликативное старение).

Индукция адипогенной дифференцировки осуществлялась при помощи дексаметазона, инсулина и IBMX. Для оценки эффективности дифференцировки клеток использовали цитофлуоресцентное окрашивание с помощью красителя Nile Red. Кроме того, дифференцировка оценивалась методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией по экспрессии ключевых маркеров дифференцировки. Для оценки активности инсулин-зависимых внутриклеточных сигнальных каскадов использовался метод иммуноблоттинга. Изучение пролиферативного потенциала осуществлялось с помощью иммуногистохимического окрашивания на белок Ki67. Для анализа кальциевого ответа на инсулин применялся флуоресцентный кальциевый краситель Fluo-8.

Результаты и выводы. В нашей работе мы обнаружили, что у многих пожилых доноров наблюдается снижение чувствительности к инсулину, коррелирующее со сниженной способностью к пролиферации и адипогенной дифференцировке, в то же время показано повышение амплитуды гормон-зависимого кальциевого ответа. Интересно, что МСК, полученные от пожилых доноров, обладали высокой степенью гетерогенности с точки зрения их пролиферативного и дифференцировочного потенциалов, а также чувствительности к инсулину. В дальнейшем мы планируем установить причины подобной гетерогенности.

МБ10. Сравнение эффективности трансфекции с помощью полимера М1-Г4 и коммерческого аналога - Липофектамина 3000

В.В. Киселева^{1,2}, М.Е. Искусных², П.А. Вишнякова^{1,2}, Е.А. Ганцова², Е.Д. Шапуткин^{3,4}, И.Э. Нифантьев^{3,4}, Т.Х. Фатхудинов²

¹ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова

²Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины, Российский университет дружбы народов

³Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова

⁴ИНХС РАН им. А. В. Топчиева

Введение. Генетическая модификация клеток с помощью трансфецирующих агентов – это распространённый метод молекулярной и клеточной биологии. Повышение эффективности доставки нуклеиновых кислот (НК) в клетки это одна из актуальных современных задач. Среди существующих методов доставки НК таких как физические, биологические и химические, последние предпочтительнее ввиду сохранения большей жизнеспособности клеток. Тем не менее разработки в данной области не прекращаются и целью данной работы стало сравнение эффективности трансфекции при использовании вновь разработанного полимера М1-Г4 (Shapitkin, 2022) и Липофектамина 3000 в экспериментах по нокудауну генов.

Материалы и методы. Эффективность трансфекции оценивали через 24 часа методом проточной цитометрии (FACS Calibur, BD) по интенсивности флуоресцентного сигнала после трансфекции клеток линии RAW264.7 siRNA Egfr – FAM (50нМ). Были использованы N/P соотношения от 6.25/1 до 25/1 (соотношения положительно заряженных аминных групп полимера М1-Г4 (N = азот) к отрицательно заряженным фосфатным группам нуклеиновой кислоты (P)). Липофектамин 3000 использовали согласно рекомендациям производителя. Нокдаун генов оценивали через 48 часов методом ПЦР. Пролиферативную активность клеток анализировали после иммуноцитохимического окрашивания антителами к белку Ki67 1/200 (Abcam).

Результаты. По данным проточной цитометрии максимальная эффективность трансфекции при использовании полимера М1-Г4 была достигнута при N/P соотношении - 25/1, составила 80% и была выше, чем при использовании Липофектамина 3000 (67%).

При использовании Липофектамина 3000 уровни экспрессии интересующих генов через 48 часов повышались (компенсаторный эффект), чего не наблюдалось при применении полимера М1-Г4.

По результатам иммуноцитохимического анализа количество Ki67 положительных клеток в контрольных образцах составило 3,9%, в образцах, обработанных

Липофектамином 3000 - 4,7% и в образцах, инкубированных с полимером M1-G4 - 16,6%.

Выводы. Использование полимера M1-G4 для доставки siRNA в клетки мышинной макрофагальной клеточной линии RAW264.7 не уступает по своей эффективности использованию Липофектамина 3000.

МБ11. Малая субпопуляция клеток, несущих на поверхности инсулиновый рецептор, регулируют адипогенную дифференцировку

Е.Р. Корчагина (korchagina.liza@mail.ru), Н.С. Волошин, К.Ю. Кулебякин

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Кафедра биохимии и молекулярной медицины 119991, Москва

В последнее время появляется все больше данных об особых функциональных популяциях жировой ткани, которые обнаруживаются среди предшественников адипоцитов – в мезенхимных стволовых клетках (МСК). В ходе наших предыдущих работ было показано наличие в первичной культуре МСК жировой ткани малой субпопуляции клеток, несущих на поверхности инсулиновый рецептор, и их возможное регуляторное влияние на адипогенную дифференцировку культуры. Для изучения данного явления была выбрана модель нарушения функции – первичная культура МСК жировой ткани доноров с подтверждённой инсулинорезистентностью.

Первичные культуры подвергали иммунохимическому окрашиванию антителами к внеклеточному домену инсулинового рецептора и выделяли малую субпопуляцию методом FACS. Далее проводили адипогенную дифференцировку в присутствии инсулина в условиях неконтактного сокультивирования малой субпопуляции с обеднённой данными клетками. Оценка дифференцировки проводилась при помощи определения транскриптов *PPAR γ* и *AdipoQ* (RealTime PCR) и флуоресцентной микроскопии с окрашиванием NileRed и DAPI.

Содержание малой субпопуляции у здоровых и инсулинрезистентных доноров различается (5-12% и 0-3,5% соответственно). Малая субпопуляция не отвечает на адипогенную дифференцировку, в то время как обеднённая популяция дифференцируется менее интенсивно, чем интактная. При неконтактном сокультивировании обнаруживается усиление дифференцировки обеднённой субпопуляции, полученной из здоровой ткани. Усиление дифференцировки происходит как в случае сокультивирования с малой субпопуляцией того же происхождения, так и с выделенной из инсулинорезистентной ткани. Одновременно с этим, инсулинрезистентная обеднённая субпопуляция не дифференцируется при сокультивировании с малой субпопуляцией любого происхождения.

Результаты работы подтверждают гипотезу, что чувствительная к инсулину субпопуляция МСК регулирует дифференцировку в адипогенном направлении всей популяции. Однако, можно предположить, что механизм инсулинорезистентности в данном случае связан не с дисфункцией малой субпопуляции, а с нечувствительностью других МСК ткани к паракринным факторам, которые продуцирует данная субпопуляция.

МБ12. Получение клеточной линии преадипоцитов 3T3-L1, экспрессирующей Glut4, и её валидация для исследования метаболических заболеваний *in vitro*.

А.Г. Косинова (sasha-kosinova@mail.ru), Н.В. Подкуйченко

НИИ экспериментальной кардиологии, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова

Изучение инсулин-зависимых способов поступления глюкозы в клетки жировой ткани необходимо для понимания и разработки ранней диагностики метаболически значимых заболеваний, в частности, сахарного диабета II типа. Самой важной стадией в регуляции инсулин-зависимого захвата глюкозы является выведение транспортеров Glut4 на плазматическую мембрану клетки. Для решения задачи количественного определения экспозиции инсулинозависимых глюкозных переносчиков Glut4 на плазматической мембране адипоцитов перспективным подходом является создание стабильной линии клеток, экспрессирующих Glut4, меченный флуоресцентным белком mCherry на части белка, находящейся внутри клетки, и содержащий на внешней петле антигенный эпитоп (с-Мус), узнаваемый специфическими антителами. Для этого мы использовали химерную конструкцию мус-Glut4-mCherry. Она позволяет оценить общий уровень ее экспрессии в клетке по флуоресценции mCherry в красном спектре, и долю химеры на клеточной мембране по флуоресценции связанных с ней антител к эпитопу с-Мус в зелёном спектре.

Мы трансдуцировали преадипоциты 3T3-L1 плазмидой мус-Glut4-mCherry. Клетки с экспрессией химерного белка селектировали на проточном цитофлуориметре BD FACSAria™ III и дифференцировали в зрелые адипоциты. Захват клетками глюкозы измеряли с помощью аналога глюкозы, $^3\text{[H]}$ -2-дезоксиглюкозы.

В полученных адипоцитах усиливается как инсулин-зависимый, так и базальный захват глюкозы, однако, это не сказывается на эффективности стимулирующего действия инсулина, которая сохраняется на уровне контроля.

Таким образом, мы получили стабильную клеточную линию адипоцитов 3T3-L1, экспрессирующих на постоянной основе химерный переносчик глюкозы мус-Glut4-mCherry. Данную клеточную линию можно использовать для исследования внутриклеточного трафика транспортера глюкозы в сочетании с измерениями транспорта глюкозы в клетки.

МБ13. Анализ роли индукторов адипогенеза в ингибировании процесса трансдифференцировки лёгочных фибробластов в миофибробласты

О.А. Лазарева (ol9ala.lazareva@yandex.ru)¹, У.Д. Дьячкова², Н.А. Басалова³, М.А. Виговский³, А.Ю. Ефименко³, О.А. Григорьева³

¹Кафедра клеточной биологии и гистологии, Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

²Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова

³Лаборатория репарации и регенерации тканей, Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М.В. Ломоносова

Процесс трансдифференцировки фибробластов в миофибробласты вовлечён в патогенез интерстициальных заболеваний лёгких, например, фиброза. Современные терапевтические подходы направлены на прекращение замещения лёгочной ткани миофибробластами в процессе развития фиброза и последующее восстановление нормальной физиологии в поражённых участках лёгкого. Последние научные данные свидетельствуют, что агонисты PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) способны эффективно ингибировать трансдифференцировку фибробластов в миофибробласты и индуцировать их переход в липофибробласты – стромальные клетки лёгких, содержащие липидные капли и вовлечённые в норму в выработку сурфактанта. Мы проанализировали, возможность подавления дифференцировки фибробластов лёгких с помощью индукции адипогенеза.

В ходе нашего исследования трансдифференцировка фибробластов лёгких индуцировалась добавлением в среду для культивирования клеток TGF β -1 (transforming growth factor beta – 1). Через сутки клеткам добавляли смесь индукторов адипогенеза в составе коммерческой среды (Gibco, США), либо комплекс инсулина, дексаметазона и IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine). Для оценки процесса дифференцировки в миофибробласты анализировали уровень α -гладкомышечного актина методом вестерн-блота и выявляли α SMA-стресс-фибриллы методом иммуноцитохимии в клетках через 4 суток после начала эксперимента.

При добавлении индукторов адипогенеза TGF β -индуцированным фибробластам наблюдалось значительное уменьшение числа α SMA-стресс-фибрилл по сравнению с клетками, которые инкубировались только с TGF β -1. Данные результаты подтверждались полуколичественным анализом содержания α SMA в лизатах клеток методом вестерн-блота. Стоит отметить, что использование различных адипогенных составов дало сходный результат.

Полученные нами данные позволяют сделать вывод, что индукция адипогенеза способствует ингибированию дифференцировки миофибробластов и снижению уровня α SMA в TGF β -стимулированных фибробластах. Поиск ключевых факторов

ингибирования канонических и неканонических путей TGF β -сигналинга в лёгочных фибробластах требует дальнейшего изучения.

Исследование было выполнено при поддержке РФФИ (№21-315-70002).

МБ14. Протеомические подходы для изучения окислительного стресса при индукции ферроптоза

В.С. Ледаева¹, Д.А. Корженевский², А.М. Нестеренко³, А.Г. Шохина (a.g.shokhina@yandex.ru)^{1,2,3}

¹Лаборатория экспериментальной онкологии НИИ трансляционной медицины РНИМУ им. Н.И.Пирогова, 117997, Москва, Россия

²Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, 117997, Москва, Россия

³Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 117997, Москва, Россия

Введение. Ферроптоз – один из типов программируемой клеточной гибели, характерными чертами которого являются зависимость от внутриклеточного железа и накопление продуктов перекисного окисления липидов. Однако молекулярные основы внутриклеточных процессов, индуцирующих развитие ферроптоза в физиологических условиях, во многом не определены. На данный момент существует пул работ, указывающих, что мембранные белки некоторых клеточных компартментов, например, ЭПР и пероксисом, могут привносить специфический вклад в развитие ферроптоза. Целью данной работы является анализ изменений протеомического профиля модельной клеточной линии Pfa1, которая представляет собой 4-ОН-ТАМ-индуцибельные Grx4^{-/-} иммортализованные мышинные фибробласты, в ходе развития ферроптоза.

Материалы и методы. Для анализа тотального протеома клеток линии Pfa1 применяли методику безметочной количественной оценки. Для этого ферроптоз индуцировали внесением тамоксифена, приводящего к нокауту гена глутатионпероксидазы-4. Для мониторинга изменений в белковой фракции мембран ЭПР при индукции ферроптоза с помощью метода Proximity Labeling была создана и охарактеризована модельная линия Pfa1-APEX2-ERM со стабильной экспрессией рекомбинантного белка APEX2 (аскорбатпероксидаза дрожжей), заякоренного в мембране ЭПР.

Результаты. Генетическая индукция ферроптоза в клетках линии Pfa1 приводит к детектируемым изменениям на протеомическом уровне. Полученная модельная линия Pfa1-APEX2-ERM со стабильной экспрессией APEX2 в мембране ЭПР охарактеризована методами qRT-PCR и иммуноцитохимическим, внутриклеточная локализация APEX2 в пределах ЭПР подтверждена.

Выводы. Результаты анализа протеома клеточной линии Pfa1 в условиях индукции ферроптоза указывают на ряд изменений в профиле экспрессии некоторых белков ЭПР и аппарата Гольджи, принимающих участие в траффике везикул между данными компартментами. Полученная валидированная

клеточная линия Pfa1-APEX2-ERM в перспективе позволит провести анализ локальных изменений протеомной фракции мембраны ЭПР в ходе развития ферроптоза.

МБ15. Оптимизация подходов формирования гомо- и гетеротипических трехмерных моделей рака молочной железы

А.А. Леонтьева (a.leonteva2@g.nsu.ru)², М.М. Абдурахманова¹, С.П. Зверева^{1,2}, В.А. Рухтер¹, О.А. Коваль^{1,2}, А.А. Нуштаева¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

Введение. Сфероиды — удобная клеточная модель злокачественных опухолей, но подходы к их формированию многообразны и противоречивы. В данной работе оценивается эффективность формирования гомо- и гетеротипических сфероидов из линий клеток рака молочной железы (РМЖ) при применении субстратов простых гидрогелей и культурального пластика с низкоадгезивными свойствами, а также рассматривается оптимизация условий приготовления препаратов для микроскопии.

Материалы и методы.

Сфероиды конструировали из опухолевых MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 и стромальных BrC4f, BrC120f, BN120f клеток.

Формирование проводили в двух режимах: моно-культивирования (3D), при котором сфероид формировался только из опухолевых или из стромальных клеток, и со-культивирования (3D-2) опухолевых и стромальных клеток. В обоих режимах сфероиды формировали на субстрате из природных гидрогелей (2%-желатин, 2%-агароза, Matrigel™) или на низкоадгезивном пластике (Eppendorf и Nunclon™ Sphera™).

Для морфологического анализа полученных сфероидов готовили «раздавленные» препараты, используя охлажденные и неохлажденные наконечники, растворы и дно планшета со сфероидами.

Результаты. Применение только одного типа субстрата не позволяет получить весь спектр 3D структур. Использование 2%-желатина не позволяет сформировать сфероиды ни из одной из использованных культур клеток. Для 3D-моделей из фибробластов больше подходит субстрат из 2%-агарозы, а из опухолевых клеток – Matrigel™; применение низкоадгезивного планшета Nunclon™ Sphera™ предпочтительнее для культивирования 3D-2 сфероидов, чем применение планшета Eppendorf, на котором происходит адгезия сфероидов. Применение

охлажденного пластика и растворов способствует сохранности структуры сфероидов при пробоподготовке к микроскопии.

Выводы. В ходе работы был проведен сравнительный анализ нескольких типов субстратов и планшетов с низкоадгезивным покрытием, используемых для формирования 3D и 3D-2 моделей из опухолевых и стромальных клеток РМЖ и оптимизирован протокол приготовления «раздавленных» препаратов полученных сфероидов.

Исследование поддержано грантом РНФ №20–74–10039

МБ16. Изучение возникновения резистентности к спарсомицину у эукариотических клеток

С.Е. Лозунов (*stepa.2003@bk.ru*)^{1,2}, И. Чекмарёв³, С.С. Марьясина¹, О.А. Донцова¹, П.В. Сергиев¹

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

²ФГБОУ ВО Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

³Школа имени Маршала В.И. Чуйкова

Введение. Спарсомицин — бактериостатический антибиотик, продуцируемый *Streptomyces sparsogenes*, обратимо ингибирующий связывание тРНК с А-сайтом большой субъединицы рибосомы [1]. Спарсомицин взаимодействует с бактериальной и эукариотической рибосомой [2]. Предполагалось использовать спарсомицин в качестве противоопухолевого агента, однако обнаружилось, что он вызывает ретинопатию. Тем не менее, производные спарсомицина могут представлять клинический интерес [3].

Материалы и методы. С помощью библиотеки лентивирусов Brunello создана библиотека нокаутных клеток линии Nap1 по 19114 генам. После инкубации со спарсомицином проведено высокопроизводительное секвенирование гидовых РНК выживших клеток. В результате обнаружен ряд генов, потенциально влияющих на устойчивость к спарсомицину. Для подтверждения их участия в формировании резистентности методом CRISPR/CAS9 получены стабильные клеточные линии, нокаутные по какому-либо из обнаруженных генов. Для этого получены четыре конструкции на основе вектора рх458, кодирующие гидовые РНК, нацеленных на определённый ген, и трансфицированы в клетки. Полученные в результате моноклональные культуры генотипировали секвенированием.

Результаты. При обработке спарсомицином выживают клетки, нокаутные по генам *SMARCA4*, *ELF2*, *WDR48*, *ASH2L*. *SMARCA4* отвечает за регуляцию транскрипции путем ремоделирования хроматина, *WDR48* активирует деубиквинтирующую способность убиквитин-специфичной пептидазы 1, *ELF2* регулирует активность транскрипционного фактора RUNX1, а *ASH2L* обеспечивает третье метилирование гистона H3. Обнаруженные гены кодируют белки, участвующие в регуляции транскрипции. Но, по-видимому, они участвуют также в выработке резистентности к спарсомицину.

Для изучения резистентности к спарсомицину получены клетки, нокаутные по этим генам. Подготовлено 2 линии, нокаутные линии по *SMARCA4*, 3 — по *ELF2* и 2 — по *WDR48*.

Выводы

1. Ряд белков, участвующих в регуляции транскрипции, могут отвечать за резистентность к спарсомицину.
2. Для дальнейшего исследования резистентности эукариотических клеток к спарсомицину получены стабильные клеточные линии, нокаутные по кодирующим эти белки генам.

Литература

1. Moazed D., Noller H. F. Sites of interaction of the CCA end of peptidyl-tRNA with 23S rRNA //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1991. – Т. 88. – №. 9. – С. 3725-3728.
2. Lazaro E. et al. A Sarsomycin-resistant Mutant of Halobacterium Salinarium Lacks a Modification at Nucleotide U2603 in the Peptidyl Transferase Centre of 23S rRNA //J. Mol. Biol. – 1996. – Т. 264. – С. 839.
3. Lazaro E. et al. Interaction of the antibiotic sparsomycin with the ribosome //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1991. – Т. 35. – №. 1. – С. 10-13.

МБ17. Поиск новых триггеров системы abortивного иммунитета PARIS

Е. Лукьянчикова (lukianchikova@tim-stud.ru)¹, М. Скутель (mikhail.skutel@skoltech.ru)², А. Исаев (tcft18@gmail.com)²

¹РГАУ-МСХА им.К.А. Тимирязева

²Сколковский институт науки и технологий

PARIS - Phage Anti-Restriction Induced System - бактериальная система abortивной защиты от фагов, которая в качестве сигнала вирусной инфекции распознает вирусные белки-триггеры и вызывает остановку роста в инфицированных клетках. Известный пример вирусного триггера - белок Ocr бактериофага T7 - является ДНК-мимиком и способен ингибировать действие систем рестрикции модификации и BREX.

Поскольку система PARIS обладает широким спектром защиты, мы предположили что другие фаги активирующие PARIS также кодируют белки с ДНК-мимикрирующими свойствами, которые могут являться потенциальными ингибиторами иммунных систем бактерий. Примером фага устойчивого ко множеству защитных систем бактерий является T5, однако, принципы его анти-рестрикционной стратегии не установлены.

При этом, фаг T5 активирует PARIS защиту и для идентификации его белка триггера в нашей лаборатории удалось получить несколько мутантных линий T5,

которые приобрели способность заражать клетки *Escherichia coli* кодирующие систему PARIS. Картирование мутаций в геномах PARIS-устойчивых вариантов T5 показало воспроизводимое накопление значимых изменений (появление стоп-кодонов или сдвигов рамки считывания) сразу в 2-х генах, кодирующих белки с неизвестными функциями - ORF94 и ORF103. Оба белка обладают низким значением pI (~4.2), что говорит о большой плотности отрицательного поверхностного заряда и позволяет предположить наличие ДНК-мимикрирующих свойств.

Дальнейшие исследования позволят установить являются ли белки ORF094 и ORF103 новыми ингибиторами систем бактериального иммунитета.

МБ18. Влияние экспрессии Т-кадгерина на адипоцитарную дифференцировку преадипоцитов 3T3-L1

М.Д. Мещеряков (*m903445888@mail.ru*)¹, А.А. Щипова¹, Е.А. Сотская¹, К.А. Рубина¹, В.Ю. Сысоева¹, П.С. Климович^{1,2}

¹Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова 119192, Москва

²Институт экспериментальной кардиологии, НМИЦ Кардиологии им. Чазова Минздрава России 121552, Москва

Введение. Жировая ткань играет важную роль в эндокринной регуляции метаболизма. Зрелые адипоциты продуцируют множество гормонов, в том числе адипонектин. Рецептором высокомолекулярной формы адипонектина является Т-кадгерин. Однако механизм участия Т-кадгерина в дифференцировке адипоцитов и продукции адипонектина не известен.

Материалы и методы. В исследовании использовали мышинные клетки преадипоцитов 3T3-L1 дикого типа, с гиперэкспрессией Т-кадгерина (3T3 T-Cadhf) и клетки, трансфецированные пустым вектором в качестве контроля плазмидной трансфекции. Для адипоцитарной дифференцировки клетки культивировали в плотном монослое в среде ДМЕМ с низким содержанием глюкозы с добавлением в среду инсулина, дексаметазона и IBMX. Среду заменяли на свежую каждые 3 дня. На 0, 3, 7, 9 день дифференцировки из клеток выделяли мРНК и методом ПЦР в реальном времени анализировали маркеры ранней (СЕВР-α, СЕВР-β, PPAR-γ) и поздней адипоцитарной дифференцировки (ADIPOQ). Обсчет проводили методом delta(Ct).

Результаты. Анализ полученных данных показал, что экспрессия мРНК адипонектина появляется на 7 день дифференцировки во всех типах клеток, однако ее уровень в 3T3 T-Cadhf в 1,7 раза и 2 раза ниже ($p < 0,05$), чем в контрольных клетках и клетках дикого типа соответственно. Значимая разница сохранялась и на 9 день дифференцировки: уровень экспрессии мРНК адипонектина в контрольных клетках продолжал расти и был в 5 раз выше, чем в клетках 3T3 T-Cadhf. Уровень экспрессии мРНК PPAR-γ на 9 день был в 4 раза ниже

в клетках 3T3 T-Cadherin⁺, чем в контрольных клетках. По СЕВР-α и СЕВР-β разницы не наблюдалось.

Выводы. Результаты исследования позволяют предположить, что клетки с гиперэкспрессией Т-кадгерина хуже дифференцируются в адипоцитарном направлении, следовательно Т-кадгерин является негативным регулятором адипогенеза.

МБ19. Изучение редокс-метаболизма стволовых клеток глиобластомы с целью разработки подходов для преодоления резистентности клеток к действию химиотерапии

В.И. Мещерякова (valeriya.i.meshcheryakova@gmail.com), М.Ю. Кордюкова, Е.С. Бекчанова, Т.О. Абакумова, В.В. Белоусов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства России

Введение. Глиобластома — опухоль головного мозга, характеризующаяся агрессивностью и резистентностью к лечению. Стандартное лечение глиобластомы включает хирургическое удаление, лучевую и химиотерапию препаратом темозоломидом. Терапия вызывает окислительный стресс, приводящий к гибели преимущественно опухолевых клеток. Однако известно, что клетки многих видов рака могут приобретать резистентность к терапии путём активации антиоксидантных систем, тиоредоксиновой и глутатионовой. Для глиобластомы нет целостных данных об участии упомянутых систем в формировании резистентности. Также не изучены механизмы толерантности к окислительному стрессу стволовых клеток глиобластомы (СКГ), которые служат движущей силой рецидивов. Поэтому целью данной работы стало изучение чувствительности первичных культур СКГ к ингибиторам антиоксидантных систем для преодоления их устойчивости к химиотерапии.

Методы. Получили первичные культуры СКГ из постоперационного материала; определили чувствительность СКГ к ингибитору тиоредоксиновой системы, ауранофину, ингибитору синтеза глутатиона, БСО (L-бутионин-S,R-сульфоксимин); изучили окислительно-восстановительный статус клеток с помощью генетически кодируемого сенсора к пероксиду водорода (H₂O₂) HyPer7.

Результаты. Полулетальная доза ауранофина для СКГ значительно ниже, чем полулетальная доза темозоломида. Ауранофин сенсibiliзирует клетки к темозоломиду. Однако часть полученных культур более чувствительна к ауранофину, а другая часть — менее чувствительна. С помощью HyPer7 исследовали развитие окислительного ответа в культурах под действием ауранофина и комбинации ауранофина и БСО. В более устойчивых к ауранофину культурах под действием комбинации ингибиторов генерация H₂O₂ выше, чем под действием только ауранофина. В более чувствительных культурах эффект комбинации ингибиторов не отличается от эффекта ауранофина.

Выводы. СКГ чувствительны к ауранофину. Ауранофин сенсibiliзирует СКГ к действию химиотерапии. Некоторые культуры СКГ используют также глутатионовую систему для защиты от окислительного стресса. Полученные данные о снижении резистентности СКГ к терапии под действием ауранофина могут служить основой для создания новых схем лечения ГБ.

Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ №22-75-10151

МБ20. Детекция маркера CD133 в глиобластоме человека с помощью аптамеров

В.Л. Моисеенко (valerian.moiseenko@gmail.com)¹, О.М. Антипова¹, С.А. Павлова², Л.В. Фаб², Г.В. Павлова^{2,3}, А.М. Копылов¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Кафедра химии природных соединений

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

³МИЦ нейрохирургии им. ак. Н. Н. Бурденко

Введение. Трансмембранный белок CD133 - маркер опухолевых стволовых/прогениторных клеток глиобластомы (ГБ). Для детекции CD133 на поверхности клеток используются антитела. В литературе описано несколько ДНК- и РНК-аптамеров – «химических антител» - к CD133 [1, 2].

Материалы и методы. Для сравнения эффективности узнавания CD133 на поверхности клеток использовали антитело анти-CD133 (эпитоп CD133/1), меченное аллофикоцианином; 2'F-Y-РНК-аптамеры A15 (15 н) и B19 (19 н) и ДНК-аптамер Cs5 (51 н) с метками Cy5 и FAM. CD133 детектировали на линейных клетках Сасо-2 и НСТ116, на клетках первичной культуры ГБ человека G01 методами проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии.

Результаты. Проточной цитометрией показано, что аптамеры также эффективно связываются с CD133+ клетками, как и антитела. Для аптамеров A15 и B19 сдвиги интенсивности флуоресценции практически совпадают. Экспериментально получены значения «констант диссоциации» комплекса аптамер-CD133 на поверхности клеток Сасо-2 для РНК-аптамера A15 ($K_d = 125$ нМ) и ДНК-аптамера Cs5 ($K_d = 139$ нМ). Флуоресцентно меченные РНК- и ДНК-аптамеры эффективно окрашивают CD133+ клетки по данным конфокальной микроскопии.

Выводы. 2'F-Y-РНК- и ДНК-аптамеры связываются с CD133+ клетками с сопоставимой аффинностью, они эффективнее, чем антитело CD133/1, узнают CD133 на клетках, что позволяет детектировать CD133 на линейных клетках и клетках первичных культур опухолей пациентов с ГБ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Минобрнауки России №075-15-2021-1343 от 4 октября 2021 года.

Литература

1. Shigdar S et al., RNA aptamers targeting cancer stem cell marker CD133. *Cancer Lett.* 2013 Mar 1;330(1):84-95.
2. Wenjing Li1 et al., Selection of CD133-targeted DNA aptamers for the efficient and specific therapy of colorectal cancer, *J. Mater. Chem. B*, 2022,10, 2057-2066

МБ21. Получение хромосомных транслокаций с участием гена *KMT2A*

Н.А. Николаев (nnikolaev@fbb.msu.ru), А.В. Замалутдинов (avzamal@yandex.ru)

Кафедра молекулярной биологии МГУ им. М. В. Ломоносова

Введение.

Транслокации с участием гена *KMT2A*, регулирующего гемопоэз, вызывают острый лейкоз. Для установления механизмов онкогенеза мы получаем ряд клеточных моделей, различающихся перестройками *KMT2A*. Проблемой является низкая вероятность образования транслокаций в клетках даже при индукции разрывов в перестраивающихся генах.

Мы использовали два подхода. Первый состоит в индукции разрывов с образованием транслокаций путём NHEJ. Второй основан на репарации, направляемой гомологией (HDR): используется плаزمид, содержащая плечи гомологии к перестраивающимся локусам и кассету с селективными маркерами. В клетках с транслокацией маркеры оказываются между фрагментами перестроенных хромосом и экспрессируются с промотора *KMT2A*, позволяя провести селекцию.

Материалы и методы. Для повышения эффективности доставки генов РНК-гидов и Cas9 они были встроены в одну плазмиду, несущую также ген флуоресцентного белка для возможности отбора. Распределяли трансфицированные клетки по лункам планшета клеточным сортером. Транслокации детектировали прямой вложенной ПЦР. При индукции транслокаций через HDR клетки отбирали по селективному маркеру и затем трансфицировали рекомбиназой Cse для удаления генов маркеров.

Результаты.

Подход с HDR и отбором позволил получить одну линию клеток с транслокацией за 16 недель после трансфекции.

В подходе с NHEJ сначала провели оценку доли клеток с транслокацией методом разведений, спланировав стратегию клонирования клеток и ПЦР-анализа. Стратегия заключалась в распределении по лункам определенного количества клеток, объединении образцов для ПЦР-анализа (в случае положительного результата анализировались отдельные образцы из группы) и дальнейшего клонирования с учетом вероятности получения положительных клонов.

Разработанный подход позволил получить моноклональные линии с транслокацией в течение 8 недель после трансфекции.

Выводы. Для получения клеточных моделей транслокаций надёжнее и быстрее оказался подход, использующий NHEJ, при условии оптимальной стратегии обнаружения клеток с транслокацией.

МБ22. Функции глюкокортикоид-индуцируемой протеинкиназы (SGK1) в адипоцитах: регуляция чувствительности к инсулину, захвата глюкозы и жирных кислот

А.А. Орехова (anastasiaorekhova05@gmail.com)^{1,2}, Н.В. Подкуйченко², А.В. Воронников²

¹Кафедра биохимии, биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

²Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова МЗ РФ, Москва, Россия

Ожирение является основным фактором риска развития сахарного диабета 2-го типа (СД2Т) и метаболического синдрома, а инсулинорезистентность – ранним симптомом СД2Т. Кроме СД2Т, оба состояния характерны и для синдрома Кушинга, связанного с гиперсекрецией глюкокортикоидного гормона кортизола. Как анаболический и катаболический гормоны, соответственно, инсулин и кортизол обеспечивают в организме баланс между запасанием и мобилизацией энергоресурсов, в том числе жировых. Если сигнальные механизмы действия инсулина к настоящему времени в целом понятны, то механизм действия кортизола на метаболизм адипоцитов остается неясным. SGK1 (serum- and glucocorticoid-induced kinase) – главная мишень глюкокортикоидов, участвующая в развитии ожирения, СД2Т и его осложнений. Однако функции SGK1 в метаболизме адипоцитов практически не изучены. Целью данной работы было оценить участие SGK1 в регуляции транспорта глюкозы и жирных кислот в адипоциты.

Исследование проводили с использованием стандартной клеточной линии фибробластов мыши 3T3-L1. По завершении адипогенной дифференцировки измеряли захват ³[H]-2-дезоксиглюкозы (радиоактивный аналог глюкозы) и Bodipy-C12 (флуоресцентный аналог пальмитиновой кислоты) в адипоциты без или после воздействия инсулина и дексаметазона (синтетический аналог кортизола). Чтобы определить участие SGK1, использовали доступные ингибиторы киназы (GSK650394, EMD638683, SGK25652).

Было выяснено, что подавление активности SGK1 приводило к усилению захвата пальмитата, но не влияло на транспорт глюкозы в адипоциты. Дексаметазон незначительно подавлял инсулин-зависимый транспорт ³[H]-2-дезоксиглюкозы, а также снижал захват Bodipy-C12, что согласуется с эффектом ингибитора SGK1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что SGK1 опосредует только часть эффектов дексаметазона на транспорт энергоисточников в адипоциты, а именно транспорт жирных кислот. Молекулярный механизм действия SGK1 пока остается неясным. Ведутся работы по созданию конститутивно активной и доминант-негативной конструкций SGK1 и малых интерферирующих РНК для проведения дальнейших исследований. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-015-00471).

МБ23. «Молекулярные механизмы цитотоксического действия рекомбинантного селенопротеина SELENOM на клетки глиобластомы человека»

В.В. Погачев (vladimirrogachev6@gmail.com)^{1,2}, Н.Б. Нефедова (imayok@yandex.ru)^{1,2}

¹Институт биофизики клетки Российской академии наук, Россия, Пущино

²ФГБОУ ВО «Пущинский государственный естественнонаучный институт», Россия, Пущино

Введение. SELENOM — высоко консервативный белок, встречающийся у разных видов и классов животных и принадлежащий к семейству белков с тиоредоксин-подобной укладкой: он имеет консервативный мотив CXXU в каталитическом центре (где С — цистеин, Х — любые две аминокислоты, U – селеноцистеин). Исследования роли SELENOM в канцерогенезе ограничиваются данными об экспрессии этого белка в клетках гепатоцеллюлярной карциномы, поэтому целью настоящей работы являлось исследовать молекулярные механизмы цитотоксического действия рекомбинантного селенопротеина SELENOM на клетки глиобластомы человека.

Материалы и методы. На первом этапе необходимо было получить рекомбинантный SELENOM человека в препаративных количествах в бактериальной системе.

Для изучения влияния полученного нами экзогенного SELENOM на пролиферативные свойства раковых клеток А-172 (глиобластома человека) мы инкубировали эти клетки в течение 24 ч с данным белком в различных концентрациях (50 мкг, 100 мкг, 200 мкг). В качестве контроля использовали эквивалентные объемы буфера. Затем проводили тест МТТ и с помощью флуоресцентной микроскопии оценивали количество клеток, ушедших в апоптоз

Результаты. Согласно результатам МТТ-анализа, представленным на данном слайде, можно заключить, что существенное снижение пролиферативных свойств клеток глиобластомы приблизительно на 40 и 80% наблюдалось при воздействии на клетки 100 и 200 мкг белка, соответственно. Тогда как добавление эквивалентных объемов буфера достоверно значимо не оказало влияния на пролиферацию данных клеток.

С помощью метода, позволяющего визуально оценивать количество клеток с апоптозом после 24 ч инкубирования их с исследуемым белком, также было

установлено, что использование более высоких концентраций белка приводило к увеличению числа клеток с апоптозом.

Выводы. Экзогенный SELENOM в концентрациях 100 и 200 мкг способен снижать пролиферативные свойства клеток глиобластомы человека приблизительно на 40 и 80%, соответственно, а также приводит к апоптотической гибели раковых клеток более, чем в 80 и 90% случаях, соответственно.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-25-00030.

МБ24. Участие прегнан Х рецептора (PXR) и конститутивного андростанового рецептора (CAR) в регуляции белка-транспортера BCRP под действием прогестерона

Е.Д. Рокунов (rokipov1999@mail.ru), А.А. Сеидкулиева, П.Д. Ерохина, Ф.Т. Гаджиева, Е.Н. Якушева, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин

Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Россия, Рязань

Введение. Белок резистентности рака молочной железы (BCRP) – эффлюксный транспортер, переносящий широкий спектр липофильных субстратов из клетки во внеклеточное пространство. В ряде исследований было показано, что прогестерон может влиять на BCRP, но механизмы данного воздействия не установлен. Прегнан Х рецептор (PXR) и конститутивный андростановый рецептор (CAR) – ядерные транскрипционные факторы, регулирующие функционирование ряда ферментов и белков-транспортеров, участвующих в биотрансформации и экскреции ксенобиотиков. В ходе настоящего исследования было изучено участие PXR и CAR в регуляции BCRP под действием прогестерона.

Материалы и методы. Исследование выполнено на клетках линии HerG2, которые инкубировали с прогестероном в концентрациях 1; 10 и 100 мкМ в течение 24 ч. Для оценки роли CAR и PXR в повышении количества BCRP под действием прогестерона - клетки инкубировали с прогестероном в концентрации 100 мкМ совместно с ингибитором CAR – CINPA1 в концентрации 10 мкМ или ингибитором PXR – кетоконазолом в концентрации 10 мкМ. Относительное количество BCRP определяли методом вестерн-блот.

Результаты. Прогестерон повышал количество BCRP в клетках HerG2 при воздействии в течение 24 ч в концентрации 1 мкМ на 479,5% ($p < 0,05$), 10 мкМ на - 105,1% ($p < 0,05$) и 100 мкМ – на 79,5% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями контроля. Ингибирование CAR не влияло на индуцирующее действие прогестерона на уровень BCRP, данный показатель увеличивался на 67,5% ($p=0,06$) по сравнению с контролем. В то же время подавление активности PXR предотвращало увеличение относительного количества BCRP под действием прогестерона в концентрации 100 мкМ.

Выводы. Таким образом, прогестерон повышает количество BCRP в клетках НерG2 через PXR.

МБ25. Установление родовой принадлежности бактериальных штаммов, оживленных из кишечного содержимого ископаемого бизона.

Ю.В. Рудина (alice-43@yandex.ru)¹, Н.П. Кольжецов (kolya.kolzhecov@mail.ru)², К.С. Шавкунов (shavkunovks@gmail.com)²

¹Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, биотехнологический факультет.

²Лаборатория функциональной геномики и клеточного стресса, Институт биофизики клетки Российской академии наук, обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Введение. Изучение древних микробных сообществ и их представителей актуально как для проверки эволюционных гипотез, так и для потенциального получения продуцентов с ценными биотехнологическими свойствами. Поэтому интересной задачей представляется оживление микроорганизмов, законсервированных в условиях мерзлоты, с их последующим охарактеризованием с применением микробиологических и молекулярно-генетических подходов. Цель данной работы - провести первичный филогенетический анализ штаммов бактерий, выделенных из содержимого тонкого кишечника ископаемого *Bison priscus* возрастом ~50 тыс. лет.

Материалы и методы. Для выделения микроорганизмов фрагменты содержимого тонкого кишечника инкубировали 30 минут в стерильной среде R2A, после чего 100-1000-кратно разводили суспензию и высевали на чашки с агаризованной R2A. Выросшие колонии индивидуально отсеивали на свежие чашки до получения монокультур. Биомассу трех выбранных штаммов наращивали на жидкой R2A в течение суток. Геномную ДНК выделяли при помощи набора PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit, секвенирование с баркодами проводили на платформе MinION (Oxford Nanopore Technologies). Для сборки геномов использовали алгоритмы Flye и Canu. Полученные контиги аннотировали при помощи Prokka, отбирали последовательности генов 16S рРНК и использовали их для филогенетического анализа. Поиск гомологичных последовательностей осуществляли алгоритмом Blast, построение филогенетических деревьев - методом MLT в программе Mega 11 с 500 итерациями бутстреп-теста.

Результаты. Из кишечного содержимого ископаемого *Bison priscus* рассеяны чистые культуры микроорганизмов. Методом высокопроизводительного нанопорового секвенирования прочитана последовательность геномной ДНК и собраны геномы трех штаммов бактерий. Установлено, что анализируемые изоляты относятся к родам *Leucobacter*, *Roseomonas*, *Arthrobacter*.

Выводы. Для оживления микроорганизмов, сохранившихся в условиях природной криоконсервации, эффективной оказалась олиготрофная питательная среда R2A. Полученные данные полногеномного секвенирования пригодны для аннотации и дальнейшего анализа геномных последовательностей.

МБ26. Влияние фактора ПАРилирования гистонов на регуляцию ДНК-полимеразной активности ДНК-полимеразы β в контексте нуклеосомы

Д.И. Сайфуллина (*d.saifullina@g.nsu.ru*)^{1,2}, М.М. Кутузов^{1,2}

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

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Введение: Поли-(АДФ-рибозил)ирование (ПАРилирование) является частью клеточного ответа на повреждение ДНК. Синтез ПАР осуществляется поли(АДФ-рибоза)полимеразами (PARP), в частности PARP1 и PARP2. Недавно был обнаружен новый белок, участвующий в клеточном ответе на повреждение ДНК и модулирующий активность PARP1 и PARP2, – фактор ПАРилирования гистонов (HPF1). HPF1 дополняет активные центры PARP1 и PARP2, способствуя переключению их специфичности, и играет важную роль в ПАРилировании гистонов.

Наиболее часто встречающиеся повреждения ДНК исправляет эксцизионная репарация оснований ДНК (BER). Встройку нуклеотида в BER осуществляет ДНК-полимераза β (pol β). Ранее было показано, что PARP1, PARP2, а также и нуклеосомная организация ДНК оказывают влияние на активность ферментов BER, в том числе и на ДНК-полимеразную активность pol β . В данной работе мы исследовали влияние HPF1 на PARP1- и PARP2-опосредованную регуляцию ДНК-полимеразной активности pol β в контексте нуклеосомы.

Материалы и методы: Реконструкцию нуклеосом проводили путем последовательного диализа смеси ДНК-последовательности «clone 603» и коровых гистонов. Повреждение в ДНК вводили обработкой dUMP-содержащей ДНК урацил-ДНК-гликозилазой и АП-эндонуклеазой1. Для изучения влияния HPF1 на регуляцию эффективности вставки нуклеотида pol β белками PARP1 и PARP2 предварительно подбирались оптимальные концентрации всех участников процесса. Компоненты реакционной смеси разделяли методом геля электрофореза. Детекцию продуктов реакции осуществляли по интенсивности флуоресцентной метки, расположенной на ДНК.

Результаты: Показано, что в контексте нуклеосомы в условиях ПАРилирования HPF1 приводит к более интенсивному ослаблению ингибиторного эффекта PARP1 и PARP2 на ДНК-полимеразную активность pol β , чем в его отсутствие.

Выводы: В определенных условиях HPF1 способствует более интенсивному синтезу ПАР, тем самым стимулируя диссоциацию комплекса PARP с ДНК, что обеспечивает доступ $\text{pol } \beta$ к поврежденной ДНК.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 22-74-10059.

МБ27. Функциональные нарушения, вызванные реорганизацией цитоскелета в производных ИПСК с нокаутом гена *UBE2A*

Е.К. Секретова (Sekretova.1999@mail.ru), Е.А. Хомякова, А.В. Федоренко, А.В. Сурдина, С.В. Лаврушкина, М.А. Лагарькова, А.Н. Богомазова, И.Б. Алиева

*ФНКЦ физико-химической медицины им. М.Ю. Лопухина
НИИ Физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ*

В 2006 году был описан новый X-сцепленный синдром умственной отсталости (синдром Насименто), характеризующийся пороками развития мозга, тяжелой умственной отсталостью. Синдром Насименто вызван мутациями в гене *UBE2A*, приводящими к потере функции фермента Ube2a, который является участником убиквитин-протеасомной системы. На данный момент функции белка Ube2a в клетке изучены плохо, особенно в контексте развития синдрома Насименто. В то же время известно, что патологии развития мозга зачастую связаны с нарушениями внутриклеточных процессов, в которых участвуют компоненты цитоскелета. Таким образом, целью нашей работы было изучение морфологических и функциональных особенностей цитоскелета клеток при нокауте гена *UBE2A*.

В работе использовали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) с нокаутом гена *UBE2A*. Линию дикого типа и линии с нокаутом *UBE2A* дифференцировали в фибробластоподобные и глиальные производные.

В серии прижизненных экспериментов мы показали, что производные с нокаутом *UBE2A* характеризуются ускоренной динамикой распластывания и поляризации. Скорость свободной миграции была значительно увеличена для глиальных производных с нокаутом *UBE2A* по сравнению с контролем ($p < 0.0001$), в то время как фибропроизводные с нокаутом *UBE2A* характеризуются слегка увеличенной скоростью миграции ($p = 0.0446$). Аналогичные результаты были получены при анализе направленной миграции клеток в модели экспериментальной раны. При помощи микроскопии сверхвысокого разрешения мы показали, что citoархитектура актинового цитоскелета в ламелле производных с *UBE2A* значительно изменена по сравнению с клетками дикого типа. Как известно, белки, связанные с актином, а также Rho ГТФазы, регулирующие динамику актина, опосредуют развитие множества форм умственной отсталости. Наши данные косвенно свидетельствуют об участии фермента Ube2a в механизме регуляции динамики актина, что может лежать в основе патогенеза синдрома Насименто.

МБ28. Модификация производных бензимидазо[1,2-С]пиримидин-1-она и нафто[2',1':4,5]имидазо[1,2-С]пиримидин-11-она для получения лигандов, стабилизирующих G-квадруплексы

Г.К. Слушко (*slushko.georgij@mail.ru*)^{1,2}, П.Н. Камзеева², Н.Д. Дагаев³, А.М. Варижук⁴, А.В. Аралов²

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова российской академии наук

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

⁴Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства, Москва, Россия

Богатые гуанином последовательности ДНК, содержащиеся в теломерах и промоторах ряда онкогенов, способны образовывать G-квадруплексы (G4), неканонические вторичные структуры нуклеиновых кислот. Стабилизация данных структур с помощью малых молекул может ингибировать активность теломеразы и обеспечивать регулирование экспрессии онкогенов [1]. В природе при воздействии п-бензохинона, метаболита бензола, на остатки цитозина в ДНК образуется соединение, трициклический остов которого был выбран нами за основу для дизайна G4-лигандов [2]. Были синтезированы производные трициклического бензимидазо[1,2-с]пиримидин-1-она и тетрациклического нафто[2',1':4,5]имидазо[1,2-с]пиримидин-11-она, содержащие одну или две боковые алкильные цепи с amino-, диметиламино- или гуанидиновыми группами. Большинство соединений эффективно стабилизировало G4 в экспериментах по FRET-плавлению, при этом дизамещенные бензопроизводные проявили средние G4-стабилизирующие свойства в сочетании с высокой селективностью по сравнению с дуплексной ДНК, а дизамещенные нафтопроизводные продемонстрировали высокие G4-стабилизирующие эффекты ΔT до 38°C, сопоставимые со значениями для BRACO-19, но со значительно большей селективностью (при концентрациях лиганда и G4-мишени 1 и 20 мкМ соответственно). Эксперименты по конкурентному FRET-плавлению в присутствии дуплексной ДНК позволили обнаружить G4-мишени, с которыми синтезированные производные взаимодействуют наиболее селективно. Для них методом микроскопического термофореза (МСТ) были определены константы диссоциации, принадлежащие диапазону 0,4-5,6 мкМ. Были проведены исследования цитотоксичности синтезированных соединений для условно нормальных и раковых клеток. Диаминозамещенное нафтопроизводное ингибировало метаболическую активность клеток аденокарциномы легкого A549' в субмикромольной концентрации, демонстрируя индекс селективности относительно линии нормальных легочных фибробластов VA13 $SI(VA13/A549)=310$. Полученные на настоящий момент результаты

свидетельствуют о перспективности предложенных остовов, и в будущем планируется работа по исследованию механизма воздействия соединений на опухолевые клетки и оптимизация лидерных структур.

Литература

1. Cimino-Reale G., Zaffaroni N., et. al. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, 22. p. 6612-6624.
2. Linhart I., Mikes P., et. al. *Chemical Research in Toxicology.* **2011**, 24(3). p. 383–391.

МБ29. Субклеточная локализация белков цитоматрикса пресинаптической активной зоны и их роль в регуляции экспрессии генов

А.А. Солдатенкова (nancytu@list.ru)^{1,2}, Г.А. Носов (nosov.g@fccps.ru)^{2,3}

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

²ФГБУ «Федеральный Центр Мозга и Нейротехнологий» ФМБА России, научно-производственный комплекс, Россия, Москва

³РНИМУ имени Н.И. Пирогова, НИИ трансляционной медицины, лаборатория синтетических нейротехнологий, Россия, Москва

Введение. В химическом синапсе сигнализация протекает посредством слияния везикул, содержащих нейромедиаторы, с пресинаптической мембраной. В этом процессе ключевую роль играют белки цитоматрикса активной зоны (CAZ-белки). Они участвуют в правильном позиционировании везикул и их слиянии с пресинаптической мембраной. Среди них выделяются такие мажорные белки как Bassoon, Piccolo, Erc, Liprin 1-3, Rim 1-3 и другие. Однако функции этих белков вовсе не ограничиваются только лишь пресинапсом. Биоинформатический анализ выявляет в CAZ-белках сигналы ядерной локализации и цинковые пальцы C4-типа. Изучению потенциальных ядерных функций CAZ-белков посвящена эта работа.

Материалы и методы. Аминокислотные последовательности CAZ-белков анализировали с целью определения в них NLS. Получение кДНК из первичной культуры эмбриональных нейронов мышцы проводилось с использованием RT. Для визуализации белков цитоматрикса активной зоны были получены химерные конструкции с EGFP. Микроскопический анализ внутриклеточной локализации рекомбинантных белков определяли посредством конфокальной микроскопии в клетках линий HEK293NT, PC12 и первичной культуре мышечных гиппокампаальных нейронов. Для определения регуляции ядерного импорта использовались ингибиторы BIMAX2 и M9M, слитые с ERFp. Также распределение белков между ядром и цитоплазмой исследовали путем субклеточного фракционирования с последующим вестерн-блот анализом.

Результаты. Биоинформатически были определены эволюционно консервативные NLS в белках RIM1,3, Liprin-alpha-1/3, Bassoon, Piccolo. Для

Bassoon и Piccolo также обнаружены NES. Были получены конструкторы: RIM3-EGFP, ERC2-EGFP, Liprin-alpha-1-EGFP, Liprin-alpha-2-EGFP. кДНК Bassoon была получена из лизата первичной культуры нейронов с использованием RT-PCR. Рекомбинантный RIM3-EGFP демонстрирует обогащение в клеточном кортексе и в ядре. Его импорт в ядро обеспечивается комплексом импортин-альфа - импортин-бета1, а импортин-бета2 практически не вовлечен в транспорт.

Выводы. В настоящей работе показана ядерная локализация ряда CAZ-белков. Следующим этапом работы идет выявление взаимодействия CAZ-белков с ДНК и потенциальное воздействие на экспрессию генов.

Литература

1. Waites C. L. и др. Bassoon and Piccolo maintain synapse integrity by regulating protein ubiquitination and degradation // EMBO J. 2013. Т. 32. № 7. С. 954–969.
2. Langnaese K. и др. Protein components of a rat brain synaptic junctional protein preparation // Mol. Brain Res. 1996. Т. 42.

МБ30. Изучение влияния микроРНК в составе внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток на трансдифференцировку миофибробластов на клеточных моделях фиброза

А.Е. Толстолужинская (tolstoluzhinskaya@my.msu.ru), Н.А. Басалова, Р.Ю. Еремичев, А.Ю. Ефименко

Институт регенеративной медицины, медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Введение. Известно, что некоторые микроРНК задействованы в регуляции механизмов, опосредующих прогрессию фиброза – патологического процесса, приводящего к разрастанию соединительной ткани в паренхиматозных органах за счет пролиферативной и синтетической активности миофибробластов. Нами было обнаружено, что компоненты секрета мезенхимных стромальных клеток, содержащиеся во внеклеточных везикулах (ВВ-МСК), способствуют снижению площади пораженной фиброзом ткани, вероятно, влияя на активность миофибробластов путем переноса микроРНК в составе ВВ-МСК в таргетные клетки. Наша цель была изучить влияние отдельных микроРНК в ВВ-МСК на трансдифференцировку миофибробластов с использованием клеточных моделей фиброза.

Материалы и методы. ВВ-МСК были получены с помощью ультрафильтрации секрета МСК человека. Их эффект был изучен на 2D-модели дифференцировки миофибробластов из фибробластов и на 3D-модели фиброза, созданной на основе децеллюляризованного сфероиды, окруженного миофибробластами. Влияние фиброз-специфических микроРНК было изучено с использованием трансфекции ВВ-МСК синтетическими ингибиторами микроРНК. Анализ синтеза маркерных

белков фиброза проводили методами иммуцитохимического анализа, вестерн-блоттинга и дот-блоттинга.

Результаты. Добавление ВВ-МСК в 2D-модели фиброза привело к снижению количества миофибробластов (экспрессии α -гладкомышечного актина) и маркеров фибротического ВКМ, включая уровень коллагена I типа и EDA-фибронектина. На 3D-модели было показано, что добавление ВВ-МСК вызывает уменьшение характерных черт миофибробластов и деградацию ВКМ. Ингибиторный анализ действия микроРНК на трансдифференцировку клеток показал, что снижение маркерных признаков фиброза при добавлении ВВ-МСК в клеточных моделях преимущественно опосредовано действием микроРНК-129 и микроРНК-92а.

Выводы. Таким образом, ВВ-МСК действительно влияют на паракринную активность миофибробластов и снижают экспрессию фибротических белков в 2D и 3D моделях фиброза. В данном процессе задействованы микроРНК-129 и -92а, способные индуцировать дедифференцировку миофибробластов путем регулирования таргетных генов, ответственных за синтез и ремоделирование специфического ВКМ (грант РФФИ № 20-315-90120 и 21-315-70002).

МБ31. Изучение функциональных участков 5'-нетранслируемой области мРНК ATF5, контролирующих трансляцию ATF5 при стрессе эндоплазматического ретикулума

Р.С. Тумбинский (tu_roman2018@mail.ru)¹, И.М. Теренин^{2,3}, Е.Д. Шестакова^{1,2}, И.Н. Шатский²

¹*Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова*

²*НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова*

³*Университет «Сириус»*

Введение. Активирующий транскрипционный фактор 5 (ATF5) – ДНК-связывающий транскрипционный фактор семейства bZIP. ATF5 участвует в дифференцировке, ответе клетки на различные стрессы, обеспечивает взаимодействие центриоли и перичентриолярного матрикса. Кроме того, ATF5 связывают с развитием онкологических заболеваний. 5'-нетранслируемая область (5'-НТО) мРНК ATF5 содержит две открытые рамки считывания (uORF), расположенные перед основной рамкой, кодирующей собственно транскрипционный фактор. Вторая рамка перекрывается с основной на 57 нуклеотидов и транслируется преимущественным образом в условиях отсутствия клеточных стрессов или недостатка аминокислот. В стрессовых условиях рибосомы после синтеза закодированного в uORF1 короткого пептида, реинициируют преимущественно на основной рамке считывания, минуя uORF2.

Материалы и методы. Методы генной инженерии, *in vitro* транскрипция, РНК-интерференция, РНК-трансфекция клеточных культур НЕК 293Т, генетический нокаут.

Результаты. Удаление первой открытой рамки считывания на 5'-НТО мРНК ATF5 не приводит к потере устойчивости трансляции этой мРНК к стрессу эндоплазматического ретикулаума (ЭР-стресс). При этом замена первых 64 нуклеотидов 5'-НТО мРНК ATF5 без первой uORF на гетерологичные последовательности приводит к утрате такой устойчивости, в то время как замена других участков не влияет на устойчивость трансляции мРНК. Инактивация киназы mTOR в условиях ЭР-стресса делает трансляцию мРНК ATF5 чувствительной к фосфорилированию eIF2. Данный эффект не наблюдается в клетках с нокаутированным геном eIF4E-BP1.

Выводы.

1. Первая открытая рамка считывания с 5'-НТО мРНК ATF5 не является необходимой для устойчивой к ЭР-стрессу трансляции.
2. Первые 64 нуклеотидов 5'-НТО мРНК ATF5 необходимы для трансляции мРНК ATF5 в условиях окислительного стресса и ЭР-стресса.
3. Для устойчивой к инактивации eIF2 трансляции мРНК ATF5 необходима активность киназы mTOR.
4. Инактивация eIF4E при ингибировании mTOR специфически блокирует трансляцию ATF5 при ЭР-стрессе.

МБ32. Тестирование новых липидных реагентов для доставки мРНК в клетки млекопитающих с помощью непрерывного мониторинга активности люциферазы

А.Г. Федоровский (*f.arty00m@gmail.com*)^{1,3}, Д.М. Макарова², П.А. Пучков², М.А. Маслов², С.Е. Дмитриев³

¹Факультет наук о материалах, МГУ имени М.В.Ломоносова,

²Институт тонких химических технологий имени М.В.Ломоносова, МИРЭА - Российский технологический университет

³НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, МГУ имени М.В.Ломоносова

Введение. В настоящее время в медицине активно развиваются направления, связанные с применением терапевтических мРНК. Наиболее распространенным средством доставки мРНК в клетки являются липосомные наночастицы. Для их формирования трансфицирующий реагент, представляющий собой определённую композицию катионных и вспомогательных липидов, смешивают с доставляемой мРНК. Эффективность трансфекции зависит от химической природы катионного липида, композиции липидной смеси, а также соотношения количеств катионного липида и мРНК.

Материалы и методы. m⁷G-экспрессированные полиаденилированные мРНК получали методом *in vitro* транскрипции, в качестве матрицы использовали ПЦР-продукт с плазмиды, содержащей ген люциферазы. Клетки HEK293T культивировали в планшетном ридере CLARIOstar, активность люциферазы измеряли на протяжении 48 часов после трансфекции.

Результаты. Испытаны катионные липиды 2X3, 2X7 и 2S3, содержащие холестерин в качестве гидрофобного хвоста и спермин в качестве положительно заряженной части, в композиции с нейтральным липидом DOPE в различных соотношениях, при варьировании отношения N/P (количества положительных и отрицательных зарядов в трансфицирующей смеси) и среды, в которой формировались наночастицы. Обнаружено, что оптимальным значением N/P является 10, а эффективность трансфекции возрастает с долей нейтрального липида DOPE в смеси вплоть до соотношения 3:1 к катионному липиду. Смеси с липидом 2X7 показали более длительную задержку перед появлением продукта, чем смеси с 2X3 (10 часов и 2 часа соответственно), но более высокую максимальную интенсивность свечения люциферазы, тогда как смеси с 2S3, содержащим дисульфидную связь, показали низкую эффективность трансфекции.

Выводы. Для трансфицирующих реагентов на основе катионных липидов 2X3 и 2X7 выявлены зависимости эффективности мРНК-трансфекции от состава липидной смеси, отношения N/P и среды, в которой формируются наночастицы; определена задержка в выходе продукта, зависящая от химической природы катионного липида.

МБ33. Разработка репортерной клеточной линии для изучения инсулиновой сигнализации в реальном времени.

А.П. Федоровский (fedorovskiy@mail.ru)¹, М.Н. Карагяур^{1,2}, К.Ю. Кулебякин^{1,2}

¹Кафедра биохимии и регенеративной медицины, Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В 2019 году сахарный диабет (СД) стал девятой причиной смерти в мире, в этом году из-за данного заболевания умерло приблизительно 1,5 миллиона человек. СД является одной из самых распространённых причин почечной недостаточности, инсульта, атеросклероза, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, слепоты. СД 2 типа характеризуется наличием инсулинорезистентности, механизмы возникновения которой на данный момент полностью не выяснены. Одним из возможных подходов для изучения данного вопроса является использование клеточных линий.

Целью исследования является создание модели для изучения инсулиновой чувствительности клеток в реальном времени.

С помощью генно-инженерных методов мы создали плазмиду, содержащую ген, состоящий из GFP и домена плекстриновой гомологии (РН-домена) тирозинкиназы Брутона (ВТК). РН-домен ВТК имеет сродство к фосфатидилинозитол (3,4,5)-трисфосфату (PIP₃), который продуцируется PI3K в ходе инсулинового сигнального каскада. На основе созданной генетической конструкции были собраны лентивирусные частицы, которыми трансдуцировали иммортализованные мезенхимные стромальные клетки (МСК).

В состоянии без активации инсулиновой сигнализации наибольшая интенсивность флуоресценции наблюдалась в околядерных областях клетки. После активации инсулинового сигнального каскада РН(ВТК)-GFP связывается с образующимся PIP₃, заякориваясь в примембранном пространстве, при этом наблюдается более диффузный характер свечения. В ходе исследований данной клеточной линии выяснилось, что генетическая конструкция РН(ВТК)-GFP, выступая как конкурентный ингибитор PI3K сигнального каскада за счёт связывания с PIP₃, ослабляет адипогенную и усиливает остеогенную дифференцировку МСК.

Видимые различия во флуоресцентной картине между «состоянием покоя» и состоянием стимуляции инсулином позволяют говорить о том, что РН(ВТК)-GFP является перспективным сенсором инсулиновой чувствительности. Подобная модель является незаменимым инструментом для изучения механизмов развития ИР и поисков способов её коррекции.

МБ34. Определение уровня экспрессии мРНК субъединиц гетеромерных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (НАХР) в моноцитах и макрофагах человека, находящихся в различных функциональных состояниях

И.В. Холошенко (innakholos5@gmail.com)^{1,2}, И.В. Шелухина²

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

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

Введение. Основными антигенпрезентирующими клетками организма человека являются моноциты и дифференцирующиеся из них макрофаги фенотипов М1 и М2, которые продуцируют про- и противовоспалительные цитокины. Ранее был исследован механизм холинергического противовоспалительного пути, эффективный при сепсисе и реализующийся за счет активации гомопентамерного $\alpha 7$ НАХР макрофагов. Роль гетеромерных НАХР, состоящих из комбинации $\alpha 2$ - $\alpha 10$ и $\beta 2$ - $\beta 4$ субъединиц, в специфических функциях макрофагов, в том числе на разных стадиях сепсиса, остается малоизученной.

Цель. Определение экспрессии мРНК ряда субъединиц nAHR моноцитами, неполяризованными M0, классически M1 и альтернативно M2 поляризованными макрофагами.

Материалы и методы. Использовали клеточную линию THP-1, проводили дифференцировку добавлением PMA, LPS, IL-13/IL-4. Использовали метод ПЦР в реальном времени на приборе Bio-Rad CFX96.

Результаты. В популяциях человеческих моноцитов, неполяризованных (M0), классически (M1) и альтернативно (M2) поляризованных макрофагов была обнаружена экспрессия мРНК широкого спектра субъединиц nAHR: $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 4$. Дифференцировка моноцитов клеточной линии THP-1 в неполяризованные макрофаги M0 приводила к снижению экспрессии мРНК $\alpha 7$ nAHR и увеличению $\alpha 9$, $\beta 2$, $\beta 4$ субъединиц nAHR. При последующей классической поляризации макрофагов (M1) было снижение уровня мРНК $\alpha 9$ и $\beta 2$, $\beta 4$ субъединиц фактически до их уровня представленности в исходных моноцитах THP-1. Альтернативная поляризация макрофагов (M2) приводила к дальнейшему повышению уровня мРНК $\alpha 5$ и $\alpha 9$ субъединиц nAHR.

Выводы. Наиболее выраженными оказались изменения экспрессии следующих субъединиц гетеромерных nAHR: $\alpha 9$, $\alpha 5$, $\beta 2$, $\beta 4$. $\alpha 9$ субъединица способна формировать как гомопентамерный ионный канал, так и в комбинации с $\alpha 10$ – гетеропентамерный $\alpha 9\alpha 10$ nAHR. Стоит отметить, что также подверженная изменениям профиля экспрессии мРНК $\alpha 7$ субъединица способна комбинироваться в гетеромерные $\alpha 7\beta 2$, $\alpha 7\alpha 10$ nAHR. $\alpha 5$ и $\beta 2$ субъединицы являются структурными и могут комбинироваться с $\alpha 2$ - $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ субъединицами. Изменения профиля экспрессии ряда субъединиц nAHR в зависимости от функционального состояния макрофагов могут указывать на потенциально важную роль этих рецепторов в специфических защитных реакциях данных клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-24-00769.

МБ35. Создание клеточной модели рестриктивной кардиомиопатии, ассоциированной с мутацией в гене филамина C (*FLNC*)

М.Ю. Шарикова (*sharikova.marg@yandex.ru*), Д.В. Голиусова, И.В. Копылова, И.В. Терякова, О.С. Лебедева, М.А. Лагарькова

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Россия, Москва

Введение. Рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) – это орфанная наследственная патология миокарда с тяжелым течением и плохим прогнозом, ассоциированная с мутациями саркомерных и цитоскелетных белков, в частности, актин-связывающего белка филамина C (*FLNC*). Удобной моделью для изучения патогенеза заболевания являются кардиомициты, полученные *in vitro* путём

направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Целью настоящей работы является получение и характеристика кардиомиоцитов из ИПСК пациента с диагнозом РКМП и верифицированной мутацией с.7416_7418delGAA в гене *FLNC*.

Материалы и методы. В работе использовали клеточные линии дермальных фибробластов пациента, ИПСК пациента, а также ИПСК здорового донора. ИПСК пациента были охарактеризованы методами ОТ-ПЦР и иммуноцитохимического окрашивания (ИЦХ); проведена пробоподготовка для GTG-окрашивания метафазных хромосом, STR-анализа и секвенирования по Сэнгеру. Дифференцировку ИПСК пациента в кардиомиоциты проводили при помощи набора STEMdiff Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Kit (Stem Cell Technologies) на 24-луночных культуральных планшетах в соответствии с протоколом производителя с дополнительной селекцией в безглюкозной среде, содержащей лактат натрия. Кардиомиоциты были охарактеризованы методом ИЦХ на экспрессию специфического маркера – сердечного тропонина Т (сTnT).

Результаты. 1) С помощью генотипирования и секвенирования были установлены аутентичность линии ИПСК пациента, а также присутствие исследуемой мутации. 2) Был успешно отработан протокол дифференцировки линий ИПСК пациента, а также контрольной линии ИПСК от здорового донора в кардиомиоциты: получены культуры кардиомиоцитов, способные к сокращению и поддержанию в культуре на протяжении 1,5 месяцев. 3) Окрашивание полученных культур на маркер зрелых кардиомиоцитов продемонстрировало порядка 85% сTnT⁺-клеток, что соответствует заявленной производителем эффективности дифференцировки.

Выводы. Выбранный нами способ получения кардиомиоцитов из ИПСК показал высокую эффективность и воспроизводимость и может быть использован в дальнейшем для моделирования РКМП и изучения патогенеза заболевания *in vitro*.

МБ36. Анализ протеома экзосом клеточных линий молочной железы различного молекулярного профиля

А.А. Шефер (a.shefer@g.nsu.ru)^{1,2}, Л.В. Яньшолё³, Т.А. Штам⁴, С.Н. Тамкович^{1,2}

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

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Институт «Международный Томографический Центр» СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴НИЦ «Курчатовский Институт», Санкт-Петербург, Россия

Введение: Рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным видом злокачественных новообразований среди женщин (24,5%). Для улучшения эффективности противоопухолевой терапии и снижения онкологической смертности ведутся активные поиски биомаркеров, позволяющих уточнить молекулярный портрет опухоли, в том числе в составе «жидкой биопсии». Поскольку экзосомы секретируются всеми типами тканей и отражают

биохимический состав секретирующих их клеток, поиск опухоле-ассоциированных белков в составе экзосом крови является одной из «горячих точек» молекулярной онкологии.

Материалы и методы: Экзосомы получены методом ультрафильтрации и последовательного ультрацентрифугирования из кондиционных сред трех линий эпителиоцитов: псевдо-нормальных клеток HBL-100, клеток MCF-7 (молекулярной портрет линии соответствует люминальному А подтипу РМЖ) и клеток BT-549 (молекулярной портрет линии соответствует трижды негативному подтипу РМЖ). Препараты экзосом охарактеризованы в соответствии с требованиями Общества внеклеточных везикул, экзосомальные белки идентифицированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Результаты: В составе экзосом был идентифицирован 301 белок, из них 78, 90 и 76 уникальных белков для культур HBL-100, MCF-7 и BT-549, соответственно; выявлено 26 универсальных экзосомальных белков и 8 белков, характерных для экзосом, секретируемых опухолевыми клетками. Выявлена тенденция к снижению содержания в составе экзосом внеклеточных белков и белков плазматической мембраны с увеличением агрессивности клеток, значительное повышение содержания белков с ДНК-связывающей функцией и вовлеченных в метаболизм белков в экзосомах опухолевых клеток MCF-7 и BT-549 по сравнению линиями псевдо-нормальных эпителиоцитов HBL-100. Также выявлено повышение содержания белков, связывающих нуклеиновые кислоты в линиях карциномы молочной железы.

Выводы: Выявленные в составе экзосом белки с онкогенным потенциалом являются перспективными неинвазивными биомаркерами РМЖ. Дальнейшее исследование этих белков позволит раскрыть потенциал выявленных экзосомальных протеомных онкомаркеров для ранней диагностики и персонализированного подхода к лечению онкологических больных.

МБ37. Моделирование G-квадруплексов в хроматиновом контексте

М.С. Юдин (judin.ms@phystech.edu)^{1,2}, А.М. Варижук^{1,2}, Ю.И. Павлова^{1,2}, Д.В. Клинов^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства»

G-квадруплексы (G4) - неканонические вторичные структуры, образующиеся в гуанин-богатых участках нуклеиновых кислот. Они состоят из слоев плоских, связанных хугстиновскими водородными связями гуаниновых тетрад. G4 широко представлены в транскрипционно-активных участках генома и ориджинах репликации, при этом, скорее, затрудняют репликацию и транскрипцию. В настоящее время показано, что квадруплексы явно преобладают в областях с

низкой нуклеосомной плотностью, но значимы для ремоделирования хроматина. G4-лиганды рассматриваются как потенциальные агенты эпигенетической терапии. Важным направлением является получение модели для *in vitro* тестирования квадруплексных лигандов в хроматиновом контексте.

В работе использовались синтезированные одноцепочечные олигонуклеотиды, из которых получали ДНК-конструкцию. Полученные фрагменты были проанализированы с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД) и ЯМР-спектроскопии для подтверждения формирования квадруплекса. С использованием коммерческого набора гистонов была получена нуклеосомная конструкция, состоящая из гистонового ядра и линкерной ДНК. Сборка такой модели визуализирована методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Далее мы оценили влияние G4-лигандов (TmPyP4, BRACO-19 и PDS) и их специфичность к квадруплексам.

Была выполнена сборка конструкций, моделирующих G4 в составе хроматина. Корректность сборки подтверждена методами АСМ, электрофореза и КД-спектроскопии. Описана морфология данных структур. Определена доля корректно фолдированных G4 в межнуклеосомной ДНК; она составила 47% по ЯМР-данным. Электрофоретический анализ выявил, что присутствие квадруплекса в линкерной ДНК значительно уменьшает долю собранных нуклеосом. Сложенный квадруплекс оказался доступен для связывания лигандом PDS, а лиганды BRACO и TmPyP4, помимо G4, проявляют сродство к гистоновому октамеру.

Получена *in vitro* модель G4 в хроматиновом контексте. С помощью такой модели определена специфичность известных G4-лигандов, а также их возможное побочное действие на нуклеосому.

Данное исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 22-15-00129.

МБ38. Исследование влияния стероидов и их производных на пролиферацию, миграцию и гибель клеток рака молочных желез и шейки матки, клеток острого миелоидного лейкоза

К.О. Юрѳева (*kristina_yureva_2000@mail.ru*)¹, Т.В. Романовская¹, Я.В. Фалетров²

¹Биологический факультет БГУ

²Химический факультет БГУ

Введение. Синтетические стероиды используются в лечении гормонзависимых онкологических заболеваний, включая рак молочных желез, эндометрия, предстательной железы. Имеются экспериментальные доказательства дозозависимого влияния дегидроэпиандростерона на выживаемость и пролиферацию раковых клеток. Конъюгация холестериновой части с лекарственными соединениями является многообещающим подходом для адресной доставки лекарств.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были использованы клеточные линии ZR-75, HeLa, Kasumi-1. Анализировались вещества стероидного ряда: дегидроэпиандростерон, или DHEA (от 1 до 1000 нМ, от 10 до 150 мкМ), андростендион (от 1 до 1000 нМ) и андростандион (от 1 до 1000 нМ); конъюгаты холестерина (от 5 до 20 мкМ); флуоресцирующие производные 20-гидроксистеролов (от 10 до 50 мкМ). Суммарный цитотоксический и цитостатический эффект оценивали посредством ХТТ-теста. Визуальное исследование клеток *in situ* осуществлялось с помощью системы флуоресцентной визуализации ZOE Fluorescent Cell Imager.

Результаты. DHEA при концентрациях более 10 мкМ оказывал дозозависимое антипролиферативное действие на все клеточные линии ($IC_{50}=120,9$ мкМ для Kasumi-1, $IC_{50}=128,6$ мкМ для HeLa, $IC_{50}=95$ мкМ). При концентрации менее 1 мкМ DHEA и его метаболиты стимулируют пролиферацию. Также DHEA (30, 50 и 70 мкМ) ингибирует миграцию клеток, вместе с тем его метаболиты при низких концентрациях (до 1 мкМ) способствуют миграции. Конъюгаты холестерина показали антипролиферативный эффект в отношении HeLa, Kasumi-1, но не ZR-75. Для 20-гидроксистеролов была зафиксирована аккумуляция внутри клеток и дозозависимое цитотоксическое действие.

Вывод. Были получены результаты, имеющие потенциал для дальнейшего развития в области исследования производных стеролов и их влияния на клеточные линии рака. В свете полученных результатов представляет интерес в дальнейшем изучить, обусловлены ли эффекты непосредственно дегидроэпиандростероном, или его метаболитами, а также механизмы действия исследованных веществ на раковые клетки.

Содержание

Секция «Доклады».....	9
Д1. Применение аптамеров к EGFR для таргетной доставки доксорубина в клетки глиобластомы.....	9
Д2. Подходы к моделированию болезни Паркинсона, вызванной мутацией G2019S в киназе LRRK2, на изогенной клеточной модели.....	10
Д3. Белок Hmo1 влияет на структуру нуклеосом и обеспечивает АТФ-независимое разворачивание нуклеосом белковым комплексом FACT.....	11
Д4. Изучение аллостерической коммуникации биомолекул с использованием теории информации.....	12
Д5. Экспрессия высокопредставленных белков скелетной мышцы человека при старении.....	13
Д6. Управление активностью кардиомиоцитов и секретирующих гормоны клеток с помощью термогенетики.....	14
Д7. <i>In vivo</i> исследование роли пероксида водорода в развитии ишемического инсульта в модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета I типа у крыс <i>Rattus norvegicus</i> с помощью генетически кодируемого биосенсора HyPer7.....	15
Д8. Исследование кинетики хемилюминесценции, индуцированной образованием гуанинового квадруплекса, для детекции уникальных последовательностей РНК организмов.....	16
Секция «Биохимия»	18
БХ1. Исследование нековалентных взаимодействий сывороточного альбумина человека с олигонуклеотидными производными, содержащими липофильные группы.....	18
БХ2. Биохимический анализ амилоидогенности фрагментов белка вителлогенина <i>Gallus gallus domesticus</i> в дрожжевой модельной системе	19
БХ3. Иммунохимические исследования тропонина I сердца позвоночных фауны Звенигородской биологической станции с использованием моноклональных антител различной эпитопной специфичности.	20
БХ4. Структура и динамика латеральной гетерогенности бислоев ДОФХ/ДОФС: результаты компьютерного моделирования.....	21
БХ5. Получение рекомбинантной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) человека в бактериальной системе экспрессии и определение ее удельной активности.	22
БХ6. Внутрядерные концентрации одновалентных катионов определяются концентрациями этих ионов во внеядерной среде	23
БХ7. Биохимическая характеристика полиферментных комплексов дегидрогеназ 2-оксоглутарата и 2-оксоадипата в гомогенатах мозга крысы	24

БХ8. Получение рекомбинантного полноразмерного IGFBP-4 в бактериальной экспрессионной системе и определение уровня его протеолиза под действием PAPP-A в первичной культуре головного мозга крыс разного возраста	25
БХ9. Антибактериальная активность внеклеточных вторичных метаболитов мха <i>Ceratodon purpureus</i>	26
БХ10. Количественное определение и метаболизм витамина К у <i>Drosophila melanogaster</i> 27	
БХ11. Ускорение ферментативного гидролиза с помощью ультразвука и микроволн: 100 образцов за 3 часа для протеомного анализа с помощью сверхбыстрой хроматомасс-спектрометрии	28
БХ12. Регуляция разделения фаз жидкость-жидкость, инициируемого N-белком SARS-COV-2 и вирусной РНК	29
БХ13. Влияние химических шаперонов на кинетику агрегации бычьего сывороточного альбумина при облучении ультрафиолетовым светом	30
БХ14. Получение поликлональных антител, специфичных к белку VPg Y вируса картофеля	31
БХ15. Характеристика свойств обычного и серповидноклеточного гемоглобинов при образовании нековалентного комплекса с глутатионом.	32
БХ16. Получение рекомбинантного химерного белка, состоящего из фрагмента сердечной изоформы тропонина I (20-190 АК) и полноразмерного тропонина С человека, и исследование его иммунохимических свойств	33
БХ17. Изоформы тропомиозина, участвующие в онкотрансформации: структурные и функциональные особенности	34
БХ18. Локализация каротиноид-связывающего участка в белке AstaP из зеленой водоросли	35
БХ19. Биологическая активность вторичных метаболитов, выделенных из твердофазной культуры гриба <i>Camarosporomyces flavigenus</i> 32.43	36
БХ20. Улучшение гетерологической биолюминесцентной системы грибов путем использования гомологичных ферментов гиспидин-3-гидроксилаз	37
БХ21. Анализ аминокислотных остатков пептида Ms11a-3 функционально значимых для связывания с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами.	38
БХ22. Влияние условий молекулярного краудинга на агрегацию лизоцима белка куриного яйца	39
БХ23. Влияние природных пептидов с высокой аффинностью к «кислотному лоскуту» гистонового димера H2A/H2B на разворачивание нуклеосом комплексом FACT.....	40
БХ24. Динамика каталитической активности γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы в зеленых листьях кукурузы (<i>Zea mays L.</i>) при гипоксии.....	41
БХ25. Определение аффинности аптамеров к EGFR и EGFRvIII методами поляризации флуоресценции и интерферометрии биослоев	42

БХ26. Получение рекомбинантной быстрой скелетной изоформы тропонина I человека и исследование ее иммунохимических свойств.....	43
Секция «Молекулярная и клеточная биология»	45
МБ1. Висцеральные стволовые клетки жировой ткани увеличивают накопление липидов в здоровых адипоцитах	45
МБ2. Итаконат регулирует продукцию цитокинов посредством ингибирования сукцинатдегидрогеназы.....	46
МБ3. Нокаут генов протеазы S и ее ингибитора усиливает инсектотоксичность культуральной среды бактерии <i>Photorhabdus laumondii</i>	47
МБ4. Влияние теплового стресса на PAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 в кардиомиоцитах человека, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.....	48
МБ5. Оценка совместного действия онколитического вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact и темозоломида в отношении клеток глиомы человека <i>in vitro</i>	49
МБ6. Изучение влияния гетерологичных сигнальных пептидов на уровень секреции гликопротеидных гормонов	50
МБ7. Поиск анти-рестрикционного белка бактериофага T5	50
МБ8. Фоторегулируемые системы редактирования генома CRISPR/Cas9 с использованием циклических фоторасщепляемых олигонуклеотидных компонентов	51
МБ9. МСК жировой ткани пожилых доноров демонстрируют гетерогенность в дифференцировочном, пролиферативном потенциалах и инсулиновой сигнализации ..	52
МБ10. Сравнение эффективности трансфекции с помощью полимера M1-G4 и коммерческого аналога - Липофектамина 3000.....	54
МБ11. Малая субпопуляция клеток, несущих на поверхности инсулиновый рецептор, регулируют адипогенную дифференцировку	55
МБ12. Получение клеточной линии преадипоцитов 3T3-L1, экспрессирующей Glut4, и её валидация для исследования метаболических заболеваний <i>in vitro</i>	56
МБ13. Анализ роли индукторов адипогенеза в ингибировании процесса трансдифференцировки лёгочных фибробластов в миофибробласты	57
МБ14. Протеомические подходы для изучения окислительного стресса при индукции ферроптоза	58
МБ15. Оптимизация подходов формирования гомо- и гетеротипических трехмерных моделей рака молочной железы.....	59
МБ16. Изучение возникновения резистентности к спарсомину у эукариотических клеток	60
МБ17. Поиск новых триггеров системы abortивного иммунитета PARIS	61
МБ18. Влияние экспрессии Т-кадгерина на адипоцитарную дифференцировку преадипоцитов 3T3-L1	62

МБ19. Изучение редокс-метаболизма стволовых клеток глиобластомы с целью разработки подходов для преодоления резистентности клеток к действию химиотерапии	63
МБ20. Детекция маркера CD133 в глиобластоме человека с помощью аптамеров	64
МБ21. Получение хромосомных транслокаций с участием гена <i>KMT2A</i>	65
МБ22. Функции глюкокортикоид-индуцируемой протеинкиназы (SGK1) в адипоцитах: регуляция чувствительности к инсулину, захвата глюкозы и жирных кислот	66
МБ23. «Молекулярные механизмы цитотоксического действия рекомбинантного селенопротеина SELENOM на клетки глиобластомы человека»	67
МБ24. Участие прегнан Х рецептора (PXR) и конститутивного андростанового рецептора (CAR) в регуляции белка-транспортера BCRP под действием прогестерона	68
МБ25. Установление родовой принадлежности бактериальных штаммов, оживленных из кишечного содержимого ископаемого бизона.	69
МБ26. Влияние фактора ПАРилирования гистонов на регуляцию ДНК-полимеразной активности ДНК-полимеразы β в контексте нуклеосомы	70
МБ27. Функциональные нарушения, вызванные реорганизацией цитоскелета в производных ИПСК с нокаутом гена <i>UBE2A</i>	71
МБ28. Модификация производных бензимидазо[1,2-С]пиримидин-1-она и нафто[2',1':4,5]имидазо[1,2-С]пиримидин-11-она для получения лигандов, стабилизирующих G-квадруплексы	72
МБ29. Субклеточная локализация белков цитоматрикса пресинаптической активной зоны и их роль в регуляции экспрессии генов	73
МБ30. Изучение влияния мРНК в составе внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток на трансдифференцировку миофибробластов на клеточных моделях фиброза	74
МБ31. Изучение функциональных участков 5'-нетранслируемой области мРНК ATF5, контролирующей трансляцию ATF5 при стрессе эндоплазматического ретикулаума	75
МБ32. Тестирование новых липидных реагентов для доставки мРНК в клетки млекопитающих с помощью непрерывного мониторинга активности люциферазы	76
МБ33. Разработка репортерной клеточной линии для изучения инсулиновой сигнализации в реальном времени.	77
МБ34. Определение уровня экспрессии мРНК субъединиц гетеромерных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) в моноцитах и макрофагах человека, находящихся в различных функциональных состояниях	78
МБ35. Создание клеточной модели рестриктивной кардиомиопатии, ассоциированной с мутацией в гене филамина С (<i>FLNC</i>)	79
МБ36. Анализ протеома экзосом клеточных линий молочной железы различного молекулярного профиля	80

МБ37. Моделирование G-квадруплексов в хроматиновом контексте.....	81
МБ38. Исследование влияния стероидов и их производных на пролиферацию, миграцию и гибель клеток рака молочных желез и шейки матки, клеток острого миелоидного лейкоза	82
Содержание	84

Научное издание

III межвузовская студенческая конференция
СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2023

12-13 марта 2023 г.

Материалы конференции – том I

Составление и верстка: Е.П. Альтшулер
Дизайн обложки: Е.С. Беличенко

Формат 90х60/16

Печать цифровая

Усл. печ. листов 5.75

Тираж 200 экз.

Изд. Биологический факультет МГУ

Заказ 3

Подп. в печать 05.03.2023

