

## Организаторы



НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ

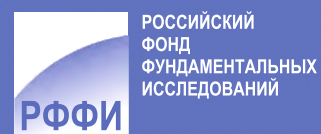
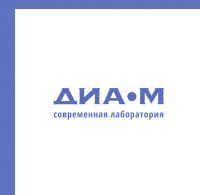


Отделение молекулярной  
и радиационной биофизики



НИЦ «Курчатовский институт»

## При поддержке



КУРЧАТОВСКИЙ  
ИНСТИТУТ



ДЛЯ СТРАНЫ  
И МИРА

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»  
Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

# ЗИМНЯЯ МОЛОДЕЖНАЯ ШКОЛА ПИЯФ

ПО БИОФИЗИКЕ  
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Сборник тезисов  
и список  
участников

17–22 февраля 2018

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

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

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

17–22 февраля 2018 г.

**Сборник тезисов  
и список участников**

В данном выпуске представлены аннотации докладов и состав участников XIX Зимней молодежной школы по биофизике и молекулярной биологии, 17–22 февраля 2018 г.

**Организаторы:**

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»  
Отделение молекулярной и радиационной биофизики  
Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

**Проведение Школы поддержали:**

Российский фонд фундаментальных исследований.  
Проект № 18-34-10009 мол\_г

ООО «Диаэм»  
ООО «Компания Хеликон»  
ООО «Герофарм»  
ООО «Биоген-Аналитика»  
Merck  
BIOCAD  
GE Healthcare  
Beckman Coulter

Sartorius

**Программный комитет**

Председатель д. б. н. *Саранцева С. В.*  
*Демин В. А.* *Пчелина С. Н., д. б. н.*  
*Коневега А. Л., к. ф.-м. н.* *Шабалин К. А., к. ф.-м. н.*

**Организационный комитет**

Председатель *Коневега А. Л.*  
Заместитель председателя *Лебедев Д. В.*  
Секретарь *Полтавская Н. С.*  
*Вербенко В. Н.* *Полесскова Е. В.* *Потапова Т. А.*  
*Пчелина С. Н.* *Швецова С. В.* *Иванова Т. А.*  
*Шабалин К. А.* *Халяпин С. В.* *Никитина Н. В.*

Сборник подготовили: *Вербенко В. Н., Полтавская Н. С., Пчелина С. Н.*

Обложка: *Полесскова О. В.*

*Примечание:* материалы напечатаны в авторской редакции.

© НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, 2018

# **Приглашенные лекторы**



## Jens Waldeck

*Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Germany*

Dr. Jens Waldeck is working for Bruker BioSpin MRI GmbH as EIMEA Application and Sales Manager in the field of PreClinical Imaging (PCI).

As Application Manager in the field of the *in vivo* optical and PET/SPECT/CT imaging he leads and coordinates imaging trainings, workshops, seminars and research projects. Before joining Bruker he was holding a Senior Application Manager position at Carestream Molecular Imaging/Carestream Health to give support to the European and global market for both *in vivo* and *in vitro* optical and nuclear (preclinical) imaging products as well as Head of the lab at the University Hospital Muenster, Germany.

### **Adding color to your shades of grey: How PET/MR will level up your research**

*Dr. Jens Waldeck*

*Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Germany*

Bruker PreClinical Imaging (PCI) is well known since decades for its superior MRI systems. However, in the shadow of the MRI its' PET technology has evolved in the last years finally resulting in combined PET/MR systems to provide superior functional, morphological and molecular information. This combination means improved soft tissue contrast, cross-validation of methods and opens up a multitude of applicable methods.

The latest silicon PET detector technology together with proven superior MRI are now combined in three different instrument versions with various application benefits:

PET/MR at clinical field strength – based on a newly developed 3T cryogen-free magnet in combination with a motorized animal transport system and touchscreen controls for ease-of-use-used with best in class coincidence silicon PET technology supports a broad spectrum of applications in oncology, neurology, orthopedics, cardiology, stroke and more.

In addition to this, the new PET-Inline module can be added to all existing high-field MRI\* systems for unsurpassed PET and MRI imaging performance without the need to invest in a new MRI scanner. It features homogeneous, high-resolution and quantitative PET imaging and offers full field accuracy PET quantification with attenuation correction based on MRI attenuation maps.

The PET-Insert design allows users to follow already familiar Bruker BioSpec MR imaging system workflows to start obtaining valuable PET/MR data almost immediately and simultaneously. The first system was successfully installed in August 2016 in a 7 Tesla system at The Catholic University of Leuven, Belgium. Their results tremendously highlights the value of simultaneous PET/MR in preclinical imaging studies on multi-parametric questions like tumor micro-environment, brain and cardiac research as well as on other research questions.

\* BioSpec or Pharma Scan.

## Jérôme Golebiowski

*Institut de Chimie de Nice  
UMR 7272 CNRS  
Université Côte d'Azur*



### Professional Preparation

|                                |                                    |           |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------|
| University of Lille I          | BS in Biophysics                   | 1991–1994 |
| University of Nancy            | MS in Biophysics                   | 1994–1997 |
| Atomic Energy Center/ U. Nancy | PhD in theoretical chemistry       | 1997–2000 |
| University of Nice             | Postdoc in Computational Chemistry | 2000–2001 |

### Actual appointments

- 2015 – Adjunct Professor, DGIST, Deagu, Korea.
- 2015 – Professor, Dept. of Chemistry, University of Nice, France.
- 2015 – Head of the CNRS group (GDR N° 3713) “odorant-odor-olfaction”.
- 2016 – Member of the CNRS national committee, section 20: biology / chemistry.

### Recent significant publications

- J. Topin, C.A. de March, L. Charlier, C. Ronin, S. Antonczak, J. Golebiowski\*.  
Discrimination between Olfactory Receptors agonists and non-agonists. Chemistry, Eur. J., 2014, 20, 10227–10230.
- Y. Yu, C.A. de March, M. Ni, K. Adipietro, J. Golebiowski\*, H. Matsunami\*, M. Ma\*.

Responsiveness of G protein-coupled odorant receptors is partially attributed to the activation mechanism.

Proc. Nat. Acad. Sci, USA, 2015, 112 (48), 14966–14971.

- C.A. de March, Y. Yu, M. Ni, K. Adipietro, H. Matsunami\*, M. Ma\*, J. Golebiowski\*.  
Conserved Residues Control Activation of Mammalian G Protein-Coupled Odorant Receptors.  
J. Am. Chem. Soc., 2015, 137, 8611.
- C.A. de March, S. Ryu, G. Sicard, C. Moon, J. Golebiowski\*.  
Structure-Odor relationship reviewed at the postgenomic era.  
Flav. & Frag. J., 2015, 30, 342–361.
- C.A. de March, J. Topin, E. Bruguera, G. Novikov, K. Ikegami, H. Matsunami\*, J. Golebiowski\*.  
Odorant receptor 7D4 activation dynamics.  
Angewandte Chemie Eng. Int. Ed., 2018, in revision.

### **Synergistic Activities**

- \* Executive member of the Edmond Roudnitska Foundation
- \* H2020 European Community expert

### **International collaborators**

|                                         |                              |
|-----------------------------------------|------------------------------|
| Hiroaki Matsunami, Duke University      | William Goddard III, Caltech |
| Minghong Ma, University of Pennsylvania | Cheil Moon, DGIST, Korea     |
| Emma Teeling, U. Dublin, Ireland        | Roman Efremov, RAS           |

### **Thesis Advising (last 4 years)**

|                                |                                   |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| Claire A. de March (2012–2015) | University Nice Sophia Antipolis  |
| SangEun Ryu (2012)             | DGIST, brain science dept., Korea |
| Caroline Bushdid (2015)        | University of Nice                |
| Tammy Shim (2017)              | DGIST, brain science dept., Korea |

**Draw me an odor! Draw me a taste! Draw me an emotion!**

*Jérôme Golebiowski*

Chemical senses (smell and taste) are powerful senses that can trigger intense emotions, stereotyped behaviors and durable memories. These senses offer an extraordinary opportunity to connect atomic-level objects (molecules and receptors in the nose or mouth) to neural responses. However, the complexity of the odor and taste molecules, the large number of the smell receptors and combinatorial activation of the receptors make understanding such senses an enormous challenge.

I combine computational approaches with experimental measurements at both the receptor and the behavioral level. Comparisons are made between experimental findings and computational predictions until results from the computational modeling converge with experimental data.

The goal is notably to understand more precisely how our brain works. It has widespread and diverse industrial and academic applications.

## **Аниол Виктор Александрович**

*Кандидат медицинских наук,  
старший научный сотрудник  
Лаборатории функциональной биохимии  
нервной системы  
Института высшей нервной деятельности  
и нейрофизиологии РАН*



В 2006 году окончил факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и поступил в аспирантуру Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. В 2009 году защитил кандидатскую диссертацию на тему: «Особенности пролиферации клеток в герминативных зонах мозга крыс при экспериментальных патологиях, сопровождающихся нейродегенерацией».

Область профессиональных интересов связана с клеточными изменениями (в первую очередь изменениями постнатального нейрогенеза) в мозге при различных патологических состояниях.

## **Эпилепсия как патология нейропластичности: современные взгляды и перспективы**

*Аниол В. А.*

*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,  
Москва, Россия*

Эпилепсия – одно из наиболее распространенных заболеваний нервной системы человека. Эпилепсия также является примером такого патологического состояния, развитие которого имеет в своей основе процессы, протекающие в мозге и в нормальных условиях. По словам одного из ведущих исследователей в этой области Helen Scharfman «...для заинтересованных в исследовании пластичности, наверное, лучшие примеры находятся в области изучения эпилепсии». Действительно, не будет преувеличением сказать, что в основе развития этого заболевания лежит aberrantная форма реактивной нейропластичности. Такие процессы, как усиление постнатального нейрогенеза в гиппокампе, структурная реорганизация межнейронных связей, перестройка синаптического аппарата и изменение состава мембранных каналов и рецепторов характерны как для физиологических процессов обучения и формирования новой памяти, так и, в измененной или гипертрофированной форме, для эпилептогенеза. Еще одним интригующим процессом, часто наблюдаемым при прогрессировании эпилепсии, является возникновение устойчивости к противэпилептическим препаратам, что тоже, вероятно, обусловлено пластическими перестройками в эпилептическом мозге. Понимание того, как патологическая нейропластичность может участвовать в возникновении и развитии эпилепсии, может, с одной стороны, позволить найти эффективные подходы к лечению этого заболевания, а с другой - дать ключ к пониманию процессов, лежащих в самой основе функционирования нашего мозга.

## **Балановский Олег Павлович**



Олег Павлович Балановский родился в Москве в 1977 г. В 2000 г. окончил с отличием МГУ им. М. В. Ломоносова (кафедра генетики биофака МГУ). Его дипломная работа была удостоена медали РАН за лучшую студенческую работу 2000 года в области «общая биология».

С 2000 г. – аспирант Института молекулярной генетики РАН. В 2002 году защитил диссертацию «Геногеографическое изучение полиморфных маркеров ДНК в популяциях восточно-европейских народов». С 2002 по 2011 год работал в Медико-генетическом научном центре РАМН, пройдя путь от научного сотрудника до ведущего научного сотрудника. С 2011 г. являлся руководителем группы геномной географии при дирекции Института общей генетики РАН – группа была создана по гранту «Новые группы» Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология». В 2013 году группа выросла в лабораторию геномной географии ИОГен РАН, а О. П. Балановский стал ее руководителем.

В 2013 г. защитил докторскую диссертацию «Изменчивость генофонда в пространстве и времени: синтез данных о геногеографии митохондриальной ДНК и Y-хромосомы». В настоящее время, кроме заведования Лабораторией геномной географии ИОГен РАН, работает по совместительству в Медико-генетическом научном центре и преподает в МФТИ и МГУ.

В научной работе О. П. Балановского важную роль сыграли неоднократные стажировки в Эстонском биоцентре под руководством президента Эстонской академии наук акад. Р. Виллемса. А также стажировка в Австралийском центре Древней ДНК.

Основное научное направление – изучение генофонда Евразии, современного и древнего. Второе важное направление работы – создание баз данных, геногеографических технологий, картографических атласов о генофондах мира.

О. П. Балановский не только руководит экспедиционным обследованием генофондов народов Северной Евразии (Кавказ, Поволжье, Урал, Восточная Европа, Сибирь, Дальний Восток, Казахстан, Памир, Центральный Азия), но и сам участвовал в многочисленных экспедициях по обследованию генофондов русского народа, донских казаков, Адыгеи, Осетии, Дагестана, Татарстана, Калмыкии, Казахстана, Таджикистана, Афганистана.

Являлся руководителем большого числа российских и международных проектов. Российские проекты: руководитель гранта РНФ, 60 грантов РФФИ (из них 23 – руководитель), руководитель 6 проектов

Программ Президиума РАН, проекта Минобрнауки. Международные проекты: с 2005 года соруководитель исследовательского центра «Северная Евразия» в рамках крупнейшего международного проекта в области популяционной генетики «GENOGRAPHIC», с 2012 г. – руководитель «Индоевропейского проекта» в рамках “GENOGRAPHIC 2.0”, соруководитель проекта «Генетическая история популяций Казахстана». Под руководством О. П. Балановского защищены четыре кандидатские диссертации и выполняются еще четыре.

Является рецензентом ряда российских и зарубежных журналов. Автор 324 публикаций, в том числе в высокорейтинговых международных журналах – Nature, Science и др. Опубликовано две монографии «Русский генофонд на Русской равнине» в 2007 г. и «Генофонд Европы» в 2015. Есть также главы в коллективных монографиях.

Высокий уровень работ подтверждается формальными показателями. Так в базе данных Web of Science для Oleg Balanovsky содержится информация: 90 публикаций БД Web of Science; средняя цитируемость публикаций составляет 20.9; индекс Хирша равен 22.

## **Геногеография: народы, популяции и их гены**

*Балановский О. П.*

Геногеография изучает генофонды популяций. И хотя факторов, которые могут повлиять на генофонд, считанное число, применительно к человеку эти факторы предстают в обличье и колоритных исторических миграций, и демографических взрывов, и социального неравенства, и революционных технологий, и крынки с молоком, и обычной человеческой любви. Но чтобы применять эти знания к реконструкции истории народов, надо сперва задаться вопросом: народы и популяции – это одно и то же, или нет? Точный ответ – народы с долей эндогамных браков выше 50 % по совместительству являются популяциями – будет прокомментирован в ходе лекции.

Разобравшись с механизмами жизни генофондов в теории, мы посмотрим, как их работу можно увидеть на примере реального народонаселения России. Начинаясь в экспедициях, продолжаясь в биобанках и лабораториях, эти исследования достигают своей кульминации в биоинформационном и картографическом анализе, а потом требуют творческой, вдумчивой, взвешенной интерпретации при воплощении в научные статьи. Анализ полных (или даже частичных) геномов дает колоссальный объем данных и возможность точно описать генофонд каждой популяции и каждого человека. Но анализ отдельных локусов в геноме (например, самого длинного локуса – Y-хромосомы) часто позволяет узнать еще больше. Накопив опыт многих исследований и многих

генофондов, можно делать и обобщения. Например, что сходство генофондов часто аппроксимируется просто географическими расстояниями между ними, но в определенных случаях лингвистическое родство языков отражает структуру генофондов лучше географической карты. А геногеографические карты – показывающие не где расположены популяции, а изменчивость их генофондов в географическом пространстве – часто оказываются самым емким языком для мультидисциплинарных исследований народонаселения.

Ведь геногеография изучает генофонды не только сама для себя: чаще всего она используется как еще один исторический источник, рассказывающий о происхождении самых разных групп населения – от выхода из Африки до донских казаков. Кроме фундаментально-научного значения геногеография в последние годы приобрела и две сферы практического приложения: в фармакогенетика и в определение происхождения человека по его ДНК. Если человек сам хочет узнать свое происхождение – это генетическая генеалогия, а если его происхождение хочет узнать полиция – это криминалистика, но методы решения задачи в обоих случаях одинаковы.

Все остальное время лекции будет заполнено примерами генофондов России и мира: расселение славян и рода нанайцев, генетика и расы человека, Рюриковичи и чингизиды, генофонды Кавказа, Урала, Сибири, Центральной Азии и Дальнего Востока – сколько успеется...



## Барлев Николай Анатольевич

*Заместитель директора,  
заведующий Лабораторией  
регуляции экспрессии генов  
Института цитологии РАН*

**Researcher ID:** K-5268-2017

**ORCID:** 0000-0001-7111-2446

### **Образование:**

КГУ, 1989, специалитет: биолог-микробиолог;

к. б. н., Институт цитологии, Санкт-Петербург, 1994;

д. б. н., Институт цитологии, Санкт-Петербург, 2010.

### **Основное место работы:**

Институт цитологии РАН.

2007–2012 – Professor of Biochemistry, Head of the Lab; University of Leicester, Leicester, UK.

2002–2007 – Assistant Professor of Medicine, Head of the Lab; Tufts University Medical Center, Boston, USA.

1998–2002 – Staff Scientist, Wistar Institute, Philadelphia, USA.

1994–1998 – Post-doc, S.L. Berger lab, Wistar Institute, Philadelphia, USA.

1990–1994 – аспирант ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия.

1984–1989 – студент, биолого-почвенный факультет, Казанский государственный университет, Казань, Россия.

### **Научные интересы:**

Основные научные интересы включают в себя: механизмы регуляции активности онкосупрессора человека TP53; механизмы Эпителиально-Мезенхимного Перехода, регуляция апоптоза и пролиферации раковых клеток; Рациональный дизайн новых противораковых препаратов, разработка и создание клеточных тест-систем для высокопроизводительного скрининга, доклинические исследования новых препаратов; CRISPR-Cas9-зависимая интерференция и активация для контролируемой экспрессии генов.

### **Профессиональная деятельность:**

Автор более 110 публикаций, индекс Хирша – 24.

Главный редактор журнала “Cell Life and Technology”, член редколлегии журналов “Open Journal of mass-spectrometry”, Oncotarget

(2015–2016), Cell Death Disease (2015–2016), Cell Death Discovery (2016 – по настоящее время).

Рецензент журналов “Cell Death Differentiation”, “Cell Death Disease”, “Oncogene”, “Cell Cycle”, “PLoS One”, “Cancer Research”, “Nucleic Acid Research” и “Molecular and Cellular Biology”.

Член Экспертного Совета по платформе «Фарма 2020», рецензент грантов BBSRC и CR-UK (Великобритания), грантов РФФИ, грантов Министерства науки и образования по Программе «5-100».

Член Обществ “American Society of Cell Biology”, “British Association of Cancer Research”, “European Association of Cancer Research”.

## **Роль p53 в раковых клетках**

*Барлев Н. А.*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

p53 является одним из главных онкосупрессоров человека. Поэтому неудивительно, что он мутирован или инактивирован почти во всех опухолях, известных на сегодняшний день. p53 выполняет свои функции в клетке в основном как транскрипционный фактор. За счет активации транскрипции генов-мишеней, продукты которых индуцируют старение, остановку клеточного цикла, или апоптоз, p53 регулирует клеточный ответ на различные формы стресса. Однако, каким образом клетки различают различные внешние сигналы и коммуницируют их на p53, вызывая остановку клеточного цикла или клеточную смерть, все еще остается до конца не выясненным. Данные, полученные в нашей лаборатории и другими исследователями, свидетельствуют о том, что ковалентные пост-трансляционные модификации p53 участвуют в механизмах тонкой настройки клеточного ответа на различные онкогенные стимулы. При этом, крайне важным для регуляции функций p53 является не только определенный тип ковалентной модификации, но и месторасположение модификации, а также последовательность их появления на молекуле p53. В силу того, что мутантный p53 приобретает онкогенные свойства и активирует совершенно иной спектр генов-мишеней, важным представляется изучение его свойств и тех генов, которые он регулирует.



## Бочаров Эдуард Валерьевич

Бочаров Эдуард Валерьевич в 1993 году закончил факультет физико-химической биологии Московского физико-технического института (ФФХБ МФТИ), защитив дипломную работу «Пространственная структура трансмембранных сегментов С, Е и G бактериоопсина по данным двумерной спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР». После аспирантуры Института биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова (ИБХ РАН) Бочаров Э. В. в 1998 году защитил кандидатскую диссертацию на тему «Пространственная структура и динамика белка L7 из рибосомы *Escherichia coli*». В настоящее время работает старшим научным сотрудником в Лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии Отдела структурной биологии ИБХ РАН. Область научных интересов – структурно-динамические исследования белков и их комплексов с другими биомолекулами (липидами, ДНК) методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения и молекулярного моделирования. В последние годы основные исследования направлены на установление биофизических принципов и молекулярных механизмов проведения сигнала рецепторами через мембрану клетки, а также распознавания трансмембранных белков мембранными ферментами. Особое внимание уделяется изучению аллостерических конформационных перестроек, белок-белковых и белок-липидных взаимодействий рецепторных тирозинкиназ и белка-предшественника бета-амилоида, мутации в которых связаны с онкогенезом и болезнью Альцгеймера.

Бочаров Э. В. является автором 75 научных публикаций (статьи и монографии); индекс Хирша равен 22 (по WoS). По результатам научных исследований Бочарову Э. В. присуждались государственные стипендии «Выдающийся молодой ученый» и «Грант Президента России».

# **Структурно-функциональная динамика белков методом гетероядерной спектроскопии ЯМР**

*Бочаров Э. В.*

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

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

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

Современная гетероядерная ЯМР-спектроскопия является мощнейшим методом исследования строения биомакромолекул и их комплексов, позволяя получать не только детальную структурную информацию, но и подробные данные о внутримолекулярной динамике и межмолекулярных взаимодействиях. При этом исследования биомакромолекул проводятся в окружающих условиях подобным нативным или даже внутри живых клеток. Таким образом, с помощью ЯМР-спектроскопии можно проводить как самостоятельные исследования, так и существенно дополнять экспериментальную информацию, полученную другими структурными методами, такими как кристаллография и криоэлектронная микроскопия. В докладе будут разобраны примеры структурно-динамических ЯМР-исследований, которые в комплексе с другими биофизическими методами и молекулярным моделированием позволили раскрыть (или предположить) молекулярные механизмы взаимосвязи «структура-функция-патогенез» для белков из различных биологических систем. Это позволило существенно расширить понимание функционально-значимых процессов в организме человека на молекулярном уровне, в том числе механизмов проведения сигнала рецепторами через мембрану клетки, что необходимо для разработки новых способов молекулярно-таргетной терапии социально-значимых заболеваний, таких как канцерогенез и болезнь Альцгеймера.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 17-04-02045 и № 18-04-01289).



## **Василов Раиф Гаянович**

*Доктор биологических наук, профессор*

Область профессиональных интересов — биотехнология и физико-химическая биология. Является начальником отдела биотехнологий и биоэнергетики НИЦ «Курчатовский институт», руководит деятельностью технологической платформы «Биоэнергетика», главный редактор научного журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова».

### **Актуальные проблемы молекулярной биоэнергетики**

- Основы биоэнергетики.
- Биоэлектричество и технологии на основе принципов живой природы.
- Разработка и создание систем энергообеспечения имплантируемых устройств, искусственных органов и биороботов за счет энергетических процессов живых организмов.
- Поиск новых источников энергии в биологических системах.
- Природные молекулярные машины и источники энергии для них.
- Создание искусственных молекулярных машин и источников энергии на основе принципов бионики.



## **Демин Вячеслав Александрович**

*Кандидат физико-математических наук,  
руководитель  
Курчатовского комплекса  
НБИКС-технологий,  
в/об руководителя  
Лаборатории нейроморфных систем  
Курчатовского комплекса  
НБИКС-технологий*

С апреля 2008 года работает в НИЦ «Курчатовский институт»;  
с ноября 2016 по настоящее время — руководитель Курчатовского  
комплекса НБИКС-технологий;

с января 2016 г. по октябрь 2016 г. – заместитель руководителя – ученый секретарь Курчатовского комплекса НБИКС-технологий;

с февраля 2013 г. по январь 2016 г. – заместитель директора по научной работе Курчатовского комплекса НБИКС-технологий;

с марта 2010 г. по февраль 2013 г. – начальник Управления метрологии и сертификации нанотехнологий и продукции наноиндустрии.

В начале 2016 г. сформировал коллектив и на его основе организовал создание в Курчатовском комплексе НБИКС-технологий Лаборатории нейроморфных систем, занимающейся разработкой элементной базы нейроморфных систем и аппаратных средств искусственного интеллекта на их основе с использованием комбинаций органических и неорганических материалов и структур.

Летом 2015 г. при участии В. А. Демина в Курчатовском комплексе НБИКС-технологий сформирована Лаборатория безопасности нанотехнологий и наноматериалов, исполняющим обязанности руководителя которой В. А. Демин являлся по январь 2016 г.

Ответственный исполнитель или руководитель более 10 научных гос. контрактов, соглашений, грантов.

Область научных интересов: искусственный интеллект, нейроморфные вычислительные системы, мемристоры, импульсные (спайковые) нейронные сети, транспорт наночастиц в биологических и других средах, низкоразмерные структуры.

Количество публикаций в рецензируемых журналах: более 30 (из них 23 – WoS).

Количество публикаций в сборниках тезисов докладов конференций: более 40 – в сборниках отечественных и зарубежных конференций.

В. А. Демин является автором лекций учебного курса «Физические методы получения наноструктур», которые он читает в Институте НБИКС-технологий МФТИ.

Лауреат премии им. И. В. Курчатова 2015 г. в номинации «Работы молодых научных сотрудников и инженеров-исследователей» по теме «Разработка, создание и исследование нейроморфных систем на основе органических и неорганических мемристивных устройств»;

Диплом II степени Конкурса молодых ученых физического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

## **Искусственный интеллект и нейроморфные системы**

*Демин В. А.*

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

В лекции будет рассказано об основах и современном состоянии исследований и разработок в области искусственного интеллекта (ИИ), проанализированы цели, которые ставит перед собой научное сообщество и смарт-индустрия, а также способы достижения этих целей, включая аппаратную основу технологий ИИ – нейроморфные системы, – в предельном стремлении создать прототип «универсального» мышления, то есть способного к самоорганизованному творению нового, осмысленного материала.



### **Дробышевский Станислав Владимирович**

Российский антрополог, кандидат биологических наук, доцент кафедры антропологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, педагог и популяризатор научного мировоззрения, научный редактор портала Антропогенез.ру. Автор ряда учебных пособий для студентов, публикаций в периодических научных изданиях и научных монографий.

### **Происхождение человеческих рас**

Люди разных континентов отличаются друг от друга. Было ли так всегда? Существовали ли расы в прошлом и были ли они такими же как сейчас? Когда и где возникли негроиды, австралоиды, европеоиды, монголоиды и американоиды? О причинах и путях, времени и месте – в лекции С. В. Дробышевского.

## Журавлева Галина Анатольевна

Журавлева Галина Анатольевна – профессор кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета СПбГУ, доктор биологических наук, член Экспертного совета ВАК по биологическим наукам, зам. редактора журнала Prion (Taylor & Francis). Специалист в области генетики, молекулярной биологии и генной инженерии. Автор более 60 статей в иностранных и отечественных журналах. На биологическом факультете ведет научно-преподавательскую деятельность, читая курсы «Генетика прокариот», «Биотехнология и генетическая инженерия», «Онкогенетика и пути сигнальной трансдукции», «Молекулярные основы эволюции».



### Рождение и смерть генов

*Журавлева Г. А.*

*Кафедра генетики и биотехнологии,  
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

Целью доклада является обсудить возможности возникновения новых генов в дополнение уже существующим генам или на их основе, а также возможную судьбу современных генов. Считается, что основным способом возникновения новых генов являются разнообразные дупликации, включающие полную дупликацию генома, тандемные дупликации, дупликативную транспозицию и ретротранспозицию. Важную роль в создании новых генов играет дупликация генов, возникающая при дупликации генома. Известно, что дупликации генома происходили многократно на протяжении эволюционной истории всех четырех эукариотических царств: растений, животных, грибов и протист. Сохранение дублицированных копий в эволюции может обеспечиваться одним из трех процессов: (1) неофункционализацией; (2) субфункционализацией; (3) консервацией. Данных, полученных к настоящему времени, недостаточно для того, чтобы решить, какие из трех способов используются наиболее часто в эволюции. Одним из вариантов неофункционализации является образование «химерных» или слитных генов. Это явление становится возможным вследствие дупликации всего гена или его части, т.к. лишь в этом случае оно не приведет к нарушению функции исходного гена. В настоящее время выделяют три типа эволюции семейств генов. Два самых простых типа – дивергенция и согласованная эволюция. При третьем способе, названном «рождение и смерть генов»

(Niimura and Nei, 2006) комбинируются первые два способа. Анализ полностью секвенированных геномов выявил, что возникновение и потеря дуплицированных генов происходят с высокой частотой. Новые копии у эукариот «рождаются» с частотой около 0.001–0.01 на ген/на млн лет, а умирают на порядок чаще, что совпадает с ранее высказанной точкой зрения, что судьбой большинства генов является псевдогенизация.



## **Иванов Алексей Сергеевич**

### **Degrees**

– Diploma from 2-nd Moscow Medical Institute, Medical-Biological Faculty, Department of Biophysics, 1974.

– Ph. D. dissertation (Biophysics), 2-nd Moscow Medical Institute, Moscow, 1978.

– D. Sc. dissertation (Biochemistry),

Inst. Biomedical Chemistry RAMS, Moscow, 1991.

– Professor (Biochemistry) – 2002.

### **Previous positions**

– Post graduate student, 2-nd Moscow Medical Institute, Department of Biophysics, 1974–1977.

– Research Scientist, 2-nd Moscow Medical Institute, Central Research Laboratory, Department of Biophysics, 1977–1982.

– Senior Research Scientist, Group Leader, Department of Biochemistry and Autoanalysis, Central Research Laboratory of 2-nd Moscow Medical Institute, 1982–1984.

– Senior Research Scientist, Group Leader, Laboratory of Biochemistry and Autoanalysis, Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow, 1984–1990.

– Head of Laboratory “Molecular Graphics & Drug Design”, Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow, 1990–2006.

### **Last position**

– Head of Laboratory “Intermolecular interactions”, Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 2006–2017.

## **Research interests**

Protein structures, molecular interactions, drug discovery, computer molecular simulation, cytochromes P450, biological membranes, optical biosensors, proteomics, protein interactomics.

## **Honors and awards**

- “Moscow Professor” Awards (2001, 2003, 2004).
- Award from Welfare Fund for domestic medicine assistance (Medical and biologic sciences, 2001).
- Russian Government Award (Medical and biologic sciences, 2002).

## **Grants to Support Research**

- Procter&Gamble scientific grant (1990–1992).
- Janssen Foundation grants (1996–1998, 1999–2001, 2002–2004).
- INTAS grant 99-00433 (1999–2001).
- Russian Ministry of Industry and Science contracts (1999–2000, 2001–2002, 2003–2004).
- INCO-COPERNICUS grants (1999–2000, 2002–2004).
- Russian Federal Agency of Science and Innovations contracts (2007, 2008–2009).
- Russian Federal Space Agency R&D contract (2007–2009).
- ISTC (grants 3197p, 888).
- Russian Foundation for Basic Research grants (96-04-50497, 96-07-89360, 97-04-58817, 99-04-48114, 99-04-48754, 01-04-52022, 02-04-49744, 04-04-49085, 07-04-00575, 07-04-01581, 07-04-01605, 10-04-92808, 10-04-90026, 11-04-97089, 11-04-01769, 11-04-01179, 11-04-01163, 12-04-01836, 13-04-01700, 13-04-40109-H, 14-04-91337, 16-54-00097, 16-04-00057).
- Russian Science Foundation grant (16-14-10327).

## **h-index**

15 (SCOPUS), 15 (Russian Science Citation Index), 14 (ResearcherID).

## **ResearcherID**

B-7090-2012

Total Articles in Publication List: 273.

# **Оптические биосенсоры Biacore на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в исследовании межмолекулярных взаимодействий**

*Иванов А. С.*

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

[alexei.ivanov@ibmc.msk.ru](mailto:alexei.ivanov@ibmc.msk.ru)

Оптические SPR биосенсоры позволяют регистрировать любые молекулярные взаимодействия в реальном времени без каких-либо меток или сопряженных процессов. Из серийных сенсограмм легко вычисляются кинетические, равновесные и термодинамические параметры взаимодействий. Поэтому SPR биосенсоры с успехом используются в разнообразных биомедицинских исследованиях:

- (1) взаимодействие в любых сочетаниях белков, пептидов, ДНК(РНК), липидов, полисахаридов и низкомолекулярных соединений;
- (2) аффинность и специфичность антител;
- (4) иммуногенность биологических лекарственных средств;
- (5) взаимодействие прототипов лекарств с белками-мишенями;
- (6) молекулярная рыбалка – аффинное выделение целевых белков из биологического материала;
- (7) анализ белков-маркеров заболеваний.

Новейшие модели Biacore T200 и S200 (GE Healthcare, США), оснащенные управляемой микрофлюидной системой и четырьмя проточными нано-кюветами (объемом 20 нл), являются «рекордсменами» по чувствительности, уровню шума, стабильности, минимальной молекулярной массе аналита и расходу биоматериалов.

В ИБМХ (Москва) успешно используются SPR биосенсоры типа Biacore как в фундаментальных, так и прикладных исследованиях, например: разработка прямого аналитического и препаративного молекулярного фишинга для исследования интерактомики белков [1–5], анализ молекулярных основ болезни Альцгеймера [6–9] и разработка метода анализа кардиомиоглобина в сыворотке крови человека [10].

1. V.G. Zgoda et al. J. Proteome Res. 2013, 12, 123-134.
2. Ivanov A.S. et al. Proteomics. 2014, 14, 2261–2274.
3. А.С. Иванов и др. Биоорганическая химия, 2016, 42(1), 18-27.
4. E.Yablokov et al. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2017, 619, 10-15.
5. P.Ershov et al. Protein Science, 2017, 26, 2458-2462.
6. S.A. Khmeleva et al. Journal of Alzheimer's Disease, 2013, 36(4), 633-636.
7. S.A. Kozin et al. Journal of the Alzheimer's Association, 2014, 10(4, Suppl.), P793.
8. A.E. Medvedev et al. Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 476-495.
9. Mezentshev Y.V. et al. J Biomol Struct Dyn. 2016 Nov;34(11):2317-2326.
10. O.V. Gnedenko et al. Analytica Chimica Acta, 2013, 759, 105–109.

# Иванов Игорь Альбертович

*Кандидат медицинских наук  
(биохимия и внутренние болезни)  
Магистр биологии (генетика)*



## **Действующие сертификаты:**

Терапия, генетика, лабораторная генетика.

## **Образование:**

2015 – Санкт-Петербургский государственный университет. «Методы геномной инженерии».

2013 – Новейшие разработки в области полногеномного секвенирования, Illumina.

2013 – НИИ Физико-химической медицины ФМБА РФ. Школа «Теория и практика современного высокопроизводительного секвенирования».

2011 – ГОУ ДПО СПб МАПО. «Лабораторная генетика». 216 часов. № 14406.

2009 – компания Applied Biosystems. Санкт-Петербург. «Секвенирование ДНК и фрагментный анализ».

2008 – ГОУ ДПО СПб МАПО. «Профессиональная переподготовка «Генетика».

2005 – ГОУ ДПО СПб МАПО. Профессиональная переподготовка «Лабораторная генетика».

2004 – Human Genome Organization (HUGO), Newcastle, Great Britain. «Mutation Detection Training Course».

2002 – Британский Совет. Английский язык. (400 час.).

1999–2001 – Санкт-Петербургский государственный университет. Магистратура по биологии (генетика).

1990–1993 – Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург. Клиническая ординатура по лабораторной диагностике.

1987–1988 – Рига, Латвия. Интернатура по лабораторному делу.

1981–1987 – Военно-медицинская академия, Ленинград. Лечебное дело.

## **Хронология профессиональной деятельности:**

С 05.2015 – начальник НИЛ (клеточных технологий) Военно-медицинской академии, Санкт-Петербург.

2013–2014 – клиника «Древо жизни».

2009–2013 – заведующий лабораторией молекулярной диагностики, специалист научно-методического отдела Санкт-Петербургского

государственного учреждения здравоохранения «Городская больница № 40 Курортного административного района», Санкт-Петербург.

2009–2015 – заместитель директора по развитию ООО «Фарма Ген», Санкт-Петербург.

2003–2010 – главный генетик Ленинградской области, заведующий лабораторией молекулярно-генетических и цитогенетических исследований ЛОГУЗ «ДКБ», Санкт-Петербург.

2002–2008 – доцент кафедры медицинской генетики ГОУ дополнительного профессионального образования «Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», Санкт-Петербург.

2002–2003 – старший научный сотрудник ГосНИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург.

2000–2002 – научный сотрудник. Биомедицинский центр ГосНИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург.

1993–2002 – начальник научно-исследовательской группы – старший научный сотрудник Военно-медицинской академии.

#### **Общества:**

– Санкт-Петербургское отделение Российского общества медицинских генетиков.

Ранее:

– ICMS (International Cellular Medicine Society).

– HUGO (Human Genome Organization).

– ESHG (European Society of Human Genetics).

#### **Публикации:**

Более 78 печатных работ.

#### **Технология Duolink – детекция, количественное определение и колокализация белков в клетке в рамках одного эксперимента**

Лекция посвящена применению технологии Duolink® для выявления межбелковых взаимодействий. Визуализация внутриклеточных белок-белковых взаимодействий является мощным современным инструментом! Duolink® основывается на технологии PLA (proximity ligation assay) и позволяет детектировать, определять количественное содержание и колокализацию белковых комплексов в цитоплазме в рамках одного эксперимента и с использованием стандартных инструментов иммунофлуоресценции.

## **Иллариошкин Сергей Николаевич**



Иллариошкин Сергей Николаевич – член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники, зам. директора по научной работе и рук. отдела исследований мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», президент Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений.

Основные труды С. Н. Иллариошкина посвящены разработке фундаментальных и прикладных проблем нейродегенеративных заболеваний и двигательных расстройств с использованием современных достижений молекулярной биологии, нейрохимии, нейрофизиологии. С. Н. Иллариошкиным описан ряд новых форм наследственных заболеваний нервной системы с картированием на хромосомах соответствующих генов, изучены молекулярные механизмы развития и клиничко-генетические корреляции при первичном паркинсонизме, торсионной дистонии, спиноцеребеллярных атаксиях, эссенциальном треморе, предложены новые биомаркеры социально значимой мультифакторной патологии нервной системы. Под его руководством ведется большой цикл исследований в области экспериментальной неврологии, включая разработку новых методов клеточной и генной терапии нейродегенеративных заболеваний.

### **Моделирование нейродегенеративных заболеваний *in vitro* с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток**

В докладе будут представлены современные возможности моделирования нейродегенеративных заболеваний *in vitro* с использованием технологий клеточного репрограммирования и геномного редактирования. На основании собственных данных и результатов других авторов будет показано, что получение и тестирование специализированных нейронов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, источником которых служат фибробласты пациентов, знаменует собой переход на качественно новый, клеточный уровень персонализированной неврологии.



## **Иоффе Александр Исаакович** **Dr. Alexander Ioffe**

### **Professional objectives**

Wide expertise in neutron scattering, neutron optics, neutron instrumentation and polarized neutron techniques.

### **Education**

Leningrad Polytechnic Institute (1975).

### **Professional Experience**

Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany.

Head of the Jülich Center for Neutron Science at Heinz-Meier-Leibnitz Centre (JCNS@MLZ).

University of Missouri, Department of Physics & Astronomy and National Institute of Standards & Technology (NIST), USA.

1997–1999 – Professor.

Berlin Neutron Scattering Center, Hahn-Meitner Institute, Berlin, Germany.

1992–1997 – Senior scientist.

Leningrad Nuclear Physics Institute of Russian Academy of Science, Neutron Research Division, Gatchina, Russia.

1977–1992 – Scientist, Senior scientist, Group Leader.

## Каганский Александр Маркович

Выпускник кафедры биофизики Санкт-Петербургского политехнического университета. Во время обучения в аспирантуре прошел стажировку в Национальном институте здоровья США, где работал со структурой упаковки геномной информации и функциями хромосом. После защиты диссертации в Санкт-Петербурге отправился в постдокторантуру в Эдинбург и начал заниматься новым направлением в науке – эпигенетикой.



В настоящее время возглавляет Центр геномной и регенеративной медицины Дальневосточного федерального университета.

### **Взаимосвязь биоразнообразия и биомедицины: натуральные экстракты против рака**

*Каганский А. М.*

*Центр геномной и регенеративной медицины, Школа биомедицины,  
Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия*

Несмотря на технологические и научные успехи последних десятилетий, по-прежнему катастрофически не хватает эффективных, доступных и безопасных лекарств для лечения основных смертельных заболеваний, таких как рак. Кроме того, резистентность заболеваний к лекарственным препаратам, как в случае инфекций, так и онкозаболеваний, становится основной проблемой мирового здравоохранения. Поэтому необходимо разрабатывать новые подходы к разработке лекарств. Сложность клеточных путей в различных тканях такова, что наиболее перспективным подходом к поиску лекарственных кандидатов является фенотипический скрининг природных соединений и их комбинаций с помощью современного мультипараметрического анализа. С другой стороны, мы теряем биоразнообразие беспрецедентными темпами, что приводит к потере известных и новых лекарственных видов и безвозвратно утрачиваем информацию о химических соединениях, которые могли быть призваны для спасения миллионов жизней.

Именно поэтому мы положили начало амбициозной, но своевременной международной инициативе: исследовать природные соединения в регионах с высоким биоразнообразием (например, Маврикий, Филиппины, Россия и т. д.), и исследовать их в масштабных экспериментах по скринингу с использованием модельных клеточных систем, разработанных для

изучения различных заболеваний (например, таких, как онкозаболевания) в ведущих мировых научных центрах.

Мы надеемся, что этот проект объединит мир для решения самых актуальных проблем нашего времени.



## **Киселев Михаил Алексеевич**

Окончил в 1977 году физический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. Доктор физико-математических наук. Диссертация «Структура и свойства липидных мембран – нейтронные и синхротронные исследования», 2011 г.

Область научных интересов: исследование структуры и свойств липидных мембран и нанолечарств на их основе методами рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей.

С 1977 г. сотрудник Лаборатории нейтронной физики (ЛНФ) Объединенного института ядерных исследований (ОИЯИ), Дубна. С 1977 по 1993 г. – начальник смены реактора ИБР-2. Участник физического и энергетического пуска реактора ИБР-2. С 1993 г. – руководитель группы, ведущий научный сотрудник.

В 1996–2000 гг. работал на синхротроне DCI, LURE, Орсе, Франция. В 2004–2010 гг. работал на фармацевтическом факультете Университета Мартина Лютера, Халле, Германия.

Руководитель проекта РФФИ 14-12-00516 «Развитие методов малоуглового рассеяния и исследование везикул и нанолечарств на нейтронных и синхротронных источниках», 2014–2018 гг.

Количество публикаций в рецензируемых журналах 84, 2 учебных пособия. Индекс Хирша публикаций равен 22.

Профессор Дубненского университета, лекции на кафедре ядерной физики по курсу «Атомная энергетика и ядерные реакторы». Доцент МГУ, лекции по спецкурсам: «Современные источники нейтронов», «Липидные наносистемы и методы их исследования». С 2003 по 2012 гг. – доцент кафедры электроники физических установок МИРЭА, лекции по курсу «Основы физики и техники ядерных реакторов».

Количество подготовленных кандидатов наук – 3. Количество подготовленных дипломников – 14.

## **Структура и свойства липидных мембран. Нейтронные и синхротронные исследования**

*Киселев М. А.*

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

Фосфолипиды являются главной компонентной липидной мембраны клетки – основы биологической мембраны. Церамиды являются главной компонентой липидной матрицы верхнего ороговевшего слоя кожи млекопитающих. По своей структуре и свойствам липидная мембрана является классическим нанообъектом. Исследования структуры и свойств липидных мембран ведутся на стыке медицины, фармакологии, биологии, физики и химии. Нобелевская премия 2013 года по физиологии и медицине (Джеймс Ротман, Рэнди Шекман, Томас Зюдхоф) присуждена за исследования внутриклеточного и межклеточного транспорта с помощью фосфолипидных наночастиц – везикул.

Современные бионанотехнологии используют фосфолипиды и церамиды как основную компоненту лекарств и косметических средств. Наночастицы на основе фосфолипидов используются как переносчики лекарств. Развитие бионанотехнологий в России требует подготовки специалистов по физическим методам диагностики наноструктуры частиц, перспективных для применения в фармакологии.

В докладе представлены современные методы применения рассеяния нейтронов и синхротронного излучения для исследования наноструктуры липидных мембран и фосфолипидных наночастиц. На конкретных примерах исследований фосфолипидных мембран и мембран на основе церамидов показаны возможности взаимодополняющего использования нейтронного и синхротронного излучения для определения структурных параметров и свойств липидных мембран.

Доклад представляет краткое содержание курса «Липидные наноструктуры и методы их исследования», читаемого автором на кафедре нейтронографии физического факультета МГУ.

1. М. А. Киселев. Методы исследования липидных наноструктур на нейтронных и синхротронных источниках. Учебное пособие. Физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, кафедра нейтронографии, Москва, 2014.



## **Кожемякина Наталья Владимировна**

*Кандидат биологических наук,  
руководитель Лаборатории  
биологических исследований ЗАО «БИОКАД»,  
доцент кафедры  
технологии рекомбинантных белков  
Санкт-Петербургской государственной  
химико-фармацевтической академии*

1999–2004 – Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy,  
Faculty of drug industrial technology: engineer-biotechnologist.

2004–2008 – Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy,  
Department of Microbiology, Postgraduate Study.

2010 – Institute of Experimental Medicine RAMS, PhD in Biology,  
Specialization: Microbiology.

### **Career experience:**

2004–2012 – Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy,  
Lecturer of the Department of microbiology

2012 – now – CJSC BIOCAD, Head of Bioassay Laboratory, Analytical  
Development Department.

2013 – now – Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy,  
Associate Professor of the Department of recombinant proteins.

### **Область научных интересов:**

Исследование биологической активности биотерапевтических  
препаратов и малых молекул *in vitro*, клеточные тесты, разработка новых  
таргетных препаратов.

## **Клеточные модели как платформа для оценки активности новых таргетных препаратов**

*Кожемякина Н. В.*

*ЗАО «БИОКАД»*

*Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия,  
Санкт-Петербург, Россия*

Исследование биологической активности является критическим параметром при подтверждении подлинности препаратов и при выборе финального кандидата в процессе разработки новых молекул. Это одна из важнейших стадий перед доклиническими и клиническими исследованиями. Тесты *in vitro* необходимы для обеспечения эффективности и безопасности продуктов. «Идеальный» биологический тест должен максимально точно моделировать действие препаратов *in vivo*, при этом быть доступным, хорошо контролируемым и точным. Этим условиям соответствуют клеточные тесты, которые являются чувствительной и удобной экспериментальной моделью для исследования препаратов. Для новых биологических молекул эти тесты позволяют выбрать и охарактеризовать новые кандидаты по целому ряду параметров, в том числе по функциональной активности. Для малых химических молекул помимо биологической активности с помощью клеточных тестов оценивают ADMET свойства, в том числе проницаемость биологических мембран и токсичность. Несмотря на очевидные достоинства, одним из главных недостатков биологических тестов является высокая вариабельность, присущая любой живой системе. Ошибка метода может достигать 20 %. Справиться с этой проблемой, повысить точность анализа, и, соответственно, снизить вероятность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов, позволяет роботизация клеточных методов. Это достаточно нетривиальная задача. Но именно использование роботизированных станций позволяет проводить скрининги большого количества кандидатов для наработки необходимой статистики и выбора финального кандидата в максимально сжатые сроки.



## **Костарева Анна Александровна**

В 1993–1999 годах обучалась в СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова на лечебном факультете.

1999–2002 – интернатура, а затем ординатура на кафедре факультетской терапии с курсом эндокринологии и гематологии по специальности «терапия».

2002–2005 – очная аспирантура на кафедре факультетской терапии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.

2001–2007 – Postgraduate study (аспирантура) в Каролинском медицинском институте Стокгольма, Швеция (Karolinska Institutet, Stockholm).

В 2006 году защитила степень «кандидат медицинских наук» на кафедре факультетской терапии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Тема диссертационного исследования «Роль десмина в развитии кардиомиопатий и миопатий», по специальности кардиология.

В 2007 году защитила международной степени PhD в Каролинском медицинском институте Стокгольма, Швеция (Karolinska Institutet, Stockholm). Тема диссертационного исследования “Genetic and pathophysiological study of desmin derangements in cardiac disorders”.

2007–2009 – заведующая научно-исследовательской лабораторией молекулярной кардиологии «Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова»

С 2009 г. – директор Института молекулярной биологии и генетики Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова.

С 2007 г. – научный сотрудник лаборатории миопатий и кардиомиопатий Департамента материнства и детства Каролинского медицинского института. (Visiting Scientist, Myopathy and Cardiomyopathy Group, Dep. of Woman and Child Health, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.)

## **Генетические исследования в современной кардиологии: от редкого диагноза к молекулярным событиям**

*Костарева А. А.*

*Институт молекулярной биологии и генетики Федерального центра сердца,  
крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия*

В настоящее время определение генетических дефектов, лежащих в основе развития кардиомиопатий внедряется в клиническую практику с целью генетического консультирования, пренатальной диагностики и ранней постановки диагноза бессимптомным носителям мутаций. Однако, использование данных генетического анализа в клинической практике все еще является ограниченным и не позволяет широко внедрять подходы персонализированной терапии. В настоящее время в научную и клиническую практику внедряется секвенирование нового поколения, которое позволяет одновременно скринировать сотни генов и идентифицировать множество причинных мутаций. Это приводит к появлению новых данных о комплексном взаимодействии нескольких мутаций и суммации их эффекта в патогенезе повреждения миокарда.

В докладе будут обсуждаться алгоритмы и доказательная база применения генотипирования при полигенных заболеваниях сердечно-сосудистой системы, место данных исследования в рутинной клинической практике и научных исследованиях.

## **Котелевцев Юрий Васильевич**

Юрий Васильевич Котелевцев окончил биологический факультет МГУ в 1978 году. Вскоре после защиты кандидатской диссертации в Институте биоорганической химии АН СССР перешел на работу во Всесоюзный Кардиологический центр где занимался изучением молекулярно-генетических и клеточных механизмов сердечно-сосудистых заболеваний в лаборатории профессора Ю. В. Постнова. Во время работы в Коллеж де Франс в 1990–1992 он обнаружил генетическое сцепление гипертонической болезни человека с геном ангиотензиногена. С 1992 по 2014 год проводил исследования в Эдинбургском университете, где создал несколько трансгенных мышинных моделей, которые не только



способствовали пониманию гормонозависимой гипертензии и метаболического синдрома, но и привели к развитию новых препаратов для лечения сахарного диабета 2 типа, основанных на ингибировании фермента 11  $\beta$  HSD1.

С 2014 года работает в Центре функциональной геномики Сколтеха, Москва. Его научные интересы лежат в области атеросклероза, метаболического синдрома и гипертензии. К научным интересам добавились новые клеточные и генно-инженерные подходы к лечению заболеваний печени.

### **Разработка новых клеточных и генно-инженерных подходов к лечению заболеваний печени**

*Котелевцев Ю. В.*

*Центр трансляционной биомедицины  
Сколковского института науки и технологии, Сколково, Россия*

Болезнями печени страдают 30 % населения развитых стран. Лечение поздних стадий заболеваний доступными лекарственными средствами часто бывает неэффективным. В последние годы происходит стремительный прогресс в разработке принципиально новых лекарственных средств и терапевтических подходов к лечению заболеваний печени. Использование РНК интерференции не только позволяет характеризовать новые мишени для лекарственной терапии, но и активно вмешиваться в течение заболевания. Лекарственные средства, действующие по принципу интерферирующих РНК, специфически блокирует экспрессию определенных генов, что приводит к положительным терапевтическим эффектам. Доставка компонентов CRISPR/Cas9 системы позволяет корректировать болезнетворные генетические мутации. Введение генетических маркеров позволяет выделить стволовые клетки печени и использовать их для усиления процессов регенерации. Фармацевтические компании высоко оценивают перспективы этих подходов и начинают вкладывать большие средства в их разработку и клинические испытания, что является залогом быстрого внедрения их в медицинскую практику.

## **Красикова Раиса Николаевна**



Красикова Раиса Николаевна окончила с отличием химический факультет Ленинградского государственного университета по специальности «Химия». В течение всей научной карьеры ее интересы связаны с радиохимией. Начиная с прикладных работ по анализу радионуклидов в водах второго контура атомных реакторов в заводской лаборатории, Красикова Р. Н. успешно работала в университетской науке, посвятив более 10 лет исследованиям в области классической радиохимии. В 1988 году Красикова Р. Н. защитила канд. диссертацию по специальности «Радиохимия» о получении новых валентных состояниях типично радиоактивного элемента – радона.

С 1991 г., с момента создания первого в России Центра позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) в Институте мозга человека РАН, Санкт-Петербург, Красикова Р. Н. работает в уникальной для России области – ПЭТ-радиохимии. Область научных интересов разработка методов синтеза различных классов радиофармпрепаратов (РФП) для ПЭТ – природных метаболитов, фторированных аналогов аминокислот, меченых лекарственных препаратов. Наиболее значимые результаты получены в области асимметрического синтеза аминокислот, меченных фтором-18, с использованием как классического стехиометрического подхода, так и межфазного хирального катализа, а также методов получения рецепторных радиолигандов (флюмазенил, меченый углеродом-11 и фтором-18 для ПЭТ диагностики эпилепсии; 18F-FER1 для визуализации дофаминовых транспортеров при болезни Паркинсона, 11C-ТНК 5351, для визуализации тау-протеина при болезни Альцгеймера и др.).

С 2000 г. возглавляет Лабораторию радиохимии ИМЧ РАН; в 2007 г. получила Европейский сертификат радиофармацевта, что крайне важно для работы в области ядерной медицины. Красиковой Р. Н. в соавторстве опубликовано более 160 научных работ и тезисов докладов, из них более 65 статей в реферируемых журналах.

С 2012 г. Красикова Р. Н. является доцентом кафедры радиохимии Института химии СПбГУ, где ею разработаны авторские курсы для специалистов, бакалавров и магистров «Методы получения радиофармпрепаратов на основе циклотронных и генераторных радионуклидов для использования в радионуклидной диагностике» и «Методы синтеза радиофармпрепаратов для ядерной медицины».

## Методы ядерной медицины в клинической диагностике и радиотерапии онкологических заболеваний

*Красикова Р. Н.*

*Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия  
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

[raisa@ihb.spb.ru](mailto:raisa@ihb.spb.ru)

В последние годы методы медицинской визуализации с использованием радиоактивных изотопов, в частности, позитронная эмиссионная томография (ПЭТ), широко применяются в клинической диагностике, а именно, при визуализации различных процессов, ассоциирующихся со злокачественностью опухолей (гликолиза, транспорта аминокислот, пролиферации, апоптоза и ангиогенеза, уровня гипоксии, экспрессии определенного типа рецепторов и др.). Роль метода ПЭТ существенно возросла в связи с внедрением принципиально новых схем лечения опухолей с использованием лучевой терапии и химиотерапии, где проблема мониторинга лечения приобретает особенную актуальность. Так, в случае глиальных опухолей мозга очаговые лучевые повреждения при использовании традиционного метода структурной МРТ неотличимы от продолженного роста опухоли, однако, визуализируются методом ПЭТ с использованием радиофармпрепаратов (РФП) класса аминокислот (L- $^{11}\text{C}$ -метионин, 6-L-[ $^{18}\text{F}$ ]ФДОФА). Наряду с традиционными короткоживущими циклотронными радионуклидами ( $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{11}\text{C}$  и  $^{18}\text{F}$ ), в ПЭТ все чаще применяют изотопы металлов ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ). Соответствующие РФП не участвуют в клеточном метаболизме, но связываются с мишенью за счет взаимодействий молекулы вектора с рецепторами, экспрессируемыми на поверхности опухоли. ПЭТ исследование позволяет четко визуализировать мишень, планировать тактику лечения методами пептид-рецепторной радиотерапии и радиоиммунотерапии, где в качестве терапевтических радионуклидов выступают  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  и др. Использование пар радионуклидов – диагностического и терапевтического – в рамках концепции тераностики является наиболее эффективным методом лечения онкологических заболеваний (персонализированная медицина). В идеальном случае используют РФП с изотопами одного и того же элемента, например,  $^{44}\text{Sc}/^{47}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$ ,  $^{124}\text{I}/^{123}\text{I}$ ,  $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$ . На основании данных ПЭТ можно рассчитать оптимальную вводимую дозу терапевтического РФП, минимизируя дозовую нагрузку на органы и ткани пациента. У  $^{68}\text{Ga}$ , наиболее доступного генераторного ПЭТ радионуклида, нет «терапевтической пары», но РФП на его основе используются для оценки дозовой нагрузки при радиотерапии соединениями  $^{177}\text{Lu}$ , радионуклида с минимальным (2 мм) пробегом  $\beta^-$  частиц в ткани, а также двух других

трехвалентных металлов ( $^{90}\text{Y}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ). Наиболее эффективными для радиотерапии являются альфа-эмиттеры в составе РФП на основе моноклональных антител или пептидов, тропных к раковым клеткам. Однако, применение важнейшего из них  $^{225}\text{Ac}$ , и, соответственно, генераторного  $^{213}\text{Bi}$  ( $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ ) ограничено труднодоступностью  $^{233}\text{U}$  (исходного радионуклидного сырья для выделения  $^{225}\text{Ac}$ ) в связи с требованиями о нераспространении делящихся материалов. Получение  $^{225}\text{Ac}$ , а также  $^{223}\text{Ra}$ , агента для паллиативной терапии, на ускорителях протонов высоких энергий, является крайне дорогостоящим и требует сложной технологии разделения смеси изотопов.

## Лебедев Игорь Николаевич

*Доктор биологических наук, профессор РАН,  
заместитель директора по научной работе  
НИИ медицинской генетики  
Томского национального исследовательского  
медицинского центра РАН,  
руководитель Лаборатории цитогенетики*



Родился в 1974 г. С отличием закончил в 1998 году магистратуру биолого-почвенного факультета Томского государственного университета. С 1998 по 2001 год проходил обучение в аспирантуре НИИ медицинской генетики. С 2001 года являлся научным сотрудником лаборатории цитогенетики, а с 2005 года стал ее руководителем. В 2001 году защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а в 2008 году – диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности «генетика». С 2015 года является заместителем директора по научной работе. В 2016 году избран профессором РАН.

### Область научных интересов

Основные научные работы посвящены исследованию вопросов цитогенетики и эпигенетики индивидуального развития человека, механизмов формирования хромосомных мутаций и установлению их роли в развитии наследственных заболеваний, разработке и внедрению в практику здравоохранения методов молекулярно-цитогенетической диагностики хромосомной патологии.

Автор и соавтор более 400 печатных трудов, в том числе – двух изданий «Национального руководства: Наследственные болезни» (М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012, 2017), серии монографий «Регенеративная биология и

медицина» (Омск – Москва – Томск, 2012, 2015, 2017), «Цитогенетические последствия радиационных и химических воздействий на человека» (Томск, 2014), «Плоскоклеточный рак головы и шеи: Молекулярные основы патогенеза» (М.: Наука, 2016), “Aneuploidy” (Karger, 2011), “Epigenetics and Epigenomics” (InTech, 2014), “Genetic information in practice” (Zagreb.: Medicinska Naklada, 2016).

Научный руководитель 7 подготовленных кандидатов наук.

## **Архитектура генома и хромосомные болезни**

*Лебедев И. Н.*

*Научно-исследовательский институт медицинской генетики,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия*

Современные тенденции в развитии молекулярных технологий анализа генома применительно к хромосомным заболеваниям привели к существенному развитию представлений о многообразии, этиологии и патогенезе этой группы наследственной патологии. Высокора разрешающее молекулярное кариотипирование открыло новый вид хромосомного полиморфизма – изменчивость по числу копий крупных блоков повторов ДНК (Copy Number Variations, CNV), клиническое значение которого остается предметом дискуссий на протяжении последних полутора десятилетий. Господствующее представление о том, что CNV, ассоциированные с хромосомными заболеваниями, могут быть ограничены только микроделециями постепенно трансформируется в открытие новых микродупликационных синдромов, а также клинически значимых хромосомных амплификаций более высокого порядка – трипликаций и квадрипликаций. Описаны новые механизмы генерации таких CNV, связанные как с эволюционными особенностями организации генома человека (блоки сегментных дупликаций), так и с процессами репарации и репликации ДНК, в том числе и в герминативной линии в ряду поколений. Появился новый класс реципрокных микроделеционных и микродупликационных синдромов (“genomic sister-disorders”), объединяющий CNV-ассоциированные хромосомные заболевания, связанные с полярными изменениями копийности одного и того же хромосомного региона. Число уже известных таких хромосомных регионов составляет свыше 60 и продолжает регулярно увеличиваться. Системный взгляд на природу реципрокных синдромов позволяет, в свою очередь, приблизиться к более четкому обозначению клинически значимых гено-фенотипических корреляций.

Другим итогом применения высокоразрешающего генотипирования в цитогенетике явилось радикальное сужение размеров детектируемых хромосомных аномалий, которые могут затрагивать отдельные гены или

даже их фрагменты. Намечается расщепление некоторых классических смежных генных синдромов на так называемые «моногенные» хромосомные заболевания (“single gene chromosomal disorders”), позволяющие выделить отдельные гены, лежащие в основе формирования того или иного фенотипического признака. Вместе с тем, несмотря на кажущееся стирание физических границ между моногенными и хромосомными мутациями, последние демонстрируют особенности своего фенотипического проявления, сохраняя характерную для хромосомных заболеваний множественность поражений различных систем органов. Предполагается, что одной из причин такого выраженного плейотропного эффекта «моногенных» хромосомных мутаций могут являться повреждения трехмерной организации хромосомного материала, а именно нарушения регуляторных топологических ассоциированных доменов, возникающих при хромосомных перестройках.

Наконец еще одним вызовом в понимании природы хромосомного дисбаланса является тканеспецифичность его эффектов. Перспективы в преодолении данного барьера, безусловно, связаны с развитием технологий клеточного репрограммирования, направленной клеточной и тканевой дифференцировки, позволяющими приблизиться к расшифровке молекулярных и клеточных механизмов патогенеза хромосомных заболеваний. В частности, в проведенных нами исследованиях для впервые описанных реципрокных «моногенных» микроделеций и микродупликаций 3p26.3 (Kashevarova et al., Mol. Cytogenet. 2014), затрагивающих единственный ген *CNTN6*, ответственный за формирование межклеточных контактов при развитии определенных слоев коры больших полушарий, в нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с умственной отсталостью, было продемонстрировано существенное снижение уровня экспрессии гена *in vitro*, несмотря на увеличение его копийности при хромосомной микродупликации (Gridina et al., Mol. Neurobiol. 2018). Такой эффект может объяснить сходство некоторых фенотипических признаков, регистрируемых у пациентов с реципрокными изменениями в числе копий участков хромосом.

Исследование поддержано грантом РНФ № 14-15-00772.



## **Мясников Александр Геннадьевич**

### **Education**

1995–2000 – Studies at Udmurt State University (Izhevsk, Russia), sub-faculty of Biochemistry of the Medical Biotechnology Faculty; specialization: Biochemistry.

2001–2003 – Studying cryo-electron microscopy and image processing methods under supervision of Prof Marin van Heel, Imperial College London, Department of Biochemistry, London, United Kingdom.

2000–2004 – Dissertation research at Belozersky Institute, Biochemistry Department, Moscow State University, Moscow; supervisor Prof. A. A. Bogdanov.

2004–2010 – Postdoctoral position at the Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology, Department of Structural Biology and Genomics; group of B. Klaholz.

### **Research experience**

2016 – present – Cryo-EM specialist, Full Specialist IV in UCSF Mission Bay, Department of Biochemistry and Biophysics, Mission Bay Campus, 600 16th Street, San Francisco, CA, 94158.

2015–2016 – CR1 position (Senior Staff Scientist, permanent researcher CR1) in CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), Department of Structural Biology and Genomics, Illkirch, France.

2010–2015 – CR2 position (Staff Scientist, permanent researcher) in CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), Department of Structural Biology and Genomics, Illkirch, France.

2004–2010 – postdoctoral research: dissection of the structure and function of the reaction intermediates during translation initiation using high-resolution cryo-electron microscopy, image processing and 3D reconstruction.

2000–2004 – dissertation research at Belozersky Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; title: “Investigation of functional complexes of the ribosome by cryo-electron microscopy”.

2001–2003 – Studying cryo-electron microscopy and image processing methods under supervision of Prof Marin van Heel, Imperial College London, Department of Biochemistry, London, United Kingdom.

1999–2000 – training in Molecular Biology at the Pushchino Branch of the Moscow State University and research training at the Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences (Pushchino, Russia).

## Methods

Negative staining of the biological samples.  
Freezing of biological sample (Vitrobot Mark III, IV).  
Optimization of freezing conditions.  
Tomography of room temperature and tomography of cryo samples.  
Single particles reconstruction of negatively stained and cryo samples (SPA).  
High resolution SPA and data interpretation.  
Data collection using Volta Phase Plate.  
Support and maintenance of high-performance computing systems.

## Software

Software for data collection: Inspect3D, SerialEM, EPU, BatchTomo.  
Single particle analysis: Imagic, Xmipp, EMAN1,2, Scipion, Spider, Relion.  
CryoSPARC, FREALIGN, IMOD.  
Visualization: Chimera, PyMol.  
Model building: Coot, Phenix.

## Microscopes

|                                                                                   |                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| T12 (FEI)                                                                         | T20 (FEI)                                |
| F20 (FEI)                                                                         | Polaris (F30) (FEI)                      |
| Arctica (FEI)                                                                     | Titan Krios with GIF and K2 camera (FEI) |
| Titan Krios with Cs corrector with and without GIF and with and without K2 (FEI). |                                          |

## **Криоэлектронная микроскопия: последние достижения и перспективы развития**

*Мясников А. Г.*

*Калифорнийский университет в Сан-Франциско, Сан-Франциско, США*

Структурная биология переживает очередной этап своего бурного развития. И этот этап напрямую связан с развитием метода криоэлектронной микроскопии (Крио-ЭМ). На сегодня данный метод позволяет получать структуры биологических комплексов с разрешением 3 Å и выше. Важно отметить, что сами молекулы остаются в нативной конформации и, что особенно важно, сохраняют свою природную подвижность. Более того, метод позволяет разделить все активные и неактивные конформации макромолекулярного комплекса, что позволяет выявлять детали молекулярного механизма функционирования комплекса. На данном этапе структуры высокого разрешения начинают использоваться для моделирования новых высокоспецифичных ингибиторов (антибиотиков и других терапевтических препаратов).



## Орлов Юрий Николаевич

После окончания кафедры биофизики Ленинградского политехнического института в 1979 году, Юрий Николаевич Орлов по сей день работает в НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, в Лаборатории биополимеров. Область его научных интересов связана с исследованием структуры и функций биологических мембран, с функционированием интегральных мембранных белков, и в особенности с молекулярными механизмами транспорта метаболитов через биологические мембраны. В 2002 году защитил докторскую диссертацию «Новые подходы в изучении структурной и функциональной организации систем анионного транспорта в биологических мембранах». Имеет 50 публикаций в рецензируемых журналах. С 2000 года читает лекции на кафедре биофизики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого; с 2006 по 2013 годы заведовал этой кафедрой. В качестве приглашенного профессора читал краткий лекционный курс по механизмам транспорта органических анионов в почечных канальцах в Гёттингенском университете (Германия).

В последние годы научные интересы Орлова Ю. Н. изменились и теперь связаны с молекулярными механизмами управления клеточными процессами (везикулярный транспорт, клеточная сигнализация), в особенности с вкладом липидов и мембран в эти механизмы, чему и будет посвящена его лекция на школе.

### **Примембранные механизмы управления клеточными процессами (сигнализация и везикулярный транспорт)**

*Орлов Ю. Н.*

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

Большинство клеточных функций осуществляется с помощью белковых комплексов, или ансамблей. По разным оценкам в клетках дрожжей функционирует около 800 белковых комплексов, а в клетках человека их число превышает 3000. Эти комплексы обеспечивают практически весь спектр клеточных функций, включая клеточный метаболизм его контроль и управление, и поэтому не удивительно, что структурные основы белок-белковых взаимодействий в комплексах могут носить разный характер.

В лекции будут рассмотрены молекулярные события, которые характерны для белковых комплексов, управляющих сигнализацией и везикулярным транспортом. Такие комплексы локализованных вблизи поверхности клеточных мембран, и поэтому мы будем называть их примембранными в том смысле, что они либо прямо, либо опосредовано, зависят от структуры мембранной поверхности.

Известно, что многие цитозольные белки способны связываться с мембранами посредством зарядных и гидрофобных взаимодействий. Среди них особый интерес представляют, так называемые, амфитропные белки, активность которых зависит от локализации: они активны, если связаны с мембраной, и не активны, если находятся в цитозоле. Эта особенность амфитропных белков указывает на то, что их взаимодействие с мембраной является важным фактором для протекания клеточных процессов и, следовательно, должно быть специфичным.

Действительно, давно замечено, что амфитропные белки вовлечены в управление везикулярным транспортом и клеточной сигнализацией. Точное регулирование этих процессов, очевидно, возможно только в том случае, если внутриклеточные мембраны обладают «уникальным кодом», который может «читаться» амфитропными белками. Исследования, ведущиеся сегодня в этом направлении, охватывают широкий круг вопросов, связанных не только со структурой мембран и амфитропных белков, но и с метаболизмом липидов в мембранах. И хотя многие вопросы остаются пока не выясненными, считается, что примембранные механизмы, управляющие клеточными процессами, включают два фактора – бислойную липидную асимметрию и липид-специфичные белковые модули (домены).



## **Паевский Алексей Сергеевич**

Алексей Паевский – научный и медицинский журналист, научно-популярный блогер, лектор и популяризатор науки. В профессии 12 лет, автор нескольких тысяч научно-популярных статей и новостных заметках в ведущих научно-популярных изданиях России и не только – Газета.Ру, Лента.Ру, Discovery, «Кот Шредингера», «Вокруг света», «Наука и жизнь», «Химия и жизнь», «Элементы», казахстанского, новозеландского, австралийского и южнокорейского издания OYLA. Был редактором портала Минздрава России takzdorovo.ru, удостоенного национальной премии Рунета. В настоящее время – почетный редактор журнала «За науку» МФТИ, главный редактор портала Neuronovosti.Ru и научный редактор портала Indicator.Ru и хабаровского популярного издания «Бутылка Клейна». Лауреат премии «ЗАРЯ» (Звезда астрорунета и я)). В составе редакции газеты «Троицкий вариант» был лауреатом премии Александра Беляева и премии Минобра «За верность науке». Соавтор двух популярных блогов, блога научных журналистов Scienceblogger и блога медицинской истории Med\_history (вместе с Анной Хоружей).

### **Небо становится ближе: исследование Солнечной системы космическими аппаратами**

То, о чем еще полвека назад писали фантасты, становится реальностью. Сесть на комету? Привезти частичку астероида на Землю? Сфотографировать на Луне советские «Луноходы»? Увидеть вблизи Плутон? Выйти за пределы Солнечной системы? Всё это происходит прямо сейчас или произойдёт в ближайшие месяцы. Обо всех этих событиях рассказывает, а, главное, показывает научный журналист, главный редактор портала Neuronovosti.Ru, научный редактор портала Indicator.Ru Алексей Паевский.

# Старунов Виктор Вячеславович

## Секвенирование генома *Cristatella mucedo*, опыт использования секвенатора MinION

*Старунов В. В.<sup>1</sup>, Предеус А. В.<sup>2</sup>*

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

<sup>2</sup> Институт биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия

[starunov@gmail.com](mailto:starunov@gmail.com)

Пресноводная мшанка *Cristatella mucedo* – удобный для содержания и работы в лаборатории колониальный организм из широко-распространенного, но малоизученного типа Bryozoa. Колонии мшанок состоят из модулей-зооидов, каждый из которых имеет свой мозг, пищеварительную систему, ловчий аппарат. Пресноводные мшанки (Phylactolaemata) – одни из древнейших представителей своего типа, распространенные повсеместно кроме полярных регионов. В отличие от других представителей мшанок, колонии *C. mucedo* прозрачны и не имеют скелета, что облегчает экспериментальную работу. Кроме того, колонии *C. mucedo* способны к активному направленному ползанию, что является уникальным случаем для колониальных беспозвоночных. Эти особенности строения и биологии делают *C. mucedo* одним из перспективных модельных объектов. Расшифровка генома *C. mucedo* поможет приблизиться к пониманию процессов интеграции отдельных зооидов в единый колониальный организм.

По предварительным оценкам, размер генома *C. mucedo* составляет от 500 до 850 Mb. Нами было проведено полногеномное секвенирование при помощи длинных и коротких прочтений. Длинные прочтения (среднее покрытие 18x) были получены при помощи секвенатора 3-го поколения MinION (Oxford Nanopore); короткие прочтения (среднее покрытие 20x) были получены на секвенаторе Illumina MiSeq. Выделение геномной ДНК проводили с использованием специальных протоколов, позволяющих выделить длинную геномную ДНК. Полученные данные были ассемблированы с использованием программ Canu, и ABruijn, с последующей полировкой при помощи Nanopolish (с использованием сигнала Oxford Nanopore) и Pilon (используя прочтения Illumina). Значения N50 для полученных сборок колебались в интервалах 1,1–1,3 Mb; оценка качества сборки при помощи BUSCO позволила обнаружить более 90 % генов из набора “core metazoan”. Таким образом, мы продемонстрировали, что гибридная сборка при помощи длинных и коротких прочтений является эффективным и экономичным методом сборки эукариотических геномов.



## **Финкельштейн Алексей Витальевич**

Алексей Витальевич Финкельштейн родился 06/16/1947 в Харькове (Украина, СССР). В 1970 г. он с отличием окончил МФТИ. К. ф.-м. н. (МФТИ, специальность «биофизика») с 1976 г., д. ф.-м. н. с 1991 г. (МГУ, специальность «биофизика»), профессор – с 1997 года.

С 1970 г. – член Лаборатории физики белка (основанной и до 1999 г., возглавлявшейся проф. О. Б. Птицыным) в Института белка РАН. Аспирант (до 1974), младший (1974–1980), старший (1980–1996), ведущий (1996–1999), главный (с 1999) научный сотрудник. С 1999 г. заведует Лабораторией физики белка Института белка РАН.

Профессор МГУ (с 1998). Профессор Пушинского университета (1993–1998). Доцент МФТИ (1991–1995). Профессор-визитер Университета Пари-Зюд и Нью-Йоркского университета (1993–94). Соросовский профессор (2001).

Автор более 250 научных работ, в том числе книг «Физика белковых молекул» (2014) и (в соавторстве с О. Б. Птицыным) «Физика белка. Курс лекций» (вышедшей – в 2002–2016 гг. – восемью изданиями: 4-мя на русском, 2-мя на английском и 2-мя на китайском языках).

Индекс цитирования по Google Scholar: около 8000; индекс Хирша: 43.

Основные направления исследований: физика белка, физическая теория белковых структур, самоорганизации и дизайна белков, термодинамика и кинетика кооперативных переходов в белках и амилоидах, молекулярная физика, силовые молекулярные поля, молекулярная биология, биоинформатика.

А. В. Финкельштейн руководил и руководит многими научными проектами, поддержанных грантами Президиума РАН, РФФИ, INTAS, NWO, HHMI, РФФИ и т.д. Он преподавал курс физики белка в МФТИ и в Пушинском университете, преподает его в МГУ и в Пушинском филиале МГУ. Был организатором и участником многих международных и российских научных школ и конференций. Под его руководством выполнено множество дипломных работ и около десятка диссертаций.

Он – член ряда научных обществ, в т.ч. Биохимического Общества России, AAAS, ACS, FASEB. Член редколлегии ряда журналов, в т.ч. «Молекулярная биология», “Journal of Computational Biology”, “Chemistry Central Journal”, “Biomolecules”, “Peer Journal”, “The Open Bioinformatics Journal”.

А. В. Финкельштейн награжден Гос. Премией РФ (1999); получал награды FIRCA, CASP, Грант Москвы и т.д.

Член-корреспондент Российской академии наук (с 2008 г.).

**50+ лет самоорганизации:  
два ракурса проблемы сворачивания белка**

*Финкельштейн А. В.*

*Институт белка РАН, Пущино, Россия*

[afinkel@vega.protres.ru](mailto:afinkel@vega.protres.ru)

Способность белков спонтанно формировать свои пространственные структуры – давняя загадка молекулярной биологии. Экспериментально измеренные скорости спонтанного сворачивания однодоменных глобулярных белков лежат в диапазоне от микросекунд до часов [1]: разница – 10-11 порядков величины – та же, что между продолжительностью жизни комара и возрастом Вселенной.

В этом докладе описаны физические теории оценки времени преодоления свободно-энергетического барьера, разделяющего глобулярные нативные (N) и развернутые (U) состояния белковых цепей, – преодоления как в направлении «от U к N» [1–3], так и «от N к U» [3–5].

Важную роль в теории играет точка термодинамического (и кинетического) равновесия между нативным и развернутым состоянием цепи: здесь теория получает простейший вид. Как ни парадоксально, теоретическую оценку времени сворачивания (перехода «от U к N») легче получить из анализа разворачивания белка (перехода «от N к U») – потому что легче наметить хороший путь разворачивания любой структуры, чем хороший путь, ведущий к стабильной укладке, которая пока неизвестна самой белковой цепи. А так как скорости прямых и обратных реакций равны в точке равновесия (что следует из физического принципа детального равновесия), то, найдя время перехода «от N к U», легко найти и время сворачивания (перехода «от U к N») – в хорошем согласии с опытом.

Комплементарный (к теории скоростей переходов) анализ числа укладок цепи, который нужно, идя «от U к N», просканировать – на уровне формирования и упаковки вторичных структур – в поисках наиболее стабильной структуры белка, очерчивает верхний предел времен сворачивания и приводит к аналогичным, хотя и менее точным результатам.

Показано, что обе теории (базирующиеся как «от N к U», так и «от U к N» переходах) хорошо очерчивают наблюдаемый диапазон скоростей сворачивания однодоменных глобулярных белков. Кроме того, они предсказывают максимальный размер белковых доменов, складывающихся под термодинамическим (а не кинетическим) контролем, и объясняют наблюдаемый максимальный размер самоорганизующихся белковых доменов.

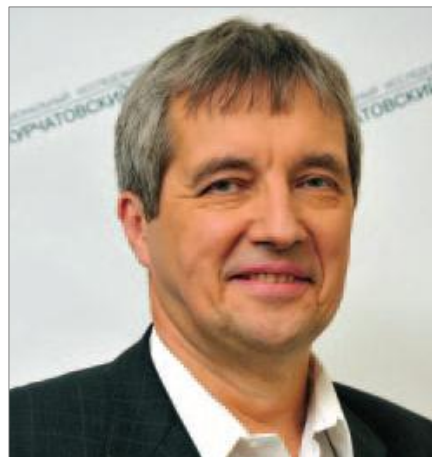
Первая часть этой работы (исследование переходов «от N к U») была поддержана грантами Медицинского института Говарда Хьюза (США), РФФИ и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума

РАН, а ее вторая часть (исследование переходов «от U к N») – грантом № 14-24-00157 Российского научного фонда.

1. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка. 4-е дополненное издание. Москва: Книжный Дом Университет, 2012, 524 с.
2. Garbuzynskiy S.O., Ivankov D.N., Bogatyreva N.S., Finkelstein A.V. Golden triangle for folding rates of globular proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2013, 110, 147–150.
3. Finkelstein A.V., Badretdin A.J., Galzitskaya O.V., Ivankov D.N., Bogatyreva N.S., Garbuzynskiy S.O. There and back again: Two views on the protein folding puzzle. *Phys. Life Rev.*, 2017, 21, 56–71.
4. Finkelstein A.V., Garbuzynskiy S.O. Reduction of the search space for the folding of proteins at the level of formation and assembly of secondary structures: A new view on the solution of Levinthal's paradox. *ChemPhysChem*, 2015, 16, 3375–3378.
5. Finkelstein A.V. Some additional remarks to the solution of the protein folding puzzle: Reply to comments on “There and back again: Two views on the protein folding puzzle”. *Phys. Life Rev.*, 2017, 21, 77–79.

## Чвалун Сергей Николаевич

Чвалун С. Н. – заместитель директора Комплекса НИЦ «Курчатовский институт» (Москва), доктор химических наук, профессор, лауреат премии им. Е. С. Федорова РАН, известный специалист в области физической химии высокомолекулярных соединений.



Научные интересы Сергея Николаевича лежат в области физики и химии высокомолекулярных соединений, бионанотехнологий и наноматериалов. Основное направление работ – установление взаимосвязи между химическим строением, надмолекулярной организацией и физико-химическими характеристиками полимеров и композиционных наноматериалов, что позволило разработать методы управления их структурой и свойствами. Он автор более 240 статей в рецензируемых научных изданиях, 5 глав в монографиях и 31 патента. Является заведующим кафедрой химии и технологии высокомолекулярных соединений МТУ МИТХТ и профессором МФТИ.

### Функциональные полимерные материалы

*Чвалун С. Н.*

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

В докладе будут рассмотрены основные тенденции перспективного развития науки и технологии в области композиционных материалов и будут показаны отличия современных наноконпозиционных материалов от традиционных композитов. Представлены методы получения, основные свойства и возможные области применения наноконпозитов на основе различных керамик, полимеров и олигомеров. Обсуждается новый класс перспективных с практической точки зрения слоистых керамических/полимерных наноконпозитов. Значительное внимание уделяется методам получения и необычным физическим свойствам металл-полупроводниковых/полимерных наноконпозиционных материалов. Комплекс этих свойств определяется квантово-размерным и кулоновским эффектами в наночастицах и зависит от химической природы частиц, их размера и формы, расстояния между ними, распределения по размерам и упорядоченности (сверхструктуры). Полимерные наноконпозиты привлекают внимание из-за возможности стабилизации в полимерных матрицах разнообразных наночастиц. Применение в качестве матрицы

полимеров с различными диэлектрическими и полупроводниковыми свойствами также позволяет целенаправленно варьировать параметры композитов. В связи с этим важнейшей задачей является изучение процессов структурообразования наночастиц в полимерной матрице.

Для исследования строения гибридных нанокомпозитов необходимо использование современных экспериментальных методов: рентгеновской дифракции в больших и малых углах, дифракции в скользящих углах (GIXD) и методов EXAFS с помощью синхротронного излучения, электронной микроскопии, атомной силовой микроскопии (новые электрофизические моды, позволяющие исследовать локальные характеристики), УФ-спектроскопии и рентгеновской флуоресценции. С помощью этих методов можно проанализировать химический и фазовый состав наночастиц (в случае кристаллического состояния – тип кристаллической решетки), размер наночастиц и функция их распределения по размерам, расстояние между наночастицами, форма наночастиц, фрактальная размерность нанокомпозитов, шероховатость и фрактальные характеристики поверхности тонких пленок нанокомпозитов.

# **Страницы спонсоров**





**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

**LEXOGEN**  
Enabling complete transcriptome sequencing



**GILSON**

**Нанопоровые секвенаторы Oxford Nanopore** – прямое, быстрое, онлайн секвенирование оцДНК, дцДНК, РНК. Портативный секвенатор **MinION** – одна проточная ячейка, до 512 нанопоровых каналов, простая пробоподготовка за 10 мин; **GridION** – 5 проточных ячеек в одном приборе.



**Высокопроизводительные секвенаторы Ion GeneStudio S5/S5 Plus** – простейшая процедура таргетного секвенирования, высокая скорость и экономичность; от небольших панелей генов или бактериальных геномов до экзомов и транскриптомов; производительность – до 50 Гб.

**Новый капиллярный секвенатор SeqStudio, Applied Biosystems** – золотой стандарт секвенирования по Сэнгеру; 4 капилляра в удобном картридже со встроенной помпой, полимером и контейнером с анодным буфером; запуск прибора за считанные минуты; самая привлекательная цена среди капиллярников.



**Система для создания нанокпель Nadia, Dolomite Microfluidics** позволяет инкапсулировать единичные клетки в нанокпель с зондами и реагентикой для ПЦР; применяется для РНК-секвенирования единичных клеток (sc RNA-Seq); 48000 капель за 15 минут, от 1 до 8 образцов.

**Наборы Lexogene** для анализа транскриптома – **полнотранскриптомное секвенирование**, построение экспрессионного профиля, амплификация полноразмерной кДНК, выделение РНК, обогащение фракции мРНК и удаление нецелевых фракций РНК, софт для анализа данных RNA-Seq, контрольные РНК; доступные цены и хорошее качество.

**Наборы diaGene для выделения ДНК и РНК** из биологических образцов на спин-колонках, для очистки фрагментов ДНК после ПЦР, для экстракции ДНК после разделения фрагментов в геле; стоимость выделения – **от 35 руб./образец !**

**000 «Диаэм»**

**www.dia-m.ru**

**Москва**  
ул. Магаданская, 7,  
корп. 3  
тел./факс:  
(495) 745-0508  
sales@dia-m.ru

**Новосибирск**  
пр. Акад.  
Лаврентьева, 6/1  
тел./факс:  
(383) 328-0048  
nsk@dia-m.ru

**Казань**  
ул. Парижской  
Коммуны, д. 6  
тел./факс:  
(843) 210-2080  
kazan@dia-m.ru

**С.-Петербург**  
ул. Профессора  
Попова, 23  
тел./факс:  
(812) 372-6040  
spb@dia-m.ru

**Ростов-на-Дону**  
пер. Семашко, 114  
тел./факс:  
(863) 250-0006  
md@dia-m.ru

**Пермь**  
Представитель  
в УФО  
тел./факс:  
(342) 202-2239  
perm@dia-m.ru

**Воронеж**  
Представитель  
тел./факс:  
(473) 232-4412  
voronezh@dia-m.ru

**Армения**  
Представитель  
тел.  
094-01-01-73  
armenia@dia-m.ru



## Безмаркерный анализ белков

### Экспресс-метод изучения кинетики межмолекулярных взаимодействий!

- анализ 1 образца за 5 секунд;
- от 1 до 96 образцов одновременно;
- простота в эксплуатации;
- не требует специальных меток или красителей;
- минимальная чувствительность к примесям;
- возможность квалификации IQ/OQ;
- Не требует реагентов! Дешевле ИФА!



|                                                | <b>BLItz</b>                 | <b>Octet K2</b>                        | <b>Octet RED96e</b>                                       |
|------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|                                                | Характеризация малых молекул | Характеризация малых и больших молекул | Автоматизированная характеристика малых и больших молекул |
| Скрининг образцов                              | нет                          | *                                      | ***                                                       |
| Многостадийные количественные анализы          | нет                          | *                                      | ***                                                       |
| Мин. объем образца                             | 40 мкл                       | 200 мкл                                | 200 мкл                                                   |
| Формат загрузки образца                        | пробирка 1,5 мл              | планшет 96 лунок                       | планшет 96 лунок                                          |
| Количество одновременно анализируемых образцов | 1                            | 2                                      | 8                                                         |

Высокопроизводительные системы с 16 каналами детекции – *по запросу*.

## 000 «Диаэм»

[www.dia-m.ru](http://www.dia-m.ru)

**Москва**  
ул. Магаданская, 7,  
корп. 3  
тел./факс:  
(495) 745-0508  
sales@dia-m.ru

**Новосибирск**  
пр. Акад.  
Лаврентьева, 6/1  
тел./факс:  
(383) 328-0048  
nsk@dia-m.ru

**Казань**  
ул. Парижской  
Коммуны, д. 6  
тел./факс:  
(843) 210-2080  
kazan@dia-m.ru

**С.-Петербург**  
ул. Профессора  
Попова, 23  
тел./факс:  
(812) 372-6040  
spb@dia-m.ru

**Ростов-  
на-Дону**  
пер. Семашко, 114  
тел./факс:  
(863) 250-0006  
rnd@dia-m.ru

**Пермь**  
Представитель  
в УФО  
тел./факс:  
(342) 202-2239  
perm@dia-m.ru

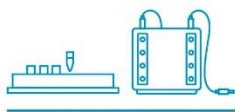
**Воронеж**  
Представитель  
тел./факс:  
(473) 232-4412  
voronezh@dia-m.ru

**Армения**  
Представитель  
тел.  
094-01-01-73  
armenia@dia-m.ru



Компания Хеликон обеспечивает полный рабочий процесс необходимым оборудованием и расходными материалами для молекулярной и клеточной биологии и прикладных исследований.

## ДЕЛАЕМ ВОЗМОЖНОЙ РАБОТУ ЛАБОРАТОРИЙ В РОССИИ НА МИРОВОМ УРОВНЕ



ООО «Компания Хеликон» поставляет передовые решения ведущих мировых брендов и производит лабораторное оборудование для молекулярной биологии.

Подробнее на сайте [www.helicon.ru](http://www.helicon.ru)



**ДОСТАВКА**



**ОБУЧЕНИЕ**



**СЕРВИСНОЕ  
ОБСЛУЖИВАНИЕ**



**МЕТОДИЧЕСКАЯ  
ПОДДЕРЖКА**

### Центральный офис:

119991 г. Москва, Ленинские Горы, МГУ, д. 1, стр. 40  
Тел. 8 (800) 770-71-21 Факс +7 (495) 930-00-84  
[mail@helicon.ru](mailto:mail@helicon.ru)

[www.helicon.ru](http://www.helicon.ru)

### Представительство в Сибирском регионе:

630090 г. Новосибирск, ул. Инженерная, 28  
Тел. +7 (383) 207-84-85, [novosibirsk@helicon.ru](mailto:novosibirsk@helicon.ru)

### Представительство в Северо-Западном Регионе:

195220 г. Санкт-Петербург, ул. Гжатская д. 22 корп. 1  
Тел. +7 (812) 244-85-52, [spb@helicon.ru](mailto:spb@helicon.ru)

### Представительство в Приволжском регионе:

420107 г. Казань, ул. Университетская, д. 22, оф. 107  
Тел. +7 (843) 202-33-37, [volgai@helicon.ru](mailto:volgai@helicon.ru)

### Представительство в Южном регионе:

344116 г. Ростов-на-Дону, ул. 2-ая Володарская, д. 76/23а  
Тел. +7 (863) 294-87-66, [rostov@helicon.ru](mailto:rostov@helicon.ru)



17 лет на фармацевтическом рынке



Единственный в России промышленный производитель генно-инженерного инсулина по принципу полного цикла: от субстанции до ГЛФ



Производство в соответствии со стандартами GMP



Собственный научно-исследовательский центр мирового уровня



Более 850 высококвалифицированных сотрудников



**ГЕРОФАРМ**



191144, г. Санкт-Петербург,  
Дегтярный переулок, 11Б  
БЦ "Невская Ратуша", 10 этаж

[www.geropharm.ru](http://www.geropharm.ru)

Тел./факс: +7 (812) 703 79 75  
[inform@geropharm.ru](mailto:inform@geropharm.ru)  
[facebook.com/geropharm](https://facebook.com/geropharm)

ООО «БИОГЕН-АНАЛИТИКА»

127422, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 1, корп. 2  
+7 (499) 704 62 44, 84997046244@bga.su  
www.bga.su



## ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ IN VIVO

- Широкий выбор систем in vivo визуализации
- Системы для поведенческого и физиологического скрининга
- Системы содержания животных для вивариев
- Вспомогательное оборудование для исследований in vivo и ветеринарии



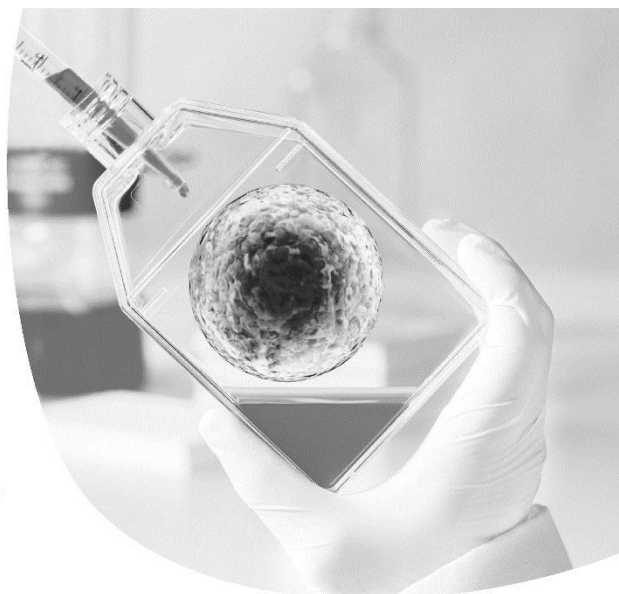
### Широкий спектр приложений:

- |                |                           |                                         |
|----------------|---------------------------|-----------------------------------------|
| • онкология    | • кардиология             | • тестирование лекарственных препаратов |
| • нейрология   | • воспалительные процессы | • метаболизм                            |
| • токсикология |                           |                                         |





## КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



- Клеточные линии и первичные клетки
- Среды классические и специальные
- Стерилизующая фильтрация



- Биохимические реагенты
- Системы очистки воды
- Подсчет и анализ клеток
- Криопрезервация



**Широкий выбор и высочайшее качество клеточных линий нашего партнера – Европейской коллекции клеточных культур (ECACC):**

- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфобластных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные из клеточных линий коллекции;

**[SIGMAaldrich.com/ECACC](http://SIGMAaldrich.com/ECACC)**

**ООО «Мерк»**

115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35, Тел.: +7 (495) 937-33-04  
E-mail: [mm.russia@merckgroup.com](mailto:mm.russia@merckgroup.com), [ruorder@sial.com](mailto:ruorder@sial.com)

**[SIGMAaldrich.com/cellculture](http://SIGMAaldrich.com/cellculture)**  
**[MERCKmillipore.com/cellculture](http://MERCKmillipore.com/cellculture)**



**SIGMA-ALDRICH® is now MERCK**

# **Тезисы молодежной конференции**

## **Взаимодействие продукта гена *HIM1* с геликазами *Srs2* и *Mph1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae***

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

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

[helen.elena1204@gmail.com](mailto:helen.elena1204@gmail.com)

Целью данного исследования было изучение связи фенотипического проявления мутаций в гене *HIM1* с образованием D-петли. Для решения поставленной цели мы использовали мутанты по двум генам, кодирующим геликазы *Srs2* и *Mph1*, контролирующие различные стадии образования D-петли. *Srs2* обладает геликазной и ДНК-зависимой АТФазной активностью. Основная функция геликазы *Mph1* состоит в разрушении D-петель.

Совмещение двух мутаций *srs2* и *him1* в одной клетке привело к резкому увеличению УФ-резистентности двойного мутанта по сравнению с одиночным мутантом *srs2*. Уровень УФ-индуцированного мутагенеза у двойного мутанта не отличался от такового для одиночного мутанта *srs2*. Так как мутация *srs2* приводит к избыточному количеству интермедиатов гомологичной рекомбинации, которые цитотоксичны, из полученных данных можно сделать вывод, что мутация *him1* противодействует образованию этой избыточности, тем самым спасая клетки от гибели. Это противодействие, возможно, связано с дестабилизацией D-петли, вызванной мутацией *him1*.

Для проверки этого предположения мы провели изучение взаимодействия мутации *him1* с мутацией *mph1*. Известно, что мутация *mph1* инактивирует геликазу, которая разрушает D-петли, в результате равновесие между ошибочной и безошибочной ветвью пострепликативной репарации (ППР) сдвигается в сторону безошибочной ветви. Двойной мутант *him1 mph1* показал УФ-резистентность не отличимую от одиночных мутантов. В то же время уровень УФ-мутагенеза у двойного мутанта оказался ниже, чем обоих одиночных мутантов. Результаты наших экспериментов показывают, что повышенный УФ-индуцированный эффект мутации *him1*, полностью устраняется введением в клетки мутации *mph1*. Следовательно, мутаторный фенотип мутации *him1* можно объяснить тем, что она дестабилизирует D-петлю.

Суммируя полученные нами результаты, можно сделать вывод, что функция белка *Him1* имеет отношение к стабилизации D-петли, возникающей при обходе повреждений ДНК в процессе ППР.

## Мононуклеарные клетки периферической крови *in vitro* – биомаркер прогноза антипсихотической терапии

Грунина М. Н.<sup>1</sup>, Заботина А. М.<sup>1,2</sup>, Пчелина М. М.<sup>2</sup>, Насырова Р. Ф.<sup>3</sup>,  
Сосин Д. Н.<sup>3</sup>, Ершов Е. Е.<sup>4</sup>, Тараскина А. Е.<sup>1,2,3</sup>, Крупицкий Е. М.<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии  
им. В. М. Бехтерева, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургская городская психиатрическая больница № 1  
им. П. П. Кащенко, с. Никольское, Ленинградская область, Россия

[by2306@mail.ru](mailto:by2306@mail.ru)

В настоящее время повышение безопасности и эффективности терапии психических расстройств остается актуальной проблемой [1, 2]. Использование клеточных линий, полученных от конкретного пациента, рассматривают как удобный клеточный инструмент изучения патогенеза психоневрологических заболеваний, а также мониторингирования фармакологического лечения [3, 4].

**Цель** исследования – определение уровня мРНК генов рецепторов нейротрансмиттеров, мишеней воздействия антипсихотических препаратов, как возможного биомаркера прогноза назначаемого лечения, при модулировании терапии антипсихотиками на мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) *in vitro*.

**Материалы и методы.** В исследование включено 108 пациентов мужского пола с первым эпизодом острых психотических заболеваний, отнесенные путем рандомизации к одной из двух групп терапии: оланзапин (n = 54) и галоперидол (n = 54).

Материалом служили МКПК, выделенные от пациентов в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS. Клетки культивировались *in vitro* 72 часа в присутствии антипсихотика терапии. Уровень мРНК генов *HTR2A*, *HRH1*, *ADR1B*, *DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4*, *DRD5* определялся методом ПЦР в реальном времени с использованием флуорогенного зонда TaqMan.

**Результаты.** По результатам психометрического обследования на фоне фармакотерапии пациенты были разделены на группы по эффективности применяемой терапии (по редукции суммарной шкалы PANSS). При эффективной терапии галоперидолом уровень мРНК *HTR2A* МКПК культивируемых *in vitro* с антипсихотиком был достоверно ниже, чем в МКПК пациентов с неэффективной фармакокоррекцией (2.24 (0.37÷9.40) vs 15.35 (2.22÷23.70), p = 0.039). Эффективность терапии оланзапином ассоциировалась с низким уровнем экспрессии генов *ADR1B* и *HRH1* (5.62 (1.07÷17.72) vs 25.81 (7.52÷73.01) и 3.8 (1.78÷7.8) vs 13.65 (3.5÷48.30), p = 0.004 и 0.038, соответственно).

**Выводы.** МКПК, культивируемые *in vitro*, могут быть рассмотрены в качестве модели прогноза антипсихотической терапии.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 14-15-00904).

1. Pouget J.G., Muller D.J. *Methods Mol Biol.*: 557–587 (2014).
2. Moore T.R., Hill A.M., Panguluri S.K. *Recent Pat Biotechnol*, 8(2), 152–159 (2014).
3. Levite M. *Acta Physiol.* 216, 42–89 (2016).
4. Morag A., Kirchheiner J. et al. *Pharmacogenomics*. 11(3): 327–340 (2010).

### **Сравнительное изучение мутантных вариантов фактора транскрипции KLF11 при моногенных формах диабета**

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

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

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

MODY-это гетерогенное аутосомно-доминантное наследственное заболевание, обусловленное дефектами в функционировании  $\beta$ -клеток поджелудочной железы [1]. В данной работе изучена новая мутация в гене транскрипционного фактора KLF11. KLF11 участвует в регуляции инсулинового промотора в  $\beta$ -клетках, взаимодействуя с другими факторами - p300 и PDX-1. У пациентов с MODY7 ранее была обнаружена мутация Ala347Ser, изменяющая активность KLF11[3]. Мутация ведет к замене аминокислоты в эволюционно консервативном домене TRD3, который участвует в белок-белковых взаимодействиях с GPCR-рецепторами. Мутация Ala347Ser препятствует связыванию белков, что может стать причиной уменьшения секреции инсулина[4]. В ходе скрининга у больных с симптомами MODY была обнаружена новая мутация Asn357Ser, затрагивающая тот же домен TRD3[5].

Ранее было показано, что в клетках HEK293 KLF11 активирует инсулиновый промотор[2]. А в клеточной линии INS-1E активность промотора ингибируется[6]. Для изучения влияния новой мутации на активность промотора мы провели котрансфекцию клеток HEK293 и INS-1E плазмидой, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем инсулинового промотора, и разными комбинациями плазмид для экспрессии белков p300, KLF11 и PDX-1. Установлено, что KLF11 дикого типа и оба мутантных варианта незначительно повышают уровень экспрессии люциферазы в клетках HEK293 и понижают в клетках INS-1E. При совместной экспрессии p300 и KLF11 активность промотора повышается в обеих системах, а при действии KLF11 или его мутантных вариантов в комбинации с p300 и PDX-1 активность инсулинового

промотора значительно повышается в клетках HEK293 и понижается в INS-1E. Таким образом, подтверждено ингибирующее действие KLF11 на активность инсулинового промотора в клетках INS-1E и зависимость его функционирования от взаимодействия с фактором транскрипции, специфичным для  $\beta$ -клеток – PDX-1.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №16-34-00930).

1. Vaxillaire M., Froguel P. Monogenic diabetes of the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes // *Endocr. Rev.* 2008. V. 29. P. 254.
2. Perakakis N. [et al.] Human Krüppel-like factor 11 differentially regulates human insulin promoter activity in  $\beta$ -cells and non- $\beta$ -cells via p300 and PDX1 through the regulatory sites A3 and CACCC box // *Mol. Cel. Endocrinol.* 2012. V. 363. P. 20.
3. Neve B. [et al.] Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 4807.
4. Lomberg G. [et al.] Krüppel-like factor 11 regulates the expression of metabolic genes via an evolutionarily conserved protein interaction domain functionally disrupted in maturity onset diabetes of the young // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 17745.
5. Краснова Т. С. [и др.] Идентификация и функциональный анализ новой мутации в гене фактора транскрипции KLF11, вызывающей диабет MODY // *Мед. Акад. Журнал.* 2006. № 4. С. 221.
6. Niu X. [et al.] Human Krüppel-like factor 11 inhibits human proinsulin promoter activity in pancreatic beta cells // *Diabetologia.* 2007. V. 50. P. 1433.

## **Анализ фармакодинамических эффектов различных предшественников NAD у мышей при помощи спектроскопии ЯМР**

*Куликова В. А.<sup>1,2</sup>, Соловьева Л. В.<sup>1</sup>, Панченко А. В.<sup>1,3</sup>,  
Шабалин К. А.<sup>1,4</sup>, Нериновский К. Б.<sup>5</sup>, Якимов А. П.<sup>2,4</sup>,  
Светлова М. П.<sup>1</sup>, Ходорковский М. А.<sup>2</sup>, Никифоров А. А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

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

<sup>3</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
им. Н. Н. Петрова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>4</sup> *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИИ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

<sup>5</sup> *Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия*

[livinskaya17@mail.ru](mailto:livinskaya17@mail.ru)

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD), помимо центральной роли в окислительном метаболизме клетки, также является субстратом для нескольких семейств регуляторных белков: деацетилаз белков сиртуинов, АДФ-рибозилтрансфераз и поли(ADP-рибоза)полимераз, которые контролируют жизненно важные процессы в клетке. Основным способом регуляции уровня NAD в клетках человека является его биосинтез из поступающих с пищей предшественников, таких как никотинамид (Nam) и никотиновая кислота (NA), а также рибозиды никотинамида (NR) и никотиновой кислоты (NAR). Нарушение регуляции уровня NAD связано с развитием таких патологий как нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, а также диабет и рак. Модуляция биосинтеза NAD путем введения в организм различных предшественников является мощным инструментом для терапии различных патологий.

В данной работе было проведено комплексное сравнительное исследование фармакодинамических эффектов различных предшественников NAD после их введения мышам линии C57BL/6. Для этого был разработан метод количественного анализа NAD и его основных метаболитов в экстрактах различных органов мышей с использованием спектроскопии ЯМР. При помощи данного метода было показано, что введение мышам NAR, NR, Nam и NMN (никотинамидмононуклеотид) увеличивало уровень NAD в печени в 3–3,5 раза, тогда как введение NA лишь в 2 раза. Введение NA и NAR не приводило к существенному увеличению NAD в сердце, тогда как введение NR и NMN увеличивало уровень NAD в органе на 60–80 %, а введение Nam лишь на 30–40 % по сравнению с контрольными образцами. После введения животным амидированных предшественников (Nam, NR и NMN) наблюдалось значительное накопление NAAD (динуклеотид никотиновой кислоты и

аденина) в печени. NR и NMN эффективно расщеплялись до Nam, тогда как NAR расщеплялся до NA. Описанные фармакодинамические эффекты NAR, NR и других предшественников NAD имели лишь краткосрочный характер.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 16-14-10240).

### **Взаимодействие фермента поли (ADP-рибозо)полимеразы 1 с многофункциональным белком YB-1**

*Кургина Т. А.<sup>1,2</sup>, Алемасова Е. Э.<sup>1</sup>, Науменко К. Н.<sup>1</sup>,  
Анарбаев Р. О.<sup>1,2</sup>, Лаврик О. И.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Россия*

<sup>2</sup> *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

[t.a.kurgina@gmail.com](mailto:t.a.kurgina@gmail.com)

Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) – многофункциональный ДНК- и РНК-связывающий белковый фактор. Данный белок активно изучается как один из компонентов клеточного ответа на генотоксический стресс. Показано, что YB-1 физически взаимодействует с поли(ADP-рибозо)полимеразой 1 (PARP1), при этом происходит поли(ADP-рибозил)ирование YB-1 данным ферментом. Кроме того, YB-1 связывает поли(ADP-рибозу) [1].

PARP1 является одним из ключевых ферментов, регулирующих активность репарационных машин. Данный фермент связывается с поврежденной ДНК и катализирует синтез поли(ADP-рибозы), ковалентно связанной с различными компонентами системы репарации ДНК и самим PARP1. Поли(ADP-рибозил)ирование сопровождается диссоциацией белка из комплекса с ДНК [2].

В настоящей работе изучено взаимодействия PARP1 с YB-1. Нами разработан оригинальный метод определения активности PARP1 в реальном времени, основанный на детекции поляризации флуоресценции. С помощью этого метода подтверждено стимулирующее действие YB-1 на активность PARP1. Являясь дополнительным акцептором поли(ADP-рибозы), YB-1 повышает эффективность катализа. При этом PARP1 дольше задерживается на поврежденной ДНК. Кроме того, присутствие YB-1 снижает эффективность ингибиторов PARP1, таких как олапариб. В присутствии YB-1, PARP1 сохраняет активность даже при больших концентрациях ингибитора. Олапариб уже применяется в клинике для

лечения BRCA-ассоциированного рака. Однако, часто наблюдается устойчивость опухоли к подобной терапии. В резистентных раковых клетках обнаруживается повышенная экспрессия YB-1. Возможно, взаимодействие представленных белков определяет резистентность клеток к химиотерапии.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-24-00038.

1. Alemasova E.E., Moor N.A., Naumenko K.N. et al. Y-box-binding protein 1 as a non-canonical factor of base excision repair. BBA. 1864(12), (2016).
2. Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Poly(ADP-Ribose) polymerase1 as a key regulator of DNA repair. Mol Biol (Mosk). 50(4), (2016).

### **Изучение взаимодействия белка Аргонавта *Rhodobacter sphaeroides* с ДНК-мишенями**

Лисицкая Л. А.<sup>1</sup>, Петушков И. В.<sup>1</sup>, Аравин А. А.<sup>1,2</sup>,  
Кульбачинский А. В.,<sup>1</sup> Есюнина Д. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Калифорнийский технологический институт, Пасадена, США

[lislidiya@gmail.com](mailto:lislidiya@gmail.com)

Системы РНК-интерференции играют значительную роль в защите клеток эукариот от чужеродной ДНК. Важным компонентом РНК-интерференции являются белки семейства Аргонавтов (Ago), многие из которых обладают нуклеазной активностью. Специфичность действия этих белков обеспечивается связыванием коротких «гидовых» молекул РНК, которые служат для распознавания и расщепления комплементарных РНК-мишеней. В отличие от эукариотических Аргонавтов, прокариотические Ago могут связывать РНК- или ДНК-гиды и действуют преимущественно на ДНК-мишени. Предполагается, что прокариотические Ago могут участвовать в защите клеток от чужеродных генетических элементов. В качестве объекта исследования нами выбран белок Аргонавт альфапротеобактерии *Rhodobacter sphaeroides* (RsAgo). RsAgo использует гидовые 5'-фосфорилированные РНК для узнавания ДНК-мишеней. Он сам не обладает нуклеазной активностью, но может вызывать расщепление плазмидной ДНК за счет действия дополнительных нуклеаз [1]. Точные механизмы процессинга нуклеиновых кислот с участием RsAgo и его функции в клетке остаются неизвестными.

В нашей работе исследовано взаимодействие RsAgo, загруженного гидовой РНК, с двунитевыми ДНК-мишенями в системе *in vitro* методом гель-шифт анализа. Определены условия сборки комплекса RsAgo с двунитевой ДНК и показано, что для успешной загрузки Аргонавта

необходимо плавление ДНК. Границы собранного комплекса идентифицированы методами футпринтинга. Для проверки возможных взаимодействий RsAgo с РНК-полимеразами *Escherichia coli* и *R. sphaeroides* выполнена серия экспериментов с использованием дигибридной системы в бактериях *E. coli*. Выявлены домены  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц РНК-полимеразы, возможно, связывающиеся с RsAgo. Полученные результаты позволяют предполагать, что связывание RsAgo с РНК и ДНК может быть сопряжено с транскрипцией. Эта гипотеза требует дальнейшей проверки.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор 14.W03.31.0007).

1. Olovnikov I. et al. Molecular cell, 51, 594–605 (2013).

## **Мутации в генах репарации при раке поджелудочной железы: ответ на лечение ДНК-повреждающими препаратами**

*Мазитова А. М.<sup>1</sup>, Скрипова В. С.<sup>1</sup>, Скобелева Н. А.<sup>2</sup>,  
Серебрянский И. Г.<sup>1,2</sup>, Хазак В. Э.<sup>2</sup>, Асцатуров И. А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Институт фундаментальной медицины и биологии КФУ, Казань, Россия*

<sup>2</sup> *Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA*

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

Одна из проблем в терапии рака поджелудочной железы (РПЖ) – устойчивость к химиотерапии. Мутации в генах репарации ДНК BRCA1/2 увеличивают чувствительность некоторых видов рака к цисплатину из-за нарушения гомологичной рекомбинации (ГР). Опухоли BRCAness-фенотипа, т.е. с нарушением ГР без мутаций в генах BRCA1/2, могут лучше отвечать на действие платиновых препаратов. Одним из способов оценки такого фенотипа является определение значения HRD (Homologous Recombination Deficiency). Высокое значение HRD должно отражать нестабильность генома из-за дефектов ГР, что может являться маркером чувствительности к платине.

Для оценки ответа опухолей к лекарствам широко используются ксенографтные мышинные PDX модели. Опухолевый материал пациента имплантируется иммунодефицитным (ИД) мышам. Опухолевые клетки приживаются и сохраняют все свойства исходной опухоли.

**Целью** данной работы была оценка зависимости чувствительности РПЖ к химиотерапии от значения HRD и наличия мутаций в генах репарации ДНК.

**Материалы методы.** Для исследования действия цисплатина и оксалиплатина были выбраны PDX модели РПЖ с разными значениями HRD (5, 60, 63) и мутациями генов репарации ДНК. Опухолевый материал был имплантирован ИД мышам. В ходе лечения измеряли объемы опухолей и вес мышей.

**Результаты.** Модель с HRD 60 и мутациями в обоих аллелях генов BRCA2, PTEN, FANCM показала частичный ответ на цисплатин и остановку роста опухоли при обработке оксалиплатином. Модель с HRD 63 и мутациями в одном аллеле гена RAD51B и обоих аллелях гена TP53 проявила устойчивость ко всем препаратам. Модель с HRD 5 и мутацией в одном аллеле гена BRCA2 показала остановку роста опухоли при обработке платиновыми препаратами.

**Выводы.** Значение HRD не является маркером чувствительности РПЖ к препаратам платины. Ответ исследованных моделей зависел от наличия мутаций в генах репарации ДНК и TP53, мутации в котором, как правило, приводят к устойчивости к химиотерапии из-за нарушения запуска апоптоза.

## Исследование нарушений гиппокампа у крыс при действии хлорида триметилолова

*Першина Е. В.<sup>1,2</sup>, Камалтдинова Э. Р.<sup>1</sup>, Михеева И. Б.<sup>1</sup>, Архипов В. И.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушино, Россия*

<sup>2</sup> *Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия*

*[pershina-ev@mail.ru](mailto:pershina-ev@mail.ru)*

Нейротоксикант хлорид триметилолова (ТМТ) использовали для инициации нейродегенерации в гиппокампе мозга крыс линии Вистар (n = 40). Действие ТМТ (7,5 мг/кг, п/к) проявлялось у животных в виде потери массы тела, агрессии и судорожной активности. Для предотвращения судорог вводили нембутал в дозе 20 мг/кг, в/б. Исследовали развитие нейродегенерации во временных точках 1, 3, 6 недель после ТМТ. Дефекты гиппокампа проявлялись в поведенческих тестах, как с отрицательным, так и с положительным подкреплением. Гистологические исследования выявили гибель нейронов в области СА3 и ЗФ через 1 неделю после ТМТ. Далее, к 3-ей неделе, гибель клеток наблюдали в области СА2, а через 6 недель – в СА1. Так как эксайтотоксичность может быть причиной гибели нейронов, мы предположили, что она может быть снижена с помощью фармакологической модуляции активности метаботропных рецепторов глутамата (мГлуР). Чтобы определить отдельные мишени-рецепторы, исследовали экспрессию генов мГлу1-5,7 методом ОТ-ПЦР в гиппокампе. Результаты показали, что через 1 неделю после ТМТ из всех мГлуР повышался только уровень мРНК мГлу4, что указывает на перспективность его как мишени на начальных этапах нейродегенерации. Через 3 недели уровень мРНК мГлу 4 оставался повышенным; кроме того, повышалась экспрессия мГлу3 и СОХ-2, что может свидетельствовать о развитии нейровоспаления. Через 6 недель после ТМТ было выявлено достоверное снижение экспрессии генов мГлу3 и нормализация СОХ-2. Кроме того, снижался пул мРНК мГлу5, и оставался повышенным мГлу4, что, по-видимому, отражает завершение стадии воспаления и характеризует стадию адаптации к эксайтотоксичности. Таким образом, при развитии нейродегенерации следует воздействовать на разные мишени-рецепторы. Так, на ранних стадиях необходимо фармакологически активировать мГлу4, далее – активировать мГлу3, а на поздней стадии целесообразно ингибировать мГлу5 рецепторы.

Работа поддержана грантом РФФИ-мол а № 16-34-01167.

## **Экспрессия гена *ADIPOQ* в подкожной и интраабдоминальной жировой ткани у женщин с различной степенью ожирения**

*Разгильдина Н. Д.<sup>1</sup>, Бровин Д. Л.<sup>2</sup>, Побожьева И. А.<sup>1,2</sup>,  
Мирошникова В. В.<sup>1</sup>, Пантелеева А. А.<sup>1,2</sup>,  
Беляева О. Д.<sup>2</sup>, Баранова Е. И.<sup>2</sup>, Пчелина С. Н.<sup>1,2</sup>*

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

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

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

Абдоминальное ожирение (АО) часто сопровождается различными заболеваниями, такими как диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистыми патологиями. При избыточном накоплении жировой ткани наблюдается снижение уровня протективных адипоцитокинов – гормоноподобных веществ, секретируемых жировой тканью. В первую очередь наблюдается снижение уровня адипонектина, который обладает антиатерогенными, противовоспалительными, кардиопротективными свойствами.

До настоящего времени не установлено жировая ткань какой локализации в наибольшей степени ассоциируется с уровнем адипонектина в крови.

**Цель.** Исследование ассоциации экспрессии гена *ADIPOQ* в подкожной жировой ткани ПЖТ и интраабдоминальной жировой ткани ИЖТ с уровнем индекса массы тела ИМТ и обхватом талии ОТ, а также с содержанием общего адипонектина крови у женщин.

**Методы.** Образцы ПЖТ и ИЖТ были получены от 50 женщин, перенесших операции в брюшной области (ИМТ>25, N=34, ИМТ<25, N=16). Уровень мРНК гена *ADIPOQ* измеряли методом ПЦР в режиме реального времени. Уровень общего адипонектина в крови был измерен методом ИФА.

**Результаты.** Уровень мРНК гена *ADIPOQ* ПЖТ отрицательно коррелировал с индексом массы тела (ИМТ) и был значительно снижен у лиц с избыточной массой тела (ИМТ>25,  $p<0,05$ ). Было показано, что уровень мРНК гена *ADIPOQ* ПЖТ положительно коррелировал с уровнем общего адипонектина в крови ( $p<0,05$ ), что может говорить о том, что именно ПЖТ ткань является основным источником адипонектина, поступающего в кровоток. В то же время для уровня мРНК гена *ADIPOQ* ИЖТ не наблюдалось ассоциаций с ИМТ и уровнем общего адипонектина крови.

## Роль сигнального пути Notch в кальцификации клапана аорты

*Семенова Д. С.<sup>1,2</sup>, Малашичева А. Б.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup> *Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия*

[daria.semenova1994@gmail.com](mailto:daria.semenova1994@gmail.com)

Кальцификация аортального клапана – распространенное заболевание, корректирующееся только хирургически. Механизмы кальцификации клапана аорты до конца неясны. Одной из причин считается нарушение работы сигнального пути Notch. Notch играет важнейшую роль при развитии сердца и сосудов, обеспечивая взаимодействие клеток. К кальцификации приводят процессы, сходные с остеогенной дифференцировкой. Полагают, что в процессе кальцификации участвуют эндотелиальные и интерстициальные клетки, составляющие клапан.

Целью данного исследования было изучить роль сигнального пути Notch в остеогенной дифференцировке клеток клапана аорты.

Интерстициальные и эндотелиальные клетки получали из кальцифицированных клапанов пациентов, а также из здоровых клапанов. Остеогенную дифференцировку запускали при помощи специфических индукторов. Оценку дифференцировки проводили путем окраски культур клеток, а также при помощи анализа экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки методом количественной ПЦР. Для изучения межклеточных взаимодействий интерстициальные клетки сокультивировали с эндотелиальными клетками клапана. Активацию сигнального пути Notch проводили путем введения в клетки на лентивирусном носителе активированного домена Notch1.

Сокультивирование интерстициальных клеток с эндотелиальными усиливает степень остеогенной дифференцировки по мере увеличения дозы эндотелия. Активация сигнального пути Notch приводит к усилению остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток. Сокультивирование приводит к активации Notch, а также к индукции генов остеодифференцировки. Клетки от пациентов с кальцификацией клапана, имеют более высокий уровень активации Notch как при сокультивировании, так и при индукции остеогенной дифференцировки.

Полученные результаты подтверждают участие интерстициальных и эндотелиальных клеток в кальцификации клапана аорты, а также позволяют сделать вывод о том, что уровень активации Notch играет важную роль в кальцификации клеток аортального клапана.

## Биокатализатор для экологически чистых процессов органического синтеза и получения биодизеля

Сидоренко А. И., Склярёнок А. В., Яроцкий С. В.

Государственный научно-исследовательский институт  
генетики и селекции промышленных микроорганизмов  
НИИ «Курчатовский институт», Москва, Россия

nougatanna@yandex.ru

Современной тенденцией в области тонкого органического синтеза является замена методов химического синтеза на биокаталитические процессы трансформации органических веществ с использованием гетерогенных биокатализаторов на основе различных ферментов. *Candida antarctica* липаза В (CALB) является востребованным ферментом при создании технологических процессов «зеленой химии». Данный фермент обладает высокой стерео- и регио-селективностью, что позволяет использовать его для направленных трансформаций органических соединений. Помимо этого, биокатализатор (БК) на основе CALB может быть использован при получении из растительных масел или отходов пищевой промышленности биодизеля, являющегося альтернативой ископаемым видам топлива.

Данная работа нацелена на создание высокоактивного и стабильного гетерогенного БК на основе рекомбинантной CALB. Разработано три метода иммобилизации CALB, а именно: получение поперечно-сшитых ферментных агрегатов; иммобилизация CALB на многослойных углеродных нанотрубках и адсорбция фермента с последующей его ковалентной сшивкой (с использованием трех различных гидрофобных носителей). На основании сопоставления этих трех методов по эффективности иммобилизации фермента, активности получаемых БК и их термической стабильности в органических растворителях был сделан выбор в пользу адсорбционно-ковалентной иммобилизации CALB.

Разработанный БК обладает синтетазной активностью 22000–26000 МЕ/г, что превосходит известные мировые аналоги в 2-2,5 раза. При этом он характеризуется высокой термостабильностью в органических растворителях (полное сохранение активности после инкубации 5 часов при 60 °С в н-гексане или толуоле). Созданный БК дает возможность осуществлять энантиоселективный синтез амидов и эфиров, что позволяет использовать его для получения оптически чистых полупродуктов синтеза таких лекарственных препаратов как лотрафибан, позаконазол, дарунавир, кеторолак.

## Перспективные соединения в терапии болезни Альцгеймера

*Слободина А. Д.<sup>1,2</sup>, Большакова О. И.<sup>2</sup>, Шварцман А. Л.<sup>2</sup>, Саранцева С. В.<sup>2</sup>*

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

<sup>2</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

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

Наиболее распространенной формой первичных нейродегенеративных заболеваний в современном обществе является болезнь Альцгеймера (БА), сопровождающаяся прогрессирующим когнитивным снижением, расстройством памяти и речи, развитием слабоумия. Основными патоморфологическими признаками БА в мозге больных являются образования внутриклеточных нейрофибриллярных клубков, содержащих гиперфосфорилированный тау-протеин, и экстраклеточных фибриллярных агрегатов амилоидного пептида  $\beta$ , состоящего из 42 аминокислот ( $A\beta_{42}$ ). Поэтому одна из стратегий терапии БА основана на поиске и разработке препаратов, предотвращающих формирование  $A\beta$ -агрегатов.

При скрининге комбинаторных пептидных библиотек и анализе миметиков транстиретина мы определили пептиды, блокирующие различные стадии образования амилоидных фибрилл, включая элонгацию  $A\beta$ . Однако эти пептиды не могли проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), поэтому мы присоединили к их последовательности вектора, способные проходить через клеточные мембраны и ГЭБ.

Целью настоящей работы было изучение свойств составных пептидов *in vitro* и на клеточных культурах. Для этого были использованы конфокальная, трансмиссионная электронная (ТЭМ) и атомно-силовая микроскопии (АСМ), динамическое светорассеяние (ДСР), измерение оптической плотности и цитометрический анализ.

Было установлено, что инкубация  $A\beta_{42}$  с исследуемыми составными пептидами в течение 24 часов при температуре 37 °С снижает агрегацию  $A\beta_{42}$ , т. е. эти пептиды обладают антиамилоидной активностью. Метод ДСР подтвердил, что все пептиды проявляют ингибиторный эффект на формирование амилоидных фибрилл  $A\beta_{42}$ . Мы показали, что все исследованные пептиды проходят внутрь клеток линий V79 и HELA с разной эффективностью и регистрируются в цитоплазме и ядре клеток. Для дальнейших экспериментов *in vivo* были отобраны препараты с наибольшим антиамилоидогенным потенциалом.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-29-01350.

## **Модификации гистона H3 в мозге пациентов с фармакорезистентной височной эпилепсией**

*Сохраняева Л. С., Аниол В. А.*

*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

*sokhranyaeva@gmail.com*

Височная эпилепсия является одним из наиболее распространенных неврологических заболеваний. До 75 % случаев височной эпилепсии оказываются фармакорезистентными. Причины и механизмы развития височной эпилепсии и ее фармакорезистентности до сих пор остаются невыясненными. Существует гипотеза, согласно которой в основе этиологии и рефрактерности заболевания лежат изменения на эпигенетическом уровне. В данной работе мы исследовали модификации гистона H3 в тканях мозга пациентов с фармакорезистентной височной эпилепсией.

Образцы ткани были получены от пациентов, прошедших одностороннюю гиппокампэктомию. Гистоны выделяли методом кислотного осаждения, модификации гистона H3 анализировали с помощью вестерн-блоттинга. В работе исследовали ацетилирование (ац) остатков лизина (K) H3K9, H3K14 и H3K18 и моно-, ди- и триметилирование (me1, me2, и me3) H3K4, H3K9 и H3K27. Изучали взаимосвязи между перечисленными модификациями гистона H3, различия модификаций в височной коре и гиппокампе и их особенности при склерозе гиппокампа, а также ассоциации с приемом противосудорожных препаратов (вальпроат, карбамазепин, леветирацетам и ламотриджин).

Были обнаружены обширные корреляции между различными модификациями. Паттерн выраженности модификаций гистона H3 отличался в височной коре от такового в гиппокампе, в частности уровни ацH3K14, me1 и me2H3K4, me2H3K9, me2 и me3H3K27 были выше в височной коре. У пациентов со склерозом гиппокампа были снижены уровни me3H3K4, me2H3K9 и me2H3K27, однако уровень me3H3K27 был повышен. Прием карбамазепина перед операцией оказался связан с повышением уровня me1H3K4, а леветирацетама – с понижением этого показателя.

На основе полученных результатов можно предположить, что модификации гистона H3 принимают участие в развитии фармакорезистентной височной эпилепсии. В перспективе данной работы планируется определение генов, экспрессия которых регулируется изучаемыми модификациями.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 16-04-01513.

## Ловастатин и золедроновая кислота как потенциальные препараты для терапии нейрофиброматоза II типа

Тюльганова Д. А., Степанова Д. С., Шимановский Н. Л.

*Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н. И. Пирогова Минздрава РФ, Москва, Россия*

[tyuldarya@gmail.com](mailto:tyuldarya@gmail.com)

**Актуальность работы.** Нейрофиброматоз II типа – тяжелое заболевание, наследуемое по аутосомно-доминантному типу и проявляющееся образованием множественных доброкачественных опухолей (преимущественно, шванном и менингиом) в центральной и периферической нервной системе [1]. Заболевание связано с возникновением инактивирующих мутаций в гене *NF*, однако молекулярный патогенез опухолевой трансформации до сих пор не изучен [1, 2]. Также, до сих пор не разработана консервативная терапия данного заболевания, и пациенты вынуждены подвергаться многократным хирургическим вмешательствам по удалению опухолей, что существенно снижает качество и продолжительность жизни. Таким образом, поиск терапии для данного заболевания является чрезвычайно актуальной задачей, особенно для нашей страны, где практически не проводятся исследования, посвященные данной проблеме.

**Целью** нашей работы являлся поиск фармакологических веществ, обладающих направленным действием против опухолей, ассоциированных с нейрофиброматозом II типа.

**Материалы и методы.** В работе использовали мышинные эмбриональные фибробласты, несущие флокс-аллель в гене *Nf2* (MEF *Nf2<sup>flox/flox</sup>*), иммортализованные клетки мышины *Nf2*-отрицательной шванномы (SC4-9) – любезно предоставленные д-ром Марко Джованнини (dr Marco Giovannini, Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) et Institut Universitaire d'Hematologie, Paris, France); и клетки линии крысиной *Nf2*-отрицательной шванномы (RT4) – полученные из Американского банка клеток и тканей (ATCC, кат. № CRL-2768).

Все клетки выращивали в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 mM L-глутамина, 1mM пирувата натрия и 0.1 м М смеси заменимых аминокислот (все Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, UK) при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

**Получение фибробластов, нокаутных по гену *Nf2*.** Иммортализованные клетки MEF *Nf2<sup>flox/flox</sup>* трансфецировали плазмидным вектором pMSCV-Cre-GFP, несущим Cre-рекомбиназу и зеленый флуоресцентный белок (GFP). Контрольные клетки MEF *Nf2<sup>flox/flox</sup>* трансфецировали плазмидным вектором pMSCV-GFP, несущим только GFP. Через 48 часов после трансфекции на проточном цитофлуориметре

(Becton Dickinson FACS-VantageSE flow cytometer) отбирали флуоресцентные клетки. Делеция гена *Nf2* была подтверждена геномным типированием и иммуноблоттингом.

**Скрининг коллекции низкомолекулярных биоактивных соединений.** В работе использована коллекция биологически активных веществ ICCB Known Bioactives (Enzo Life Sciences, США, № BML-2840-0100). Скрининг был осуществлен на двух клеточных линиях: экспериментальной MEF *Nf2*<sup>-/-</sup> и контрольной MEF *Nf2*<sup>flox/flox</sup>, в триплетах, и повторен дважды. В качестве отрицательного контроля использовали растворитель (ДМСО). В качестве положительного контроля использовали стауроспорин в конечной концентрации 20 мкМ. Действие веществ оценивали по уровню выживаемости клеток, измеренному с помощью модифицированного МТТ-теста. Веществами, показавшими положительный результат, считали такие, для которых соотношение жизнеспособных клеток MEF *Nf2*<sup>-/-</sup> к MEF *Nf2*<sup>flox/flox</sup> было < 0,8, расценивая разницу в 20 % как умеренные различия, а ожидаемая доля ложных отклонений гипотез (FDR, false discovery rate) по методу Бенджамини-Хохберга [3] < 20 %. При валидации результатов скрининга клетки выращивали в 96-луночных планшетах. Среднюю ингибиторную концентрацию (IC<sub>50</sub>, концентрацию вещества, при которой доля жизнеспособных клеток составляла 50 %) рассчитывали по формуле  $IC_{50}=a+b*\arctg(1-1/2c)$  после аппроксимации кривой Доза/Эффект логистической функцией  $y=c*(1-tg((x-a)/b))$ , где  $x$  – концентрация вещества, методом наименьших квадратов по коэффициентам  $a$ ,  $b$  и  $c$ .

**Активность малой ГТФазы Rac1** оценивалась методом резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) [4].

**Результаты.** Мы провели ненаправленный фармакологический скрининг 485 биоактивных соединений на нормальных и *Nf2*-отрицательных мышинных фибробластах и обнаружили, что ловастатин обладает выраженным направленным цитотоксическим действием в отношении *Nf2*-отрицательных клеток. Таким же избирательным действием обладали и остальные препараты из группы статинов (мевастатин, флувастатин и симвастатин). Было установлено, что механизм избирательной цитотоксичности ловастатина связан с истощением внутриклеточного пула геранил-гераниола и нарушением геранилирования малой ГТФазы Rac1. Индукция перманентно-активной формы Rac1 и активация этого фермента с помощью соединения ЕНТ1864 потенцировали действие статинов в *Nf2*-отрицательных и контрольных клетках. С помощью флуоресцентной микроскопии было установлено, что при нарушении геранилирования Rac1 отсоединяется от клеточной мембраны и транслоцируется в ядро. Измерение активности Rac1 в ядре методом резонансного переноса энергии флуоресценции показало, что в *Nf2*-отрицательных клетках под действием статинов Rac1 активируется, что, по-видимому, и вызывает клеточную гибель. В контрольных клетках

активации Ras1 в ядре не наблюдалось. Нарушение геранилирования и транслокация в ядро Ras1 так же достигалось при воздействии на клетки ингибитора геранилтрансфераз золедроновой кислоты – препарата из группы бисфосфонатов, применяемого для лечения остеопороза.

И статины, и золедроновая кислота существенно замедляли рост опухолей в испытаниях на ксенографтной модели нейрофиброматоза II типа на бестимусных мышах с использованием клеток мышинной и крысиной Nf2-отрицательной шванномы.

Полученные данные позволяют предположить, что ингибиторы синтазы жирных кислот могут быть использованы при разработке фармакотерапии нейрофиброматоза II типа.

1. Evans, D.G. et al., *A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness, and confirmation of maternal transmission effect on severity.* J Med Genet, 1992. **29**(12): p. 841-6.
2. Bianchi, A.B. et al., *Mutations in transcript isoforms of the neurofibromatosis 2 gene in multiple human tumour types.* Nat Genet. , 1994 **6**(2): p. 185-92.
3. Y. Benjamini, Y. Hochberg, *Controlling the false discovery rate.* J. R. Stat. Soc. **57**(1), 289–300, 1995.
4. Hodgson L., F. Shen, and K. Hahn, *Biosensors for Characterizing the Dynamics of Rho Family GTPases in Living Cells*, in *Current Protocols in Cell Biology*. 2010, John Wiley & Sons, Inc. p. 14.11.1-14.11.26.

## **Кинетика самоорганизации биомакромолекулярных систем по данным времяразрешенного малоуглового рентгеновского рассеяния**

*Черемных Т. А.<sup>1,2</sup>, Швецов А. В.<sup>1</sup>, Dattan R.<sup>3</sup>, Байтин Д. М.<sup>1</sup>,  
Клопов Н. В.<sup>1</sup>, Лебедев Д. В.<sup>1</sup>, Коневега А. Л.<sup>1</sup>, Исаев-Иванов В. В.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup> *Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия*

<sup>3</sup> *European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France*

*[cheremnykh\\_ta@pnpi.nrcki.ru](mailto:cheremnykh_ta@pnpi.nrcki.ru)*

Времяразрешенное малоугловое рентгеновское рассеяние (ВР-МУРР) дает возможность фиксировать конформационные изменения и измерять кинетику биомакромолекулярной системы в близких к нативным условиям с хорошим временным разрешением [1]. Для обработки серий экспериментальных кривых был выбран метод сингулярного разложения (SVD), который используется для определения минимального количества элементов, необходимых для описания набора данных [2]. Такой подход применялся для анализа самоорганизации биомакромолекулярных комплексов, включая бактериальные системы синтеза белка и гомологической рекомбинации.

Процесс гомологической рекомбинации включает образование мультимерной структуры белка RecA вдоль он-ДНК в присутствии АТФ и ионов магния [3]. В исследовании структурной кинетики образования пресинаптического комплекса методом SVD были проанализированы спектры ВР-МУРР в двух диапазонах амплитуд переданного импульса: от 0,04 до 0,4 нм<sup>-1</sup> (малые углы, отражающие изменение длины и диаметра нитей) и 0,4–2 нм<sup>-1</sup> (характеризующие периодичность структуры нити).

Кинетика изменений первой главной компоненты спектров в данных диапазонах принципиально различна. В малых углах наблюдается биэкспоненциальный процесс с характерными временами изменения первой главной составляющей спектра около 0,5 и 30 с, в больших углах – экспоненциальный процесс с  $\tau \approx 3$  с. Эти времена соответствуют основным этапам процесса формирования пресинаптического комплекса: разбор белкового самополимера, формирование спиральной структуры на он-ДНК и рост пресинаптического филамента белка RecA. Кинетика образования пресинаптического комплекса характеризовалась для разных концентраций RecA и он-ДНК и различных нуклеотидных последовательностей.

Таким образом, сингулярное разложение позволяет свести изменения спектров рассеяния к очень ограниченному числу характерных компонент. Затем можно проанализировать кинетику исследуемых процессов, выявив

характерные времена изменений структуры биомакромолекулярных комплексов.

**Подавление ангиогенеза в опухолевых клетках с помощью доставки анти-VEGFA миРНК с использованием пептидных носителей, модифицированных циклическим лигандом интегринов  $\alpha v \beta 3$**

*Штыкалова С. В.<sup>1,2</sup>, Егорова А. А.<sup>1</sup>, Киселев А. В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

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

[sofia.shtykalova@gmail.com](mailto:sofia.shtykalova@gmail.com)

Ангиогенез – процесс формирования новых кровеносных сосудов, интенсивно протекающий при опухолеобразовании. Подавление неоангиогенеза с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК) является перспективным подходом к генной терапии рака. Необходимым условием развития данного подхода является разработка эффективных и специфичных средств доставки миРНК в клетки. Интегрины  $\alpha v \beta 3$  – белки клеточной адгезии, избыток которых наблюдается при процессах злокачественного новообразования и неоангиогенеза. Для обеспечения адресной доставки миРНК в опухолевые клетки нами разработаны цистеин-фланкированные аргинин-богатые пептидные носители, модифицированные циклическим лигандом iRGD, связывающим интегрины  $\alpha v \beta 3$ . Данная модификация обуславливает рецептор-опосредованный эндоцитоз миРНК в клетки.

Цель работы: изучение подавления ангиогенеза путем доставки миРНК в клетки, содержащие на поверхности интегрины  $\alpha v \beta 3$ , с помощью пептидных носителей, модифицированных лигандом iRGD.

Нами исследованы несколько типов нуклеопептидных комплексов, различных по стехиометрии и аминокислотному составу. Проверку способности носителей к связыванию миРНК осуществляли с помощью теста на вытеснение красителя SybrGreen. Была изучена способность носителей защищать миРНК от нуклеазной деградации. Далее на клеточных культурах с разным поверхностным содержанием  $\alpha v \beta 3$  были изучены токсические свойства комплексов с помощью теста AlamarBlue. Проведены эксперименты по доставке анти-VEGFA миРНК в клетки линий MDA-MB-231 и E.A.Hy926. Далее иммуноферментным методом оценивали уровень секретируемого белка VEGFA после трансфекции с anti-VEGF. В качестве контроля использовали комплексы, несущие «бессмысленную»

миРНК. В результате проведенной работы показано снижение продукции внеклеточного белка VEGFA в результате проникновения в  $\alpha v\beta 3$ + клетки нуклеопептидных комплексов.

Таким образом, разработанные носители являются перспективными для эффективной и специфичной доставки анти-VEGFA миРНК с целью подавления неоангиогенеза.

### **Манипулирование магнитными микросорбентами с помощью переменного магнитного поля для улучшения сорбции биополимеров**

*Антифеев И. Е.<sup>1</sup>, Бродская А. В.<sup>2,3</sup>, Константинова Н. Н.<sup>1</sup>,  
Дженлода Р. Х.<sup>4</sup>, Федоров А. А.<sup>1</sup>, Петров Д. Г.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup> *Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава РФ,  
Санкт-Петербург, Россия*

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

<sup>4</sup> *Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского РАН,  
Москва, Россия*

Сорбенты на основе магнитных частиц широко используются в задачах биологической пробоподготовки для концентрирования различных биополимеров – ДНК, РНК, белков и пептидов [1, 2].

Преимуществом использования магнитных частиц – возможность быстрого концентрирования частиц в потоке реагентов под воздействием магнитного поля. В большинстве исследований для формирования удерживающего магнитного поля используются постоянные магниты. Недостатком такого подхода является агрегирование магнитных частиц, и, как следствие, уменьшение «реакционного объема», что приводит к ухудшению сорбции аналита.

В данной работе был предложен макет устройства, позволяющего создавать переменное магнитное поле в проточной реакционной камере объемом 50-500 мкл. Амплитуда и частота магнитного поля выбирались таким образом, чтобы частицы сорбента совершали колебательные движения в заданном реакционном объеме камеры. Переменное магнитное поле создавалось электромагнитом в зазоре между двумя П-образными магнитопроводниками, на которых расположена обмотка электромагнита. Для локализации и концентрирования магнитного поля, были использованы «направляющие», благодаря которым создавалось магнитное поле силой 0,5 Тл, при частоте 50 Гц.

Оценка эффективности манипулирования магнитными частицами с помощью магнитного поля была выполнена на примере сорбции модельной плазмидной ДНК на микросорбенте. Микросорбент и хим. реактивы предоставлены компанией «Синтол». Для сравнения результатов сорбции использовалась стандартная методика «ручного» выделения.

Анализ выделенных образцов ДНК проводился спектрофотометрически.

В режиме «ручного» выделения ДНК удается извлечь порядка 40 % всей ДНК за 30 мин. Выбранный режим манипулирования микросорбентом позволил увеличить выход целевого продукта до 89 %, при этом длительность сорбционного процесса составила 15 мин.

1. Q. Ramadan et al., Microfluid Nanofluid (2012).
2. Y. Moser et al., 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (2008).

## **Трехмерная реконструкция эукариотических полирибосом методами криоэлектронной томографии**

*Баймухаметов Т. Н.<sup>1</sup>, Афонина Ж. А.<sup>2</sup>,  
Чесноков Ю. М.<sup>1</sup>, Широков В. А.<sup>2</sup>, Васильев А. Л.<sup>1,3</sup>*

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

<sup>2</sup> *Институт белка РАН, Пущино, Россия*

<sup>3</sup> *Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова РАН,  
Москва, Россия*

[baymukhametov.timur@gmail.com](mailto:baymukhametov.timur@gmail.com)

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

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

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

## Состав респираторной микрофлоры как фактор модификации мутагенеза в соматических клетках человека

Баранова Е. Д., Дружинин В. Г.

*Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия*

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

Некоторые представители бактериальной микробиоты, населяющей наш организм, способны индуцировать мутации в клетках хозяина с помощью продукции генотоксинов [1]. На данный момент известны три бактериальных генотоксина. Колибактин – (*E. Coli*) [2], цитотолетальный растягивающий токсин (CDT) – (*B. Fragilis*) [3] и тифозный токсин – (*S. enterica*, *S. paratyphi*). Также имеются сведения о способности бактерий блокировать механизмы репарации ДНК [4].

Можно предположить, что процессы индуцированного мутагенеза и канцерогенеза взаимосвязаны с состоянием микробиома, данная связь способна наиболее ярко проявиться в условиях выраженной (профессиональной) экспозиции экологическими токсикантами. Маркерами повышенной индивидуальной чувствительности к действию генотоксических факторов с одной стороны, служит накопление хромосомных aberrаций и микроядер [5]. С другой стороны, генетически предопределенная специфическая активность генома в экспрессии ферментов биотрансформации ксенобиотиков, репарации ДНК, контроля апоптоза и клеточного цикла и др., т. е. систем защиты генома, также способны значимо влиять на чувствительность организма к воздействию генотоксических канцерогенов. Важную информацию об индивидуальной чувствительности к условиям канцерогеноопасного производства может дать анализ экспрессии комплекса генов, обеспечивающих стабильность генома. Наконец, свой вклад в определение стабильности генома, поддержание генетического гомеостаза (согласно предложенной гипотезе) должны вносить количественные и качественные особенности микробиома респираторного тракта.

В докладе обсуждаются теоретические предпосылки для выполнения пилотного проекта по изучению состава микрофлоры респираторных путей у жителей шахтерского региона. В рамках начатого проекта впервые будет дана оценка взаимосвязи повреждений ДНК вследствие влияния генотоксических факторов с учетом состава микрофлоры в когортах шахтеров и больных с профессиональными заболеваниями верхних дыхательных путей и плоскоклеточным раком легкого.

1. Frisan T. Bacterial genotoxins: The long journey to the nucleus of mammalian cells // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1858 (3). P. 567–575.
2. Cuevas-Ramos G., Petit C.R., Marcq I. et al. *Escherichia coli* induces DNA damage *in vivo* and triggers genomic instability in mammalian cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107 (25). P. 11537–11542.

3. Guidi R., Guerra L., Levi L. et al. Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response // Cell Microbiol. 2013. V. 15 (1). P. 98–113.
4. Fall S., Mercier A., Bertolla F. et al. Horizontal gene transfer regulation in acteria as a “spandrel” of DNA repair mechanisms // PLoS ONE. 2007. V. 2 (10). P. 1055.
5. Milic M., Frustaci A., Del Bufalo A. et al. DNA damage in non-communicable diseases: A clinical and epidemiological perspective // Mutat. Res. 2015. V. 776. P. 118–127.

### **Взаимодействие синтетических аналогов изохиналина с сывороточными альбуминами**

*Баранова Ю. Г., Осинникова Д. Н., Романов Н. М.,  
Ревегук З. В., Кононов А. И., Поляничко А. М.*

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

[jul.bar.g@yandex.ru](mailto:jul.bar.g@yandex.ru)

Одним из путей создания новых лекарственных препаратов является синтез веществ на основе природных биологически активных соединений. Ярким примером подобных препаратов являются алкалоиды – соединения природного происхождения, в состав которых, как правило, входит плоский гетероциклический хромофор, способный связываться с ДНК, влияя на ее биологические функции. На сегодняшний день существует достаточно большое количество препаратов, являющихся синтетическими аналогами природных алкалоидов, которые имеют различную биологическую активность.

Транспорт таких лекарственных препаратов к мишени нередко осуществляется через кровотоки. Самыми распространенными белками плазмы крови у млекопитающих, одна из основных функций которых заключается в транспортировке различных лигандов, являются сывороточные альбумины (СА). Работа посвящена изучению взаимодействия бычьего и человеческого СА (далее БСА и САЧ) с новыми синтетическими производными изохиналинового алкалоида. Методами УФ-спектрофотометрии, флуоресцентного анализа и электрофоретического разделения в ПААГ изучали взаимодействие производных изохиналина с молекулами САЧ и БСА. С помощью метода ИК-спектроскопии проведена оценка параметров вторичной структуры белков в отсутствии и присутствии лигандов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, № 15-0806876, № 18-08-01500).

## Особенности вторичной структуры мРНК NS-гена вируса гриппа А

Барановская И. Л.<sup>1,2</sup>, Бродская А. В.<sup>1,2</sup>,  
Егорова А. А.<sup>1</sup>, Сергеева М. В.<sup>1</sup>, Васин А. В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава РФ,  
Санкт-Петербург, Россия

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

<sup>3</sup> Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия,  
Санкт-Петербург, Россия

[irina.baranovskaja.1992@gmail.com](mailto:irina.baranovskaja.1992@gmail.com)

Роль вторичной структуры РНК для жизнедеятельности вирусов была продемонстрирована в большом количестве научных работ. Геном вируса гриппа типа А (ВГА) представлен 8 сегментами односторонней антисмысловой РНК. Вторичная структура на смысловой нити вирусной РНК наиболее точно установлена для NS-геномного сегмента. Области РНК с консервативной вторичной структурой данного сегмента локализованы вблизи 5' и 3' сайтов сплайсинга. Другими авторами было показано влияние вторичной структуры РНК первой области на эффективность экспрессии гена NS1 *in vitro* [1]. В тоже время, стабильная шпилька второй области характерна для высокопатогенных птичьих вирусов H5N1, у остальных же вирусов формируется менее стабильная структура [2]. В ранее опубликованной нами работе было проанализировано более 25,000 последовательностей различных штаммов ВГА и предсказана вторичная структура (+)-РНК NS-сегмента [3].

В данной работе мы запланировали не только экспериментально подтвердить существования ранее предсказанных вторичных структур, но и определить их возможную роль в патогенезе гриппозной инфекции. Основываясь на ранее полученных данных о предсказании вторичных структур у различных штаммов ВГА, были выбраны нуклеотидные позиции, которые, на наш взгляд, могут участвовать в формировании стабильной вторичной структуры.

Методом сайт-направленного мутагенеза, были получены комбинации мутаций в соответствующих областях сегмента NS, предположительно формирующие различные вторичные структуры. В качестве исходной матрицы использовалась плазмида pHW2000, кодирующая NS-сегмент вируса Puerto Rico 8/34. Интересующие фрагменты вирусной РНК были получены методом *in vitro* транскрипции. Методом электрофоретического разделения в полиакриламидном геле в нативных и денатурирующих условиях была проанализирована вторичная структура полученных РНК.

Основываясь на полученных результатах, в дальнейшей работе мы планируем получить штаммы вируса гриппа А с различной вторичной структурой на (+)-нити РНК NS-геномного сегмента методом «обратной

генетики». Анализ и сравнение патогенности и других характеристик вирусных штаммов гриппа с различной структурой РНК NS1-гена может приблизить нас к более детальному пониманию роли шпилечной структуры РНК в жизненном цикле вируса.

1. Ilyinskii PO, Schmidt T, Lukashev D, Meriin AB, Thoidis G, Frishman D, Shneider AM. Importance of mRNA secondary structural elements for the expression of influenza virus genes. OMICS. 2009; 13:421–30.
2. Gulyaev AP, Heus HA, Olsthoorn RCL. An RNA conformational shift in recent H5N1 influenza A viruses. Bioinformatics. 2007; 23:272–6.
3. Vasin A.V. et al. The influenza A virus NS genome segment displays lineage-specific patterns in predicted RNA secondary structure // BMC research notes. 2016. V. 9. No. 1.

### **Рсbp1 важен для перехода из наивной в праймированную плюрипотентность**

*Бахмет Е. И., Назаров И. Б., Томилин А. Н.*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

[e.bakhmet@incras.ru](mailto:e.bakhmet@incras.ru)

Плюрипотентные стволовые клетки отличаются своей способностью к дифференцировке во все возможные типы соматических клеток, и к самообновлению. Клетки эпибласта в доимплантационном эмбрионе и соответствующие им культивируемые эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) находятся в т. н. наивном плюрипотентном состоянии. При этом, клетки эпибласта в первые 2-3 дня после имплантации, а также получаемые из них культивируемые эпибластные стволовые клетки (ЭпиСК) находятся в праймированном состоянии. Ген главного маркера плюрипотентности *Oct4* активируется через дистальный энхансер в ЭСК, и через проксимальный энхансер в ЭпиСК [1].

Ранее нами было показано, что член семейства КН-доменных белков *Рсbp1* способен связываться с сайтом 2А дистального энхансера гена *Oct4* [2]. С помощью генного нокаута с использованием системы CRISPR-Cas9, мы элиминировали экспрессию *Рсbp1* в ЭСК мыши линии E14, что, однако, не повлияло на транскрипцию *Oct4* и жизнеспособность этих клеток. В литературе показано, что *Рсbp1*<sup>-/-</sup> эмбрионы доживают до стадии имплантации, но погибают к третьему дню после имплантации [3]. В связи с этим, нами был изучен эффект отсутствия *Рсbp1* в ходе *in vitro* дифференцировки ЭСК в ЭпиСК. В промежуточной фазе этой дифференцировки (4-5 день) наблюдалась значительная гибель и замедление пролиферации клеток. Однако, к 10 дню выжившие *Рсbp1*<sup>-/-</sup>

клетки образовывали жизнеспособные Oct4-позитивные клоны, не отличимые от клеток дикого типа.

Также было обнаружено, что большинство *Pscbp1*<sup>-/-</sup> клеток гибнет в ходе терминальной *in vitro* дифференцировки, индуцированной ретиноевой кислотой. Кроме того, они не были способны нормально дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков в составе тератом.

Полученные результаты указывают на важную роль *Pscbp1* в процессе перехода клеток из наивного плюрипотентного состояния в праймированное.

Исследование поддержано грантом РНФ 17-14-01407.

1. Morgani, S., Nichols, J. et al., BMC Dev. Biol. 17, 7 (2017).
2. Bakhmet E. I., Nazarov I. B. et al., J Phys: Conf Ser 917 (2017).
3. Ghanem L. R., Kromer A. et al., Mol Cell Biol. 36, 2 (2015).

### **Гетерологичная экспрессия и корректный рефолдинг рибосомального сайленс-фактора *Staphylococcus aureus***

*Бикмуллин А. Г.<sup>1</sup>, Трахтман Н. В.<sup>1, 2</sup>,  
Хусаинов И. Ш.<sup>1, 3</sup>, Валидов Ш. З.<sup>1</sup>, Юсупов М. М.<sup>1, 3</sup>*

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

<sup>2</sup> Институт микробиологии Штутгартского университета, Штутгарт, Германия

<sup>3</sup> Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии, Страсбург, Франция

[aydar.bikmullin@gmail.com](mailto:aydar.bikmullin@gmail.com)

Бактерии реагируют на неблагоприятные условия путем регуляции процессов, модулирующих экспрессию генов белков. Эта регуляция имеет важнейшее значение для преодоления стресса и адаптации к новым условиям, и включает в себя несколько путей, контролирующих процессы транскрипции и трансляции, а также стабильность мРНК и полипептида [1]. Существует ряд т. н. «неканоничных» белковых факторов, взаимодействующих с трансляционным аппаратом в условиях стресса. Они связываются с рибосомой и блокируют ее работу, что приводит к замедлению общего уровня синтеза белка (RelE, pY, RMF, HPF и EttA). Так микроорганизмы переживают неблагоприятный период. К факторам данного ряда относят RsfS (YbeB, RsfA, ribosomal silencing factor) – рибосомальный сайленс фактор. [2]

Белки семейства RsfS представлены во всех бактериях, а также в митохондриях и хлоропластах высших организмов. Они имеют единый механизм действия: RsfS связывается с белком L14 большой субъединицы

рибосомы, блокируя связывание большой и малой субъединиц, а значит – ассоциацию функционирующей 70S рибосомы. Путем такого замедления общего синтеза белка бактерии адаптируются к стрессу, возникающему при переходе клеток от логарифмической фазы роста к стационарной или при переходе от богатой питательной среды к бедной. [3]

Объектом наших исследований стал рибосомальный сайленс фактор патогенного микроорганизма *S. aureus* – возбудителя заболеваний кожи и тканей человека. [4] Целью нашей работы стало получение активного RsfS *S. aureus*.

Были подобраны условия гетерологичной экспрессии, очистки и корректного рефолдинга RsfS *S. aureus* из телец включений. Рибосомы *S. aureus* помещались в полудиссоциирующие условия, при которых ассоциированные 70S рибосомы находятся в динамическом равновесии с 30S и 50S субъединицами. Было определено, что рефолдированный RsfS *S. aureus*, наряду с нативно фолдированным в клетке белком, смещает равновесие в сторону диссоциированных субъединиц, а значит - имеет корректную конформацию и обладает активностью.

1. Elion Z. Ron, Bacterial stress response, The Prokaryotes (2006), C.16. – p. 589.
2. Starosta A., The bacterial translation stress response, 2014.
3. Hauser, R., Pech, M., Kijek, J., Yamamoto, H., Titz, B., Naeve, F., Tovchigrechko, A., Yamamoto, K., Szaflarski, W., Takeuchi, N., et al. (2012). RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors. PLoS Genet. 8, e1002815.
4. Khusainov, Structure of the 70S ribosome from human pathogen *Staphylococcus aureus*, 2016.

## Оптическая регистрация кальциевых волн в изолированном работающем сердце

*Бобков Д. Е.<sup>1</sup>, Степанов А. В.<sup>1</sup>, Байдюк Е. В.<sup>1</sup>,  
Полянская А. В.<sup>2</sup>, Сакута Г. А.<sup>1</sup>, Кубасов И. В.<sup>3</sup>, Дьерке Ш.<sup>3,4</sup>*

<sup>1</sup> *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

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

<sup>3</sup> *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия*

<sup>4</sup> *Национальный институт изучения сердца и легких им. Д. Дэвис  
Университета штата Огайо, Колумбус, США*

[bobkov@incras.ru](mailto:bobkov@incras.ru)

Были выполнены исследования частотных и амплитудных характеристик кальциевых волн, возникающих в ишемизированных участках миокарда в изолированных крысиных сердцах, перфузируемых по методу Лангендорфа. Для визуализации кардиомиоцитов и сосудистой сети перфузию сердец осуществляли раствором с добавлением флуоресцентного красителя Di-8-ANEPPS. Для визуализации кальциевых волн использовали краситель Fluo-4, для окраски митохондрий использовали TMRM. Исследование субэпикардальных слоев миокарда проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа, оснащенного резонансным сканером. Для проведения спектрального анализа был выбран участок миокарда размером 400 x 400 мкм, в котором производилась регистрация флуоресцентных сигналов в течение 110 сек с временным разрешением 17 кадров/сек. Спектральный анализ кальциевых осцилляций проводили с помощью быстрого преобразования Фурье и коррелограммно-периодограммного метода Уэлча. Построены графики зависимости амплитуды и частоты двух первых гармоник кальциевых осцилляций от расстояния до очага повреждения. Обнаружено, что кардиомиоциты, расположенные в зоне ишемического повреждения миокарда, характеризуются повышенным содержанием ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , сниженным митохондриальным потенциалом и сократительной активностью. В этих клетках по мере увеличения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  сперва увеличивается амплитуда нормальных колебаний концентрации ионизированного  $\text{Ca}^{2+}$ , а затем возникают автономные высокочастотные кальциевые осцилляции, которые могут быть вовлечены в формирование аритмий и способствовать развитию сократительной дисфункции при заболеваниях сердца. Затухающие колебания концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  были обнаружены в кардиомиоцитах, находящихся в состоянии гиперсокращения.

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

## **Применение малых интерферирующих РНК для эффективного подавления репродукции вируса гриппа А *in vitro***

Бродская А. В.<sup>1,2</sup>, Горшков А. Н.<sup>1,3</sup>, Тимин А. С.<sup>4</sup>, Бондаренко А. Б.<sup>1,5</sup>,  
Семенова А. А.<sup>6</sup>, Плотникова М. А.<sup>1</sup>, Васин А. В.<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава РФ,  
Санкт-Петербург, Россия

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

<sup>3</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет,  
Томск, Россия

<sup>5</sup> Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup> Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия,  
Санкт-Петербург, Россия

[Alexandra.b\\_05@mail.ru](mailto:Alexandra.b_05@mail.ru)

Использование малых интерферирующих РНК для противовирусной терапии является одним из новейших направлений исследований в области молекулярной биологии и медицины. В основном, медицинские исследования РНК-интерференции сосредоточены на применении такого подхода к онкологическим и системным хроническим заболеваниям. Однако как вирусные гены, так и клеточные микроРНК могут быть мишенями для высокоспецифической РНК-интерференционной терапии, позволяющей преодолеть проблему резистентности вирусов к лекарственным средствам.

В рамках данной работы была исследована возможность использования РНК-интерференции как нового терапевтического подхода в лечении вируса гриппа А *in vitro*. Были получены перспективные результаты вирус-ингибирующего действия препаратов синтетических коротких интерферирующих РНК (siРНК) по двум основным направлениям: компенсаторная микроРНК – терапия гриппа А, восполняющая измененный при инфекции уровень ряда ключевых клеточных микроРНК (миРНК), и siРНК – терапия, направленная на подавление экспрессии нескольких вирусных генов.

Для определения противовирусного потенциала компенсаторной миРНК терапии ВГА *in vitro* проводилось профилирование клеточных миРНК при вирусном заражении с помощью NGS и определены потенциальные мишени. В ходе скрининга вирус-ингибирующего действия выбранных миРНК, на клеточной культуре А549, было показано снижение вирусной репродукции для всех исследуемых миРНК, методом РГА, а также ингибирование вируса, по снижению уровня вирусного белка NP, определяемого методом ИФА, в клетках и культуральной жидкости для ряда миРНК. В итоге, для дальнейших экспериментов были отобраны

4 миРНК: let-7a, miR-16, miR-24, miR-194, дополнительные копии которых, в виде комбинации, доставляли с помощью гибридных SiO<sub>2</sub>-микроносителей [1]. Отмечено достоверное снижение уровня вируса в клетках, через 72 часа после заражения вирусом A/Puerto Rico/8/34 (0,01 moi) на 90 % относительно инфекционного контроля.

Параллельно была разработана система для подавления репликации ВГА на основе механизма siРНК-интерференции, в составе которой используется коктейль из трех siРНК, специфически узнающих консервативные последовательности трех ключевых вирусных генов: NS, PA, NP, а в качестве средства доставки siРНК применяются ранее описанные гибридные SiO<sub>2</sub>-микроносители [1]. Был проведен скрининг антивирусного действия 11 новых siРНК к вирусным генам NS, PA и NP доставляемых LFRNAiMAX и отобраны для дальнейших исследований siРНК PA-1630, NP-717 и NS-777, снижающие уровень внутриклеточного NP на 70 % и более. Было продемонстрировано достоверное снижение вируса, превосходящее действие озельтамивира по данным ИФА, вестерн блот, а также ПЦР в режиме реального времени при профилактической обработке клеток A549 SiO<sub>2</sub>-микроносителями, содержащими коктейль из трех siРНК. Также был показан специфический антивирусный эффект коктейля siРНК для вирусов гриппа А нескольких субтипов (H1N1, H5N2, H7N9), приводящий к снижению титра вирусного потомства на 2-4 lgTCID<sub>50</sub>/мл.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-15-00170.

1. Timin A.S. et al. Hybrid inorganic-organic capsules for efficient intracellular delivery of novel siRNAs against influenza A (H1N1) virus infection // Scientific Reports. 2017. V. 7. No. 1. P. 102.

## **Регуляция экспрессии p53-зависимых генов под действием ингибиторов p53-MDM2: Nutlin-3a и RG-7112**

Валиуллина А. Х., Змиевская Е. А., Ризванов А. А., Булатов Э. Р.

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Транскрипционный фактор p53 играет важную роль в многочисленных внутриклеточных процессах, таких как апоптоз, регуляция клеточного цикла, метаболизма и других. Также p53 известен как онкосупрессорный белок с хорошо изученной ролью при онкологических заболеваниях. Однако, последние литературные данные показывают, что белок p53 и его негативный регулятор убиквитин лигаза MDM2 могут быть также вовлечены в аутоиммунные процессы. В литературе имеется ряд примеров, описывающих ингибирование MDM2 с применением низкомолекулярных соединений, которые активируют p53 и индуцируют p53-опосредованные молекулярные процессы при аутоиммунных заболеваниях. Поэтому ингибирование MDM2 считается одной из перспективных стратегий активации p53 и его транскрипционных функций.

В настоящем исследовании сравнивалось изменение экспрессии p53-зависимых генов *p21*, *Mdm2*, *Puma*, при обработке мононуклеарных клеток периферической крови человека ингибиторами p53-MDM2, в частности Nutlin-3a и RG-7112 в увеличивающейся концентрации (5 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ). В качестве контроля использовались клетки, не обработанные ингибиторами.

Было показано, что инкубирование клеток с Nutlin-3a приводит к увеличению экспрессии гена *p21* в 17 раз (20 мкМ Nutlin-3a) по сравнению с контролем (1 % DMSO), *Mdm2* в 48 раз, *Puma* в 32 раза. Также было показано, что инкубирование клеток с RG-7112 приводит к увеличению экспрессии гена *p21* в 8 раз (20 мкМ RG-7112) относительно контроля, *Mdm2* в 14 раз, *Puma* в 8 раз. Полученные результаты свидетельствуют, о том, что повышение концентрации Nutlin-3a и RG-7112, приводит к существенному увеличению экспрессии p53-зависимых генов (*p21*, *Mdm2*, *Puma*).

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 16-34-60213 мол\_а\_дк.

## **Методика иммуноэлектронной микроскопии для исследования внеклеточных везикул**

*Внукова А. А.<sup>1</sup>, Багров Д. В.<sup>2</sup>, Семина С. Е.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> *Первый Московский государственный медицинский университет  
им. И. М. Сеченова Минздрава РФ, Москва, Россия*

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

<sup>3</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
им. Н. Н. Блохина Минздрава РФ, Научно-исследовательский институт  
канцерогенеза, Москва, Россия*

*biochem.fan@ya.ru*

Клетки секретируют во внеклеточное пространство везикулы сферической формы эндосомального и мембранного происхождения. Внеклеточные везикулы переносят биомолекулы, которые способны приводить к геномным и эпигеномным изменениям в поглотивших их клетках [1]. Одним из немногих методов контроля выделения цельных внеклеточных везикул из секрета клеток является их визуализация методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием иммуномечения коллоидным золотом. Цель данной работы состояла в том, чтобы отработать методику иммуно-электронной микроскопии.

Исследование проводилось на везикулах, выделенных из среды культивирования линии раковых клеток MCF-7, а также полученных из нее сублиний MCF-7/T и MCF-7/M, резистентных к тамоксифену и метформину соответственно. Везикулы выделяли методом дифференциального центрифугирования. Для иммуномечения использовали антитела против мембранного белка CD9 – одного из маркеров внеклеточных везикул [2]. Методика иммуномечения включала следующие основные шаги: нанесение везикул на сетки, нанесение антител, нанесение конъюгатов из коллоидного золота с белком А и контрастирование 1 % раствором уранил ацетата. После каждого шага, кроме последнего, поверхность блокировали альбумином и отмывали. Образцы исследовали на микроскопе JEM-1011 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Для всех трех образцов размер везикул составил от 50 до 250 нм. Специфичность иммуномечения оценивали по соотношению специфически связанных меток к неспецифическому связыванию. Оно составило равно не менее 10 для всех трех образцов.

Использование иммуно-ПЭМ позволяет провести достоверный контроль выделения внеклеточных везикул из среды культивирования клеток.

1. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J. Cell Biol. 200, 373–383 (2013).
2. Yoshioka Y., Konishi Y., Kosaka N., et al. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. J. Extracell. Vesicles 2: 20424 (2013).

## **Сравнительный анализ биоподобия рекомбинантного дарбэпоэтина альфа человека и оригинального в составе препарата Аранесп**

*Воронина Е. В.<sup>1</sup>, Кононихин А. С.<sup>2</sup>, Индейкина М. И.<sup>2</sup>, Пермяков С. Е.<sup>3</sup>, Кутушенко В. П.<sup>4</sup>, Марыгин Р. А.<sup>1</sup>, Черепушкин С. А.<sup>1</sup>, Клишин А. А.<sup>1</sup>, Орлова Н. В.<sup>1</sup>, Николаева В. В.<sup>1</sup>, Годованный А. В.<sup>1</sup>, Серегин Ю. А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино, Россия

<sup>4</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

[voronina-ek@bk.ru](mailto:voronina-ek@bk.ru)

Разработан рекомбинантный биоаналог дарбэпоэтина, входящего в состав препарата Аранесп (Amgen, США). Дарбэпоэтин альфа является гипергликозилированным производным эритропоэтина и обладает пролонгированным временем жизни в плазме крови.

**Цель.** Провести анализ предложенной биоподобной молекулы с использованием чувствительных ортогональных методов с целью подтверждения профиля качества в рамках изменчивости оригинального дарбэпоэтина.

**Методы.** Изучение первичной структуры осуществляли методом пептидного картирования с масс-спектрометрической (МС) детекцией. Вторичную структуру исследовали методами кругового дихроизма в дальней УФ-области и ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье. Идентичность третичной структуры подтверждали методом ЯМР-спектроскопии, анализом кругового дихроизма в ближней УФ-области и спектрофлуориметрией. Определяли содержание свободных тиольных групп методом Элмана. Количественный и качественный анализ гликанов и сиаловых кислот выполняли методом ВЭЖХ/МС. Электрофоретические профили и содержание родственных примесей исследовали методами изофокусирования и гель-электрофореза с иммуноблоттингом.

**Результаты.** Аминокислотная последовательность соответствует оригинальному дарбэпоэтину. Показана эквивалентность содержания всех

элементов вторичной структуры. Анализ ЯМР-спектров подтвердил идентичность третичной структуры. Выявлено совпадение спектров поглощения, сходство локального окружения ароматических аминокислотных остатков, отсутствие свободных тиольных групп, соответствие температурных профилей собственной флуоресценции. Обнаружено незначительное различие в содержании N-гликанов. Профиль заряженных изоформ и относительное содержание сиаловых кислот идентично. Не выявлено различий в содержании родственных и производственных примесей.

**Выводы.** Сравнительный анализ комбинацией физико-химических методов исследования не обнаруживает статистически значимых различий между предложенной молекулой дарбэпоэтина и оригинальной, входящей в состав препарата Аранесп.

## **Влияние молекулярного краудинга, моделируемого полиэтиленгликолем на вторичную структуру протимозина $\alpha$**

*Гагарская Ю. А.<sup>1</sup>, Поварова О. И.<sup>1</sup>, Родина Н. П.<sup>1,2</sup>,  
Карасёв М. М.<sup>3</sup>, Кузнецова И. М.<sup>1</sup>, Туроверов К. К.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

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

<sup>3</sup> *University of Helsinki, Helsinki, Finland*

[julgag@yandex.ru](mailto:julgag@yandex.ru)

Известно, что около 50 % белков эукариотического протеома являются внутренне неупорядоченными (Intrinsically Disordered Proteins, IDPs) [1]. Несмотря на отсутствие жесткой трехмерной структуры, IDPs в клетке выполняют ряд важных биологических функций, а нарушение их нормального функционирования, сопровождающееся их агрегацией и фибриллизацией, связано с развитием тяжелых заболеваний.

Исследование влияния молекулярного краудинга в широком диапазоне pH на структурные свойства IDP, протимозина  $\alpha$ , показало, что в кислой области pH присутствие краудинг-агентов (полиэтиленгликолей различной молекулярной массы) приводит к увеличению содержания  $\alpha$ -спиральной структуры в белке, причем величина эффекта не зависит от молекулярной массы полимера. Это может быть обусловлено взаимным проникновением полимерных клубков друг в друга в изученном диапазоне концентраций полимера. Показано, что присутствие краудинг-агентов в растворе способствует преципитации белка в области pI. Эффективность этого процесса зависит как от концентрации краудинг-агентов, так и от их молекулярной массы, что может быть связано с агрегацией незаряженного белка вследствие значительного ограничения доступного объема. Поскольку данные литературы свидетельствуют о том, что протимозин  $\alpha$  может формировать амилоидные фибриллы [2], была проанализирована способность полученного осадка связывать флуоресцентный зонд тиюфлавин Т (ThT), используемый для диагностики образования амилоидных фибрилл. Незначительное возрастание интенсивности флуоресценции ThT, зарегистрированное в растворах, содержащих агрегаты протимозина  $\alpha$ , свидетельствует об аморфном характере этих агрегатов, что было подтверждено методами электронной и конфокальной микроскопии.

Работа поддержана Программой МКБ Президиума РАН и РФФИ 16-04-01614.

1. Tompa P., Trends in biochemical sciences, 509-516, 37-12 (2012).
2. Pavlov N.A. et al., FEBS letters, 37-40, 517 (2002).

# **Интеграция транскриптомных и метаболомных данных для изучения динамики регуляции метаболических потоков в макрофагах в процессе иммунного ответа**

*Гайнуллина А. Н.<sup>1</sup>, Сергушичев А. А.<sup>2,3</sup>, Артёмов М. Н.<sup>2,3</sup>*

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

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет  
информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Департамент патологии и иммунологии Университета Дж. Вашингтона  
в Сент-Луисе, Сент-Луис, США

[anastasiia.gainullina@gmail.com](mailto:anastasiia.gainullina@gmail.com)

На сегодняшний день экспериментальные технологии в биологии и медицине позволяют получать большие объемы данных, в связи с чем, их анализ и интерпретация требуют развития новых подходов и вычислительных методов. Одним из наиболее актуальных направлений в этой области является анализ метаболических потоков по данным экспрессии генов и метаболомного профилирования.

Метаболизм можно представить как набор биохимических реакций, реализующих жизнедеятельность клетки. Объединенные в одну большую биохимическую сеть, они являются предметом изучения метода анализа метаболических потоков, или FBA (Flux Balanced Analysis). Этот метод математического моделирования позволяет оценить различные режимы работы изучаемой сети по распределению потоков через ее реакции.

Объектом исследования в настоящей работе является метаболизм макрофагов. Целью данного проекта является механистическое объяснение наблюдаемых при их M1 активации процессов. В связи с этим была поставлена задача модифицировать имеющуюся FBA-модель метаболизма макрофагов так, чтобы она отражала самые последние представления об их M1 активации, полученные в ходе молекулярно-биологических экспериментов.

Согласно данным статьи Jha et al. [1], процесс M1 активации макрофагов сопровождается секрецией (помимо уже известных метаболитов) противопатогенного и в то же время противовоспалительного вещества итаконата. Этот процесс сопровождается разрывом цикла Кребса в двух местах, ответственных за метаболизм НАДФН, что в значительной степени перераспределяет потоки через многие другие реакции. В M1 поляризованных макрофагах также наблюдается активация аспартат-аргинино-сукцинатного шунта, связывающего цикл Кребса с циклом мочевины. Этот шунт крайне необходим для корректной работы видоизмененного цикла Кребса и одновременного производства оксида азота.

Все выше обозначенные процессы отражены в нашей FBA-модели. Ее использование позволяет увидеть координацию между различными биохимическими путями при поляризации макрофагов на уровне системы целой клетки.

1. Jha A.K., Huang S.C.-C. et al., "Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization", *Immunity* 42 (2015).

### **Комплексная оценка воздействия загрязнения воздуха на анатомические и физиологические параметры лишайника *Parmelia sulcata* Taylor в Калининградской области**

Галиева А. А., Кузьминкова А. А., Сокол А. Д.

*Институт живых систем Балтийского федерального университета  
им. Иммануила Канта, Калининград, Россия*

**Актуальность.** В связи с возрастающими потребностями человеческой популяции растет антропогенная нагрузка на городские экосистемы. Методы лабораторного анализа на территории Калининградской области не позволяют оценить негативное воздействие загрязнения на живые системы в отличие от методов биоиндикации. Лишайники уже заявили себя как удобный объект для подобных исследований. К тому же изучение изменений, происходящих в талломах лишайников при загрязнении среды, представляет большой фундаментальный интерес.

**Цель.** Комплексная оценка воздействия загрязнения воздуха на анатомические и физиологические параметры лишайника *Parmelia sulcata* Taylor в Калининградской области.

#### **Задачи.**

1. Определение содержания фотосинтетических пигментов в образцах лишайника *Parmelia sulcata*;
2. Измерение относительной толщины структурных слоев талломов лишайников;
3. Установление корреляционных связей между изученными показателями состояния лишайника *Parmelia sulcata*.

**Объект.** Лишайник вида *Parmelia sulcata* Taylor.

**Методы.** Отбор образцов, микроскопирование поперечных срезов, выделение пигментов (по методике Барнса), спектрофотометрия, статистический анализ (U-критерий Манна-Уитни, критерий корреляции Пирсона).

### **Выводы.**

1. Анализ содержания фотосинтетических пигментов выявил достоверные различия концентрации хлорофилла *a* в исследуемых районах Калининградской области. Достоверных различий концентрации хлорофилла *b* не найдено.

2. Изучение анатомических особенностей лишайника выявило достоверные различия в относительных значениях толщины альгального слоя и сердцевины в исследуемых районах Калининградской области.

3. По данным корреляционного анализа обнаружена умеренная корреляция относительной толщины альгального слоя и концентрации хлорофилла *a* в талломах лишайника.

Требуются дальнейшие исследования с большей выборкой для подтверждения полученных данных с большей точностью и разрешения некоторых фундаментальных вопросов.

## **Адаптация вируса клещевого энцефалита к новым видам клеток и характеристика его генетической изменчивости 3'-UTR геномной РНК**

*Гладышева А. В.<sup>1,2</sup>, Терновой В. А.<sup>1</sup>, Пономарева Е. П.<sup>1</sup>,  
Микрюкова Т. П.<sup>1</sup>, Протопопова Е. В.<sup>1</sup>, Коновалова С. Н.<sup>1</sup>,  
Чаусов Е. В.<sup>1</sup>, Швалов А. Н.<sup>1</sup>, Локтев В. Б.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

[anastasiya.gladysheva@gmail.com](mailto:anastasiya.gladysheva@gmail.com)

Клещевой энцефалит является одной из самых распространенных и опасных природно-очаговых инфекций. Вопрос генетической тождественности адаптированных лабораторных штаммов ВКЭ с природными вариантами, циркулирующими в очагах этой инфекции, остается фактически не исследованным. А также генетическая изменчивость 3'-UTR геномной РНК вируса клещевого энцефалита вызывает большой интерес и наталкивает на существование некоторого механизма редактирования 3'-UTR при адаптации вируса к новым видам клеток.

В 2013 году из мозга, погибшей от энцефалита женщины, был выделен штамм С11-13 ВКЭ. Адаптация к клеткам производилась путем серии пассажей на культурах почек эмбриона свиньи (РЕК), человека и нейроклетках мыши. Анализ полного генома полученных вариантов С11-13 показал, что адаптированный к клеткам штамм С11-13 приобретает множественные аминокислотные замены, по сравнению с первичным вариантом ВКЭ. Ключевые аминокислотные замены были картированы относительно трехмерных моделей белков NS3 и NS5. Анализ моделей показал, что аминокислотные замены локализованы в активных центрах сериновой протеазы (NS3), геликазы и вирусной РНК зависимой РНК полимеразы (NS5). Было также обнаружено, что в гене NS3 замена гистидина на глутамин произошла со сменой заряда с положительного на отрицательный. Далее, нами были обнаружены делеции в 3'-UTR и проведено моделирование вторичной структуры 3'-UTR для трех основных генотипов ВКЭ. Выявлено, что основную роль в изменениях размера вирусного генома играет существенная гетерогенность варибельной области 3'-UTR вирусного генома. Так, в процессе пассирования штамма С11-13 на клетках РЕК происходит увеличение длины варибельного региона 3'-UTR со 178 н. до 215 н. При этом, скорость репликации вируса увеличилась на несколько порядков.

Наличие выраженных делеций в 3'-UTR позволяет предположить наличие механизма «редактирования» 3'-UTR ВКЭ. Данный механизм изменения 3'-UTR принципиально важен для обеспечения эффективной репликации ВКЭ к клеткам различных хозяев.

## Изучение функционирования набора промоторов в *Rhodococcus rhodochrous*

Гречишникова Е. Г., Шемякина А. О., Лавров К. В., Яненко А. С.

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

[sel-sanguine@yandex.ru](mailto:sel-sanguine@yandex.ru)

Использование набора промоторов, детально охарактеризованных по силе и характеру активности, является неотъемлемым этапом при генетическом конструировании штаммов-продуцентов. Такие наборы разработаны для бактерий *E. coli*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, и др., но практически отсутствуют для перспективных бактерий *Rhodococcus*.

В настоящей работе впервые исследовано функционирование в *R. rhodochrous* четырех промоторов: Psod (гена супероксиддисмутазы), Pefu (гена фактора элонгации трансляции) из *C. glutamicum*; Pnh (генов нитрилгидратазы) из *R. rhodochrous*, и Pcr1 (гена изоцитрат-лиазы) из *R. erythropolis*. Промоторы были охарактеризованы в штаммах *R. rhodochrous* по экспрессии двух репортёрных генов – хлорамфениколацетилтрансферазы *cat* из *S. acrimycini* и ациламидазы *aam* из *R. erythropolis*.

Уровни экспрессии *cat* измеряли по устойчивости к хлорамфениколу (Cm-R) путем выращивания бактерий на богатой и минимальной агаризованных средах с концентрациями Cm от 4 до 25 мг/л. Уровни экспрессии *aam* измеряли по активности фермента ациламидазы при выращивании на аналогичных жидких средах, в динамике, в течение четырех суток.

Уровни Cm-R коррелировали с уровнями *aam* активностей на обоих вариантах среды. Мы показали, что различие промоторов на трехкратную концентрацию Cm соответствует различию на порядок по активности *aam*. Дополнительно мы продемонстрировали, что оценка силы вторым методом более точная – она позволяет выявлять двухкратное различие в силе промоторов, которое не выявляется при использовании *cat*.

Анализ динамики активности *aam* показал, что на разных средах более сильные промоторы Pnh и Pefu проявляют максимальную активность в разных фазах роста культуры. Активность более слабых промоторов Psod и Pcr1 не зависела от фазы роста. Уровни синтеза белка ациламидазы коррелировали с уровнями ациламидазной активности клеток. Количество белка ациламидазы, синтезируемое с использованием двух наиболее сильных промоторов, достигало 30 % от всех растворимых клеточных белков.

# **Анализ изменений в протеасомо-ассоциированном протеоме клеток множественной миеломы человека при сочетанной обработке специфическими препаратами-ингибиторами**

Горбач Д. П., Миттенберг А. Г.

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

[daria.gorba4@yandex.ru](mailto:daria.gorba4@yandex.ru)

Множественная миелома человека (ММ) – заболевание, характеризующееся сверхэкспрессией легких цепей иммуноглобулинов, а также аномальной пролиферацией плазматических клеток в костном мозге [1]. Несмотря на активное изучение этого заболевания, пока не удалось найти действенного метода лечения, поэтому множественная миелома человека все еще остается неизлечимой. Тем не менее, в настоящее время доказана высокая чувствительность клеток ММ к препаратам-ингибиторам протеасом (PIs). В частности, в терапии ММ широко используются такие препараты как *Бортезомиб* и *Карфилзомиб*, уже прошедшие этапы клинических испытаний FDA и доказавшие свою эффективность [2]. Однако, несмотря на перспективность использования данных терапевтических агентов, очевидно, что для успешного лечения ММ недостаточно воздействия только на одну клеточную мишень (протеасому) – таким образом, активно разрабатываются подходы, основанные на эффекте синергии между PIs и препаратами, подавляющими, например, активность топоизомераз [3, 4].

Задача данной работы – выявление и анализ эффекта синергии между препаратами-ингибиторами в клетках ММ путем выделения наборов короткоживущих регуляторных белков, уникальных как для каждой клеточной линии, так и для каждого сочетания препаратов-ингибиторов. Важно то, что белки, экстрагированные из обеих клеточных линий, отличаются типом их протеолиза – убиквитин-зависимого, либо убиквитин-независимого. Отобранные таким образом белки могут служить мишенями для агентов терапевтического воздействия – как прямого, так и опосредованного.

Были использованы две клеточные линии ММ – Im9 и RPMI8226, различные по статусу онкосупрессора p53. Проверку эффективности и селекцию вариантов сочетанных обработок проводили с помощью теста МТТ и проточной цитометрии. Таким образом, были отобраны следующие сочетания: *Бортезомиб* и *Ресвератрол*, *Бортезомиб* и *Камптотецин*, *Карфилзомиб* и *Камптотецин*, *Карфилзомиб* и *Флавопиридол*. С помощью LC-MALDI TOF/TOF масс-спектрометрии в каждом из 16 образцов ядерных и цитоплазматических экстрактов было достоверно идентифицировано от 20 до 200 белков, среди которых обнаружены как уникальные только для контрольных проб или для определенного типа обработки, так и общие для всех образцов белки. При этом разнообразие их клеточных функций

достаточно широко: ДНК- и РНК-связывающие белки, комплексы ремоделирования хроматина, элементы цитоскелета, транскрипционные факторы, белки теплового шока, белки клеточной адгезии, транспортные белки.

1. Landgren, O., & Morgan, G. J. (2014). Biologic Frontiers in Multiple Myeloma : From Biomarker Identification to Clinical Practice, 20(4), 804–814.
2. Dick, L. R., & Fleming, P. E. (2010). Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 15(5–6), 243–249.
3. Kisselev, A. F., van der Linden, W. A., & Overkleeft, H. S. (2012). Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chemistry & Biology*, 19(1), 99–115.
4. Orłowski, R. Z. (2004). Bortezomib in combination with other therapies for the treatment of multiple myeloma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 2 Suppl 4, S16-20.

## Молекулярные механизмы потери приона [ $PSI^+$ ] в присутствии белка Sup35 с заменами Q33K и A34K

Данилов Л. Г.<sup>1</sup>, Бондарев С. А.<sup>1,2</sup>, Белоусов М. В.<sup>1</sup>, Журавлева Г. А.<sup>1,2</sup>

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

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

[lavrentydanilov@gmail.com](mailto:lavrentydanilov@gmail.com)

Прионы – это инфекционные или наследуемые факторы белковой природы. На сегодняшний день известен ряд неизлечимых заболеваний, относящихся к классу губчатых энцефалопатий, вызываемых прионами, например, болезнь Кройтсфельда-Якоба, Куру, скрейпи и др. Присутствие приона в организме обычно сопровождается агрегацией определенного белка. Эти агрегаты обладают инфекционными свойствами, поскольку индуцируют агрегацию такого же белка, а последующая их фрагментация позволяет приону распространяться.

Фактор [ $PSI^+$ ] – это прионная изоформа белка Sup35 (фактор терминации трансляции дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*). Его возникновение связано с агрегацией Sup35<sup>p</sup>, которая приводит к снижению точности терминации трансляции и прочтению преждевременно возникших стоп-кодонов как значащих. Ранее нами была описана мутантная аллель *sup35-M0*, кодирующая белок с заменами двух незаряженных аминокислотных остатков, глутамина (Q) и аланина (A), на заряженные остатки лизина (K) в 33 и 34 положениях. Эта аллель приводит к потере фактора [ $PSI^+$ ], причем по эффективности элиминации приона она значительно превосходит другие мутантные аллели в гене *SUP35*, изгоняющие прион. При этом белок Sup35-M0 способен самостоятельно формировать инфекционные агрегаты *in vitro*. Однако молекулярный механизм потери приона [ $PSI^+$ ] в присутствии мутации *sup35-M0* не был ранее охарактеризован.

В ходе этой работы мы показали, что *in vivo* белок Sup35-M0 включается в состав агрегатов, состоящих из Sup35<sup>p</sup> дикого типа. На основании этих данных мы можем предполагать, что элиминация приона [ $PSI^+$ ] может быть связана с дестабилизацией структуры агрегатов из-за того, что положительные заряды остатков лизина, входящие в состав Sup35-M0 нарушают их структуру, что в свою очередь, может приводить к снижению фрагментации агрегатов системами клетки.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (17-54-150002, 16-04-00202), а также ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

## **Разработка штаммов *Escherichia coli* для биокаталитического получения L-аспарагиновой кислоты**

Дерби́ков Д. Д., Новиков А. Д., Синолицкий М. К., Яненко А. С.

*Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

[den\\_derb@mail.ru](mailto:den_derb@mail.ru)

Использование микроорганизмов для экологически безопасного получения аминокислот является одним из приоритетных направлений развития биотехнологии. К примеру, в различных областях промышленности применяется L-аспарагиновая кислоты, получаемая в настоящее время биокаталитическим способом. Биокатализатором в этом процессе являются иммобилизованные бактериальные клетки, имеющие высокую активность фермента аспартат-аммоний-лиазы (аспартазы). В связи с высокой востребованностью L-аспарагиновой кислоты в промышленности, сохраняется актуальность проведения работ по созданию новых, более эффективных биокатализаторов на основе бактериальных штаммов.

Целью данной работы было создание штаммов-биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты с высоким уровнем аспартазной и низким уровнем побочной активностей. Современные технологии конструирования, используемые в работе, включали методы генетической инженерии и рекомбинирования.

Штамм, созданный в ходе работы, был получен с помощью объединения в хромосоме двух генетических модификаций: замещения собственного промотора гена аспартазы *aspA* на фаговый конститутивный промотор, а также удаления генов фумараз *fumA* и *fumC*, контролирующих образование побочного продукта – L-яблочной кислоты. Показано, что аспартазная активность полученного штамма возросла с 8,4 ед. до 254–256 ед\*, при этом в полученном штамме снижалось образование L-яблочной кислоты (с 34 г/л до 1,5 г/л).

Для создания промышленных форм биокатализатора была проведена иммобилизация полученного штамма в матрицу сшитого полиэтиленimina. Показано, (что при использовании нового биокатализатора в реакционной среде резко снижалось содержание яблочной кислоты (с 5-6 г/л до менее 0,5 г/л). За весь период работы продуктивность биокатализатора составила около 1400 кг аспарагиновой кислоты /кг БК, что в 7 раз превысило продуктивность базового биокатализатора, применяющегося в настоящее время.

\*За единицу (ед.) активности принято количество L-аспарагиновой кислоты в мкМ), образованной 1 мг клеток (по сухому весу) за 1 минуту.

## **Изменение экспрессии гистондеацетилазы 1 в нервной ткани речного рака после аксотомии**

*Дзрелян В. А., Бережная Е. В., Негинская М. А., Рудковский М. В.*

*Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия*

[dzreya2016@mail.ru](mailto:dzreya2016@mail.ru)

Нейротравма – основная причина смерти и инвалидизации населения в возрасте от 5 до 44 лет. На сегодняшний день практически отсутствуют эффективные нейропротекторные лекарственные препараты. Для изучения молекулярных механизмов нейродегенерации при перерезке нерва (аксотомии) с помощью метода вестерн-блот мы исследовали изменения экспрессии эпигенетического регулятора биосинтеза белков гистондеацетилазы 1 (HDAC1) в брюшной нервной цепочке речного рака (БНЦ), взятой в качестве модельного нейроглиального препарата. БНЦ состоит из 6 ганглиев, содержащих 500-1000 нейронов, соединенных между собой коннективами, состоящими из нескольких сот аксонов.

Перерезка коннектив дает 6 ганглиев, аксотомированных с двух сторон. Контролем служили неперерезанные БНЦ. После перерезки контрольные и подопытные образцы инкубировались при комнатной температуре 22–24 °С в физиологическом растворе ван Харревельда 1 или 3 часа. Затем они гомогенизировались на льду ультразвуковым гомогенизатором, белки цитоплазматической фракции экстрагировались и проводился иммуноблоттинг методом полусухого переноса с использованием Trans-Blot Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, США). Для анализа использовали систему гель-документирования Fusion SL (Vilber Lourmat, Франция) и программу Vision Capt. Статистическая оценка достоверности отличий проводилась путем однофакторного дисперсионного анализа для повторных измерений (One Way Anova RM). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Через 1 час после аксотомии экспрессия HDAC1 в БНЦ не изменялась, но через 3 часа она повышалась в 1,5 раза по сравнению с контролем. HDAC1 экспрессируется в большинстве клеток организма с преимущественно ядерной локализацией и функционирует как репрессор транскрипции, но может перемещаться в цитоплазму и регулировать активность различных белков. Полученные результаты свидетельствуют об участии HDAC1 в сигнальных механизмах управления функциями клеток в условиях нейротравмы (аксотомии).

Работа поддержана грантом МОН РФ № 6.6324.2017/8.9.

## Исследование структуры наночастиц методом МУРН на примере нанолечения доксолип

*Дмитриев И. Д., Иванов А. И., Киселев М. А.*

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

[dmitriev.ivan.d@gmail.com](mailto:dmitriev.ivan.d@gmail.com)

Работа посвящена исследованию морфологии и структуры нанолечения доксолип методом малоуглового рассеяния нейтронов.

Нанолечение доксолип разработано в Институте биомедицинской химии, г. Москва. Оно представляет из себя наночастицу из соевых фосфолипидов, в которую встроено водонерастворимое лекарство доксорубин. Уникальной особенностью технологии формирования наночастиц доксолипа является использование водных растворов мальтозы. При этом весовое соотношение фосфолипидов к мальтозе составляет 1/4. Фармацевтические концентрации лекарства при его применении составляют 20–25 %. Размер наночастицы доксолип варьируется в диапазоне от 400 Å до 200 Å. Используемые в Институте биомедицинской химии методы не позволяют ответить на вопрос о морфологии наночастицы доксолипа, а также о внутренней структуре этой наночастицы. Для ответа на вопрос о морфологии наночастиц доксолипа и их внутренней структуре был применен метод малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН). Метод МУРН позволяет исследовать область малых концентраций (5 %–25 %), что невозможно сделать методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР), который в свою очередь имеет место только при концентрациях от 25 % до 40 %.

Измерения выполнялись на установке ЮМО реактора ИБР-2 при трех концентрациях доксолипа в тяжелой воде 5 %, 10 % и 25 % и температурах 20 °C и 37 °C. Обработка спектров проводилась программой SANSview.

Наиболее точно удалось описать спектры при концентрации доксолипа в тяжелой воде 5 %:  $\chi^2=2.7$  при температуре образца 20 °C и  $\chi^2=1.6$  при температуре образца 37 °C. Увеличение концентрации доксолипа приводит к возникновению межвезикулярного взаимодействия, которое учитывалось методом твердых сфер при концентрации доксолипа 25 %. При концентрации доксолипа в тяжелой воде 10 % расчет без учета структурного фактора дает  $\chi^2=7.6$ . Учет структурного фактора при концентрации доксолипа 25 % дает  $\chi^2=10.3$ , без учета структурного фактора –  $\chi^2=22.0$ . Анализ спектров проводился с учетом функции разрешения инструмента. Сделано сравнение точности расчетов с учетом функции разрешения инструмента и без учета. Результаты показывают, что методом МУРН можно исследовать нанолечения малых концентраций вплоть до фармацевтических.

Работа выполнена при финансировании грантом РФФИ 14-12-00516.

## **Посттрансляционные модификации клеточных и внеклеточных протеасом линии клеток миелогенной лейкемии человека**

*Дьяконов Е. Е.<sup>1,2</sup>, Артамонова Т. О.<sup>3</sup>, Ходорковский М. А.<sup>3</sup>, Цимоха А. С.<sup>2</sup>*

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

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

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

[diakonov2007@mail.ru](mailto:diakonov2007@mail.ru)

26S-протеасома – эукариотический мультисубъединичный белковый комплекс, осуществляющий регулируемую убиквитин-зависимую деградацию белков [1]. Кроме протеасом, присутствующих в ядре и цитоплазме клетки, также было показано наличие протеасом и в межклеточном пространстве [2]. Функции внеклеточных протеасом неизвестны, однако был выявлен повышенный уровень экспорта протеасом во внеклеточное пространство при опухолевой трансформации клеток [3]. Анализ внеклеточных протеасом по присутствию специфических посттрансляционных модификаций (ПТМ) и их функциональной значимости в экспорте протеасом не проводился. В связи с этим, целью настоящей работы явился сравнительный анализ ПТМ клеточных и внеклеточных протеасом, аффинно очищенных из клеток миелогенной лейкемии человека линии K562 и среды, кондиционированной клетками K562.

Белки аффинно-очищенных протеасом разделяли с помощью одномерного SDS-гель-электрофореза. Белковые образцы из электрофоретических зон анализировали с помощью масс-спектрометра ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией. Белки и ПТМ идентифицировали с помощью программных комплексов Mascot и Prospector MS-Fit методом «пептидный фингерпринт» по международным белковым базам данных UniProtKB/SwissProt. В результате биоинформатического анализа данных масс-спектрометрии мы обнаружили впервые фосфорилирование по серину в 181-м положении субъединицы  $\beta 3$  (PSMB3) внеклеточных протеасом, которое, как мы полагаем, является первым кандидатом на внесение в список посттрансляционных модификаций, специфических для внеклеточных протеасом. Наряду с данной ПТМ также впервые мы обнаружили 36 сайтов ПТМ (фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование и сукцинирование) у клеточных, и 20 ПТМ у внеклеточных протеасом. Считается, что с помощью специфических ПТМ могут регулироваться функции протеасом, локализация и транспорт их в клетке. Мы предполагаем, что аналогичным образом специфические для внеклеточных

протеасом ПТМ также могут регулировать их активность или участвовать в транспорте комплексов во внеклеточное пространство, поэтому полученные данные могут быть существенны для определения функциональной значимости протеасом во внеклеточном пространстве.

Работа выполнена при финансовой частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-04-01168) и Российского научного фонда (проект 16-14-10343).

1. Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L., Annu. Rev. Biochem. 65 801-847 (1996).
2. Sixt S.U., Dahlmann B. Biochim Biophys Acta (BBA) Mol Basis Dis 1782(12) 817–823 (2008).
3. Henry L., Lavabre-Bertrand T., Vercambre L., Ramos J., Carillo S., Guiraud I., Pouderoux P., Bismuth M., Valats J. C., Demattei C., Duny Y., Chaze I., Funakoshi N., Bureau J. P., Daères J. P., Blanc P. Gut.58 833-838 (2009).

### **Разработка подхода к анализу незаряженных аналогов олигонуклеотидов методом гель-электрофореза**

*Дюдеева Е. С., Павлова А. С.*

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

*[jenyadudeeva@gmail.com](mailto:jenyadudeeva@gmail.com)*

На сегодняшний день олигонуклеотиды и их аналоги являются уже распространенными инструментами для решения широкого спектра задач в теоретических и прикладных исследованиях. Современные синтетические подходы позволяют синтезировать олигонуклеотидные конструкции различного строения. Особое внимание привлекают незаряженные олигонуклеотидные конструкции, а именно: пептидилнуклеиновые кислоты, морфолиновые и фосфорилгуанидиновые аналоги [1]. В структуре таких олигомеров сохранены азотистые основания, т.е. способность к комплементарному связыванию с ДНК или РНК, при этом отрицательно заряженный углеводофосфатный остов заменен на электронейтральный, что приводит к увеличению стабильности комплементарных комплексов [2]. Частично или полностью незаряженные олигонуклеотиды используются, в частности, при разработке высокочувствительных микрочипов [3] и биосенсоров, а также рассматриваются как перспективные терапевтические средства [4]. Однако чаще всего практическое использование модифицированных олигомеров требует высокой степени чистоты используемых препаратов. В связи с этим использование незаряженных олигомеров ограничивается из-за

невозможности их анализа широко используемым и доступным методом гель-электрофореза.

Целью данной работы являлась разработка подхода к электрофоретическому анализу незаряженных производных олигонуклеотидов. Для решения данной задачи мы предложили адаптировать электрофорез в полиакриламидом геле в присутствии додецилсульфата натрия. На примере олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих от одной незаряженной фосфорилгуанидиновой группировки до полностью электронеutralного остова, изучены факторы, влияющие на их электрофоретическую подвижность. Показано, что в присутствии додецилсульфата натрия электронеutralные аналоги нуклеиновых кислот приобретают эффективный отрицательный заряд.

Электрофоретическая подвижность незаряженных аналогов олигонуклеотидов – пептидилнуклеиновых, морфолиновых и фосфорилгуанидиновых кислот, – продемонстрирована впервые [5].

1. Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A., *Acta Naturae*, 2014, 6, 116–118.
2. Schwarz, F. P., Robinson, S., Butler, J. M., *Nucleic Acids Research*, 1999, 24, 4792–4800.
3. Qiao, W., Kalachikov, S., Liu, Y., Levicky, R., *Analytical Biochemistry* (2013), 434, 207–214.
4. Gupta, A., Mishra, A., Puri, N., *Journal of Biotechnology* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.026>
5. Pavlova, A. S., Dyudeeva, E. S., Kupryushkin, M. S., Amirkhanov, N. V., Pyshnyi, D. V., Pyshnaya, I. A., *Electrophoresis*, 2017, <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201700415>

## **Исследование лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов методом проточной цитометрии у больных, перенесших острый инфаркт миокарда**

*Ермаков А. И.<sup>1</sup>, Вавилова Т. В.<sup>2</sup>, Гайковая Л. Б.<sup>1</sup>, Сироткина О. В.<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup> *Северо-Западный государственный медицинский университет  
им. И. И. Мечникова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>3</sup> *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

Известно, что тромбоциты не только являются участниками гемостаза, но и имеют непосредственное отношение к иммунитету, протеканию воспалительных реакций и репарации поврежденных тканей. Эти свойства связаны с секрецией биологически активных соединений, и способностью тромбоцитов вступать в контакт с различными клетками, циркулирующими в кровотоке. Характерной реакцией тромбоцитов на воспаление служит образование лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов (ЛТА), которое происходит в результате их активации и приводит к запуску целого каскада провоспалительных реакций. Появление ЛТА может служить диагностическим признаком воспалительного ответа организма, в частности при остром инфаркте миокарда [1–4].

**Целью** данного исследования было изучение содержания ЛТА методом проточной цитометрии у больных, перенесших острый инфаркт миокарда (ОИМ).

**Материалы и методы.** В исследование были включены 66 пациентов (71 % мужчин и 29 % женщин) в возрасте  $59 \pm 11$  лет с диагнозом ОИМ, получавших двойную антиагрегантную терапию (клопидогрел+АСК) и 37 здоровых доноров (41 % мужчин и 59 % женщин) в возрасте  $48 \pm 13$  лет в качестве контроля. Оценку ЛТА проводили с использованием флуоресцентно-меченых моноклональных антител CD61-FITC, CD62P-PE и CD45-PC5, специфичных соответственно к GP-IIb/IIIa, P-селектину тромбоцитов и к общему лейкоцитарному антигену после активации клеток 10 мкМ АДФ. Подсчет значимых событий проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500™ («Beckman Coulter», США). Статистическая обработка результатов проводилась в программе STATISTICA10.

**Результаты исследования.** В группе пациентов с ОИМ наблюдалось статистически значимое ( $p < 0,0001$ ) увеличение ЛТА в крови по сравнению с группой доноров – 30,4 % [10,9; 107,1] и 6,7 % [3,9; 10,5] соответственно. Также, у больных с ОИМ после активации тромбоцитов 10 мкМ АДФ на фоне получения двойной антиагрегантной терапии количество GPIIb-IIIa (8,8MFI [7,9; 13,2]) и P-селектина (9,7 % [1,3; 15,9]) было значительно ниже ( $p < 0,05$ ), чем у здоровых доноров – 18,1MFI [11,2; 22,5]

и 22,7 % [6,1; 32,4] соответственно, что указывало на эффективный антиагрегантный эффект при наличии активного воспалительного процесса.

**Вывод.** Анализ ЛТА является объективным показателем, отражающим состояние иммунной системы, при повреждении сосудистого русла, что может быть использовано в оценке тяжести течения болезни и характеризовать стабилизацию патологического процесса при терапии.

1. Балуда В. П., Балуда М. В., Деянов И. И. Физиология системы гемостаза. М.: Медицина, 1995. 245 с.
2. Баркаган З. С., Момот А. П. Современные аспекты патогенеза, диагностики и терапии ДВС-синдрома // Вестник гематол. 2005. № 2. С. 5-14.
3. Linden M., Jackson D. Platelets: pleiotropic roles in atherogenesis and atherothrombosis. *IntJ Biochem Cell Biol* 2010; 42(11): 1762–1766.
4. Michelson A., Barnard M., Krueger L. et.al. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 104(13): 1533–1537.

## Белок-липидные взаимодействия рецептора сигма-1 человека

Жемков В. А.<sup>1, 3, 4</sup>, Корбан С. А.<sup>2, 3</sup>, Кульминская А. А.<sup>2, 3</sup>,  
Безпрозванный И. Б.<sup>2, 4</sup>, Ким М. В.<sup>2, 4</sup>

<sup>1</sup> Кафедра «Медицинская физика», Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

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

<sup>3</sup> Лаборатория энзимологии, Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

<sup>4</sup> Отдел физиологии, Юго-Западный медицинский центр университета Техаса, Даллас, США

Рецептор сигма-1 человека (C1P) представляет собой интегральный трансмембранный белок эндоплазматического ретикулума. Ряд лигандов C1P широко используется в клинической практике для лечения нейropsychиатрических заболеваний [1]. На этапе доклинических испытаний фармакологическая активация C1P. Недавно определенная кристаллическая структура C1P показала, что он является белком с одним трансмембранным доменом и гомологичен по своей структуре белкам-купинам [2].

Известно, что C1P способен модулировать активность ряда ионных каналов и рецепторов, предположительно, за счет белок-белковых взаимодействий. В настоящей работе предложена альтернативная гипотеза, основанная на изменении C1P свойств липидного бислоя.

С помощью конфокальной и электронной микроскопии продемонстрировано, что C1P находится в особых рафт-богатых регионах ЭР, прилежащих к митохондриям. Рекомбинантный C1P был экспрессирован, выделен и очищен как 6-гистидин-меченый белок в бакуловирусной системе экспрессии (Sf9). Очистка включала в себя следующие этапы: металл-хелатную хроматографию, ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию. С помощью пулл-даун анализа показано, что рекомбинантный белок способен связываться с основными компонентами рафтовых областей: холестерином и сфингомиелинами. Идентифицирован потенциальный сайт узнавания данных липидов путем точечного сайт-направленного мутагенеза.

Для изучения локализации C1P с рафтовыми областями разработан подход, заключающийся в реконструкции рекомбинантного флуоресцентно-меченого C1P в гигантские липосомы и последующее изучение протеолипосом с помощью конфокальной микроскопии. В дальнейшем планируется изучение протеолипосом различного липидного состава.

Работа поддержана грантом РНФ 17-25-00002.

1. А. В. Большакова, Е. О. Куканова, А. Н. Гайнуллина, В. А. Жемков, С. А. Корбан, И. Б. Безпрозванный. НТВ СПбГПУ. 1(237), 48–65.
2. H. Schmidt, S. Zheng, E. Gurpinar, A. Koehl, A. Manglik, A. Kruse. Nature. 532, 527–530 (2016).

## **Д1 рецепторы дофамина лимфоцитов периферической крови на фоне антипсихотической терапии психически больных**

*Журавлев А. С.<sup>1</sup>, Белинская М. А.<sup>2</sup>, Заботина А. М.<sup>2,3</sup>, Насырова Р. Ф.<sup>4</sup>, Сосин Д. Н.<sup>4</sup>, Ершов Е. Е.<sup>5</sup>, Тараскина А. Е.<sup>2,3,4</sup>, Крупицкий Е. М.<sup>4</sup>*

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

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

<sup>3</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В. М. Бехтерева, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> Санкт-Петербургская городская психиатрическая больница № 1 им. П. П. Кащенко, с. Никольское, Ленинградская область, Россия

[rigold988@mail.ru](mailto:rigold988@mail.ru)

Ключевой чертой психиатрических расстройств является нейроанатомический и/или функциональный дисбаланс нейротрансмиссии. В связи с ограничениями изучения нейронов головного мозга, лимфоциты периферической крови (ЛПК) рассматривают как суррогатную модель изучения психоневрологических патологий [1–3].

Цель исследования – характеристика D1-подобных рецепторов дофамина на ЛПК (определение уровня мРНК генов *DRD1* и *DRD5* и количества белка D1R) и определение их роли в эффективности антипсихотической фармакокоррекции.

**Материалы и методы.** В исследование включено 60 пациентов мужского пола с первично поставленным диагнозом расстройство шизофренического спектра. Путем рандомизации пациенты были отнесены к одной из двух групп терапии: оланзапин (n=30) и галоперидол (n=30). Материалом служили ЛПК, выделенные в градиенте плотности фиколла. Психометрическое обследование и забор материала осуществлялся до начала и через 4 недели терапии. Уровень экспрессии генов *DRD1*, *DRD5* оценивался методом ПЦР в реальном времени с использованием флуорогенного зонда TaqMan. Определение количество белка D1R проводили методом ИФА с использованием набора ELISA kit for Dopamine Receptor 1 (Cloud-Clone Corp, USA), нормированное на общее количество белка ЛПК.

**Результаты.** Перед началом терапии уровень мРНК генов составил 2.27 (0.22 ÷ 10.83) и 2.18 (0.26 ÷ 2.18), соответственно для *DRD1* и *DRD5*. Достоверного влияния на уровень экспрессии генов антипсихотическая терапия не оказывала ( $p > 0.05$ ). Уровень мРНК генов *DRD1* и *DRD5* положительно коррелировал между собой во всех точках исследования ( $r > 0.9$ ,  $p < 0.001$ ). При изучении количества белка *DRD1* у пациентов с расстройствами шизофренического спектра в ЛПК показано достоверное снижение данного показателя при терапии галоперидолом ( $p = 0.001$ ).

**Выводы.** Терапия галоперидолом ассоциировалась со снижением количества рецептора *DRD1* на ЛПК, что, по всей видимости, связано с фармакологическим действием препарата.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант №14-15-00904).

1. Levite M. Acta Physiol. 216, 42–89 (2016).
2. Buttarelli F.R., Fanciulli A., et al. Current Neuropharmacology. 9, 278–288 (2011).
3. Morag A., Kirchheiner J., et al. Pharmacogenomics. 11(3): 327–340 (2010).

## **Диагностика онкологических образований на основе выделения тканеспецифичных экзосом и анализа экзосомальной микроРНК**

Забегина Л. М.<sup>1,2</sup>, Ковальчук А. А.<sup>1,2</sup>, Штам Т. А.<sup>1,3,4</sup>, Малек А. В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
им. Н. Н. Петрова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

<sup>3</sup> ООО «Онко-система», Москва, Россия

<sup>4</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

[lidiazabegina@gmail.com](mailto:lidiazabegina@gmail.com)

Задача разработки и внедрения в практику новых методов диагностики онкологических заболеваний является социально значимой. Одним из перспективных подходов к ее решению является т.н. «жидкостная биопсия» (liquid biopsy) – совокупность методов анализа компонентов биологических жидкостей. Диагностический потенциал методики выделения из плазмы мембранных нановезикул (экзосом) и анализа экзосомальной микроРНК был показан в ряде исследований [1, 2]. Но эти работы были сделаны на тотальной популяции экзосом плазмы, представляющих гетерогенную по своему клеточному происхождению смесь везикул. Этот факт снижает чувствительность анализа маркеров неопластической трансформации определенных тканей. Выделение экзосом, определенного клеточного (тканевого) генеза, позволило бы

существенно повысить чувствительность и диагностическую ценность метода в целом.

В рамках данного исследования был разработан новый метод выделения тотальной популяции нановезикул (с помощью полилизина) и технология изоляции из нее отдельной фракции экзосом, секретируемых клетками предстательной или щитовидной железы. В основе данной технологии – латексные микрочастицы с фиксированными на поверхности антителами к тканеспецифичным мембранным белкам. Для выделения простат специфичных везикул были использованы антитела к MPSA (prostate specific membrane antigen), и к PAP (prostatic acid phosphatase), для специфичных везикул, секретируемых клетками щитовидной железы – антитела к ТР (thyroid peroxidase), и к TSH рецептору. Проведена оценка панели микроРНК, которая предварительно показала возможность использования разработанного метода для обогащения препарата «маркерными» молекулами и повышения чувствительности диагностических тест-систем.

1. Samsonov R., Burdakov V., Shtam T. et al. Plasma exosomal mir-21 and mir-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer. *Tumour Biology*. 2016 Sep; 37(9): 12011–12021.
2. Samsonov R., Shtam T., Burdakov V. et al. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. *Prostate*. 2016 Jan; 76(1): 68–79.

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

Заботина А. М.<sup>1,2</sup>, Грунина М. Н.<sup>1</sup>, Насырова Р. Ф.<sup>3</sup>,  
Сосин Д. Н.<sup>3</sup>, Сосина К. А.<sup>3</sup>, Еришов Е. Е.<sup>4</sup>,  
Крупицкий Е. М.<sup>3,2</sup>, Пчелина М. М.<sup>2</sup>, Тараскина А. Е.<sup>1,2,3</sup>

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

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

<sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии  
им. В. М. Бехтерева, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургская городская психиатрическая больница № 1  
им. П. П. Кащенко, с. Никольское, Ленинградская область, Россия

[a.zabotina@gmail.com](mailto:a.zabotina@gmail.com)

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

Цель исследования – определение роли показателей нейротрансмиссии лимфоцитов периферической крови пациентов с расстройствами шизофренического спектра в феномене антипсихотик-индуцированного увеличения веса на примере оланзапина и эффективности терапии. Исходя из поставленной цели планировалось решение следующих задач: определение количества белка гистаминового H1, серотонинового 5-HT<sub>2A</sub>, дофаминавого рецептора 2 типа и анализ экспрессии генов *HRH1*, *5HTR2A*, *ADRA1B*, *DRD2* и *DRD4*, кодирующие рецепторы, аффинные к оланзапину.

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

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

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

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

Работа выполнена при поддержке РНФ 14-15-00904.

## **Моделирование пространственной структуры новых гликозил-гидролаз семейства 12 из *Aspergillus cervinus***

Завьялов А. В., Рыков С. В., Яроцкий С. В., Березина О. В.

*Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

[Rasteman@yandex.ru](mailto:Rasteman@yandex.ru)

В настоящее время актуальным является вопрос замены ископаемых источников энергии альтернативными, в число которых входит возобновляемая растительная биомасса. Полученные в ходе ее переработки углеводороды могут найти применение в промышленной биотехнологии для получения биотоплива, биопластика и других продуктов с высокой добавленной стоимостью. Замена ископаемого топлива биотопливом приведет к снижению уровня парниковых газов в атмосфере. Субстратами для промышленной биотехнологии являются ферментируемые сахара, получаемые из растительных полисахаридов в процессе гидролиза разнообразными гликозил-гидролазами. Микроскопические грибы рода *Aspergillus* служат неиссякаемым источником промышленных ферментов. Гены двух карбогидраз, AsCeGH12A и AsCeGH12B, из малоизученного вида *A. cervinus* были клонированы и экспрессированы в *P. pastoris*. Несмотря на невысокий уровень гомологии белковых последовательностей (62 %) ферменты AsCeGH12A и AsCeGH12B относятся к одному семейству GH12, включающему эндоглюканазы (ЕС 3.2.1.4), ксилоглюкан-гидролазы (ЕС 3.2.1.151),  $\beta$ -1,3-1,4-глюканазы (ЕС 3.2.1.73) и ксилоглюкан-эндотранскликозилгидролазы (ЕС 2.4.1.207). Моделирование пространственных структур AsCeGH12A и AsCeGH12B показало, что их ближайшими гомологами являются, соответственно, бета-1,4-эндоглюканаза 5GM3 и ксилоглюкан-специфичная бета 1,4-эндоглюканаза 3VL8 из *A. aculeatus*. Сопоставление 3D-моделей AsCeGH12A и AsCeGH12B и ближайших гомологов позволило выявить каталитические центры ферментов и аминокислотные остатки, ответственные за связывание субстрата. Принадлежность AsCeGH12A и AsCeGH12B к классам ЕС 3.2.1.4 и ЕС 3.2.1.151, соответственно, была экспериментально подтверждена путем исследования ферментативной активности и субстратной специфичности. Построение и анализ 3D-моделей новых гликозил-гидролаз позволяет не только предсказывать их функциональные свойства, но и проводить направленное изменение ферментативной активности с помощью методов белковой инженерии.

## Регуляция потенциал-зависимых натриевых каналов сердца Nav1.5 при врожденных аритмогенных синдромах

Зайцева А. К.<sup>1,2</sup>, Худяков А. А.<sup>1</sup>, Карпушев А. В.<sup>1</sup>,  
Малашичева А. Б.<sup>1,2</sup>, Костарева А. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии и генетики НМИЦ им. В. А. Алмазова  
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

[zaytseva.anastasia.zak@gmail.com](mailto:zaytseva.anastasia.zak@gmail.com)

Аритмогенная кардиомиопатия (АКМП) – наследственное заболевание, характеризующееся фиброзно-жировым замещением ткани миокарда и аритмией. Исследования, выполненные на клеточных и животных моделях АКМП, показали снижение натриевого тока (INa) в кардиомиоцитах [1,2]. Поиск путей восстановления INa является перспективным направлением исследования регуляции натриевых каналов сердца Nav1.5 в норме и патологии. В частности, было показано увеличение INa в кардиомиоцитах рыб с АКМП при ингибировании киназы гликогенсинтазы GSK3b [3]. В связи с этим целью нашего исследования было изучение влияния ингибирования GSK3b на активность Nav1.5.

Регистрация INa методом patch-clamp в отведении от целой клетки проводилась на модели кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (СМ-iPSC), полученных от здорового донора и от пациента АКМП, вызванной делецией в гене плакофиллина-2 (PKP2).

АКМП-СМ-iPSC выявили достоверное снижение плотности INa относительно донора (донор:  $-473,15 \pm 43,87$ , АКМП:  $-348,99 \pm 37,08$  пА/пФ) и отсутствие значимых изменений кинетических характеристик. Обработка селективным ингибитором GSK3b CHIR99021 (24 ч) приводила к восстановлению плотности INa в СМ-iPSC пациента ( $496,12 \pm 60,09$  пА/пФ) и не влияла на INa в клетках донора ( $493,87 \pm 75,22$  пА/пФ). Также ингибирование GSK3b приводило к сдвигу кривой стационарной активации в отрицательную сторону у донора (на 5,4 мВ) и пациента (на 5,1 мВ), что свидетельствует в пользу аллостерической модуляции канала. При этом, схожего эффекта GSK3b на INa через 2 часа после добавления CHIR99021 не наблюдалось.

В результате проведенной работы было показано, что изменения INa при АКМП можно восстановить, ингибируя GSK3b. Увеличение INa, предположительно, обусловлено активацией сигнального пути Wnt, что согласуется с отсутствием кратковременного эффекта ингибитора GSK3b на INa. Регуляция посредством ингибирования GSK3b – перспективное направление для поиска стратегий для терапии АКМП.

1. Cerrone M, Lin X et al. Missense Mutations in Plakophilin-2 Cause Sodium Current Deficit and Associate with a Brugada Syndrome Phenotype. *Circulation*. 1092-103; 29 (2014).
2. Cerrone M, Noorman M, Lin X et al. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovascular research*. (2012).
3. Asimaki A, Kapoor S, Plovie E et al. Identification of a new modulator of the intercalated disc in a zebrafish model of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Sci Transl Med*. 240-274; 6 (2014).

## **Механизмы влияния дипольных модификаторов мембран на порообразующую способность сурфактина**

*Захарова А. А., Ефимова С. С., Остроумова О. С.*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

[zaza2187@bk.ru](mailto:zaza2187@bk.ru)

Циклический липопептид сурфактин (СФ) является мощным биосурфактантом, продуцируемым различными штаммами *Bacillus subtilis*. Противомикробная, противовирусная и противоопухолевая активность СФ [Weislow, 1998] делают изучение механизма действия и поиск путей регуляции его активности актуальными задачами фармакохимии. Считается, что взаимодействие СФ с клеткой-мишенью сводится к увеличению проницаемости ее плазматической мембраны за счет формирования катион-селективных пор [Carrillo, 2003]. Учитывая, что липидный матрикс определяет специфичность действия СФ, в центре внимания оказываются регуляторные пути, опосредованные липидами мембраны.

В ходе исследования влияния липидного матрикса на порообразующую способность СФ в качестве инструментов, изменяющих физико-химические параметры липидных бислоев, использовали дипольные модификаторы: флавоноид 4-гидроксихалкон, ксантеновые красители флоксин Б, эозин У и флуоресцеин, тиреоидный гормон трийодтиронин (ТЗ), местные анестетики тетракаин и прокаин. Установлено, что введение в околосмембранные 1 М растворы КСl флоксина Б, ТЗ и тетракаина до концентрации 2.5, 50 и 1 мМ вызывает рост стационарного тока, индуцированного двусторонней добавкой СФ к ДФФХ–мембранам, в 200, 1000 и 60 раз, соответственно. В свою очередь, 4-гидроксихалкон, эозин У и флуоресцеин (в концентрации 20, 2.5 и 2.5 мкМ, соответственно) на порообразующую активность СФ практически не влияют. Для установления механизмов регуляции формирования и функционирования СФ-каналов проведено сопоставление полученных данных с результатами исследования влияния тестируемых модификаторов на свойства липидных бислоев. Выдвинуто предположение о том, что каналообразующая активность СФ потенцируется увеличением дипольного потенциала мембраны, индуцированным добавкой тетракаина, ростом латерального давления в гидрофобной области мембраны в результате введения ТЗ, а также увеличением ее толщины при адсорбции флоксина Б.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 14-14-00565.

1. Weislow, O. S.; Kiser, R.; Fine, D. L.; Bader, J.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. J. Natl. Cancer Inst. 1989, 81, 577–586.
2. Carrillo, C.; Teruel, J. A.; Aranda, F. J.; Ortiz, A. Biochim. Biophys. Acta 2003, 1611, 91–97.

## Специфичность антител к липопротеинам низкой плотности, модифицированным гипохлоритом

Иванова А. А.<sup>1</sup>, Дмитриева А. А.<sup>1,2</sup>, Гусева М. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

[anna.ivantcova@gmail.com](mailto:anna.ivantcova@gmail.com)

В крови человека обнаружены антитела (АТ) к различным модификациям липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Особый интерес представляет наименее изученная модификация ЛПНП гипохлоритом [1, 2], являющимся продуктом деятельности миелопероксидазы, и ее антигенные свойства.

Целью исследования являлось обнаружение АТ к гипохлорит-ЛПНП и проверка их специфичности.

Методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) оценивали уровень АТ, в качестве антигенов использовались человеческий сывороточный альбумин [3], человеческие ЛПНП и кроличьи ЛПНП, модифицированные гипохлоритом *in vitro*. Специфичность АТ проверяли методом конкурентного ИФА. Для проверки гипотезы о том, что гипохлорит-ЛПНП действительно могут вызывать иммунный ответ, их иммуногенность была проверена в опытах с кроликами. Животных иммунизировали собственными ЛПНП, модифицированными *in vitro*.

У большинства пациентов в сыворотке крови были обнаружены АТ классов IgG и IgM к гипохлорит-ЛПНП. Взаимодействие указанных АТ с гипохлорит-ЛПНП ингибировалось только ЛПНП, модифицированными гипохлоритом, но не нативными, ацетилированными или МДА-модифицированными ЛПНП.

После 4-й иммунизации кролика были получены антисыворотки с высоким титром АТ. Конкурентным ИФА было показано, что активность кроличьих АТ к гипохлорит-ЛПНП ингибировал только собственный антиген. Была изучена конкуренция между кроличьими и человеческими АТ, направленными к гипохлорит-ЛПНП. АТ человека и кролика конкурируют между собой за связывание со своим антигеном.

Гипохлорит-модифицированные ЛПНП формируют эпитопы, независимые от других, изучаемых модификаций ЛПНП. Эти эпитопы ответственны за образование специфических АТ классов IgG и IgM.

1. Arnhold J., Wiegel D., et al., Biomed Biochim Acta. 50, 8 (1991).

2. Sokolov A.V., Kostevich V.A., et al., Chem. Phys. Lipids. 180 (2014).

3. Пигаревский П. В., Архипова О. Ю., Денисенко А. Д., Мед. иммунол. 8 (2006).

# **Разработка модели ферментативного синтеза фукоолигосахаридов на основе реакций трансгликозилирования, катализируемых альфа-L-фукозидазой из *Fusarium proliferatum* LE1**

*Иванова Л. А.<sup>1,2</sup>, Швецова С. В.<sup>1</sup>, Волокитина М. В.<sup>3</sup>,  
Коржикова-Влах Е. Г.<sup>3</sup>, Кульминская А. А.<sup>1,2</sup>*

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

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

<sup>3</sup> *Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия*

[Luba\\_1305@inbox.ru](mailto:Luba_1305@inbox.ru)

$\alpha$ -L-Фукозидазы – ферменты класса гидролаз, способные катализировать реакции гидролиза фукоз-содержащих сахаридов с нередуцирующего конца. Эти ферменты обнаружены и выделены из бактерий, грибов, тканей животных и человека. Некоторые их представители способны катализировать не только расщепление фукозидных связей, но и осуществлять перенос фукозного остатка на другую молекулу в ходе реакции трансгликозилирования. Актуальность исследования реакций трансгликозилирования, катализируемых фукозидазами, обусловлена, в первую очередь, значительным упрощением синтеза фукоолигосахаридов за счет ферментативной реакции, что служит альтернативой химическому синтезу [1]. С другой стороны, исследуемые нами реакции трансгликозилирования могут быть моделями для аналогичных реакций синтеза олигосахаридов, катализируемые другими ферментами.

В ходе работы была исследована трансгликозилирующая активность альфа-L-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1 (FrFucA) [2] в растворе с использованием в качестве донора и акцептора пропил-фукозида. Определено, что рН-оптимум гидролиза пропил-фукозида равен 5,0, в то время как оптимум трансгликозилирования смещен к рН 6,0. При повышении концентрации пропил-фукозида в реакции до 0,4М увеличивается и количество продукта реакции трансгликозилирования — пропил-фукозида, что подтверждено методами ТСХ, а также ВЭЖХ на колонке LiChrosorb NH<sub>2</sub> с применением рефрактометрического детектора. Разделение продуктов реакции гидролиза и трансгликозилирования FrFucA выполнено на колонке Биогель Р2. Выполнена иммобилизация FrFucA на поверхности макропористого монолитного носителя. Показано, что кинетические параметры гидролиза пропил-фукозида сравнимы для свободного и иммобилизованного фермента. Разрабатываются условия для проведения реакции трансгликозилирования иммобилизованным ферментом. В завершении работы будет оценена эффективность использования обеих систем для биокатализа, а также перспективность

использования полученных биокатализаторов в синтезе значимых фукоолигосахаридов.

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

1. Khatuntseva E.A., Ustuzhanina N.E., et al., J. Carbohydr. Chem. 19 (2000) 1151–73.

2. Shvetsova S.V., Shabalin K.A., et al., Biochimie, 132 (2017) 54–65.

### **Взаимосогласованное действие миогенных и метаболических путей в линии миобластов C2C12**

*Иванова О. А.<sup>2</sup>, Комарова М. Ю.<sup>2</sup>, Хромова Н. В.<sup>1</sup>,  
Костарева А. А.<sup>1</sup>, Дмитриева Р. И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

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

[astroksana@gmail.com](mailto:astroksana@gmail.com)

Скелетная мускулатура обладает потенциалом к регенерации благодаря взрослым стволовым клеткам мышечной ткани – миосателлитам. Замещение мышечной ткани на фиброзно-жировую является следствием нарушений процесса миогенеза на разных стадиях. Точные механизмы развития таких патологий неизвестны. Мы проверяли гипотезу о связи миогенных и адипогенных сигнальных путей при дифференцировке и регенерации скелетной мускулатуры.

Клеточную линию мышечных миобластов C2C12 дифференцировали в трех направлениях: миогенном DM1 – с низким содержанием лошадиной сыворотки, адипогенном DM2 – со стимулирующим адипогенез коктейлем, смешанном DM3 – одновременно DM1 и DM2. РНК выделяли на нулевой (д0), второй (д2), четвертый (д4) и шестой (д6) дни дифференцировки. На д6 клетки фиксировали для окраски миотрубок (антитела к MYHC) и адипоцитов (OilRedO). Размеры миотрубок определяли с использованием ПО Zeiss Zen. Экспрессию определяли методом qPCR, результаты нормализовали к д0.

Все типы дифференцировки привели к образованию миотрубок. DM1 и DM3 стимулировали формирование длинных мышечных волокон, DM2 – коротких и узких, DM3 – толстых. Трубки DM1 образованы преимущественно слиянием >4 миобластов (73 %), DM2 содержали большой процент 3х-ядерных клеток (47 %), а 21 % DM3-трубок – 15-ти и более ядерные. Самый высокий коэффициент слияния показали DM2 и

DM3: 35 % против 19 % у DM1. Активность слияния миобластов хорошо коррелирует с экспрессией гена *Myomaker*: к д4 значения для DM1 и DM3 в 30 раз превышали значения для DM2. Динамика экспрессии регуляторных факторов миогенеза *MyoG* и *Myf6* также оказалась схожей для DM1 и DM3: экспрессия *MyoG* повышалась к д2, сохраняя уровень 20 для DM1 и 70 для DM3, а для DM2 – 4. Экспрессия *Myf6* в DM2, наоборот, превышала в течение 4-х дней значения в DM1 и DM3 культурах. Экспрессия маркера адипогенеза *FABP4* согласовывалась с детекцией *OilRed+* клеток в DM2 культурах: значение 122 на д4 для DM2.

На клеточной линии мышинных миобластов C2C12 мы показали взаимное влияние сигнальных путей, регулирующих жировую и мышечную дифференцировки *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ. Соглашение № 16-15-10178 от 18 мая 2016 г.

## **Базальный уровень активных форм кислорода в стволовых клетках человека**

*Иванова Ю. С., Пуговкина Н. А., Люблинская О. Г.*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

[ju.s.ivanova@yandex.ru](mailto:ju.s.ivanova@yandex.ru)

Активные формы кислорода (АФК), долгое время считавшиеся вредными для клеток и тканей побочными продуктами метаболизма, в настоящее время активно изучаются как участники многих внутриклеточных сигнальных каскадов [1]. В связи с этим, большой интерес представляет сравнительная характеристика внутриклеточного уровня АФК в разных типах клеток, а также вопрос о динамике этого уровня на протяжении жизненного цикла клеток. В опубликованных на эту тему статьях [2, 3] показано, что стволовые клетки имеют низкий базальный уровень АФК по сравнению с их дифференцированными потомками. Для измерения уровня АФК в этих работах используется широко распространенная проба H<sub>2</sub>DCFDA, флуоресцирующая при окислении. На основе полученных данных был сделан вывод о специфическом редокс-статусе стволовых клеток. В настоящей работе мы доказали, что для сравнительной оценки редокс-характеристик стволовых и дифференцированных клеток необходимо использовать нормировку уровня АФК, измеренного с применением H<sub>2</sub>DCFDA, на внутриклеточный объем или белок, учитывая таким образом разницу в размере исследуемых клеток. При проведении сравнительного анализа, основанного на применении методов проточной цитометрии и микроскопии с использованием красителя H<sub>2</sub>DCFDA и генетически кодируемого сенсора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, мы показали, что нормированный на клеточный объем уровень АФК стволовых клеток близок к уровню АФК их дифференцированных клеток-потомков. Измерение динамики базального уровня АФК в культурах стволовых и дифференцированных клеток выявило его осцилляцию, соответствующую пролиферативному циклу клеток.

Работа была выполнена при поддержке гранта № 14-50-00068.

1. Zhang J. et al., *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 4350965 (2016).
2. Dannenmanna B. et al., *Mol. Cel. Oncol.* 3(2), e10521832016 (2016).
3. Armstrong L. et al., *Stem Cells.* 28, 4 (2010).

## Роль рафтов в инвазии эукариотических клеток условно-патогенными бактериями *Serratia grimesii*

Ивлев А. П., Ефремова Т. Н., Хайтлина С. Ю.

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

[andrewivlev1410@gmail.com](mailto:andrewivlev1410@gmail.com)

Инвазия – процесс взаимодействия бактериальной и эукариотической клеток, в котором участвуют как ферменты бактерий, так и рецепторы клетки-хозяина. Ранее мы показали, что чувствительность клеток эукариот, иммортализованных фибробластов 3Т3 и их трансформированных аналогов 3Т3 SV40 к инвазии условно-патогенными бактериями *Serratia grimesii* изменяется под действием антиоксиданта N-ацетилцистеина (НАС). Было показано, что НАС-зависимое изменение чувствительности клеток 3Т3 и 3Т3 SV40 к инвазии коррелирует с увеличением экспрессии Е-кадгерина, участвующего в адгезии бактерий к клеткам эукариот и межклеточных контактах. Была обнаружена колокализация бактерий *S. grimesii* с Е-кадгерином клеток 3Т3 и 3Т3 SV40 [1].

Согласно литературе, Е-кадгерин локализован в рафтах клеток эукариот, наряду со множеством мембранных белков и сигнальных молекул, которые могут участвовать в бактериальной инвазии. Поэтому, целью работы было исследование роли рафтов в инвазии *S. grimesii* в клетки дермальных фибробластов DF2. Дермальные фибробласты представлены в тканях организма и отвечают за синтез, организацию и ремоделирование межклеточного матрикса.

Для изменения рафтов использовалась обработка метил-бета-циклодекстрином (МбСД). Изменения определялись методом конфокальной микроскопии (КМ) и микробиологическим тестом (МТ).

Используя метод КМ, показано, что обработка клеток DF2 5 мМ МбСД в течение 30 минут вызывает разборку рафтов на клеточной мембране, что привело к распластыванию клетки.

По данным МТ, после обработки клеток DF2 5 мМ МбСД чувствительность клеток к бактериям *S. grimesii* уменьшалась в 2 раза, что может быть связано с нарушением целостности рафтов, содержащих рецепторы к бактериальным белкам. Эти результаты свидетельствуют о чувствительности клеток DF2 к инвазии *S. grimesii* и указывают на роль рафтов в инвазии бактериями *S. grimesii* в клетки эукариот.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 17-04-00558).

1. Ивлев А. П., Ефремова Т. Н. и др. *Цитология*, 59(9), 601–608 (2017).

**Криогенная сканирующая электронная микроскопия  
в исследованиях биосовместимых контейнеров  
для адресной доставки лекарств**

*Камышинский Р. А.<sup>1</sup>, Трушина Д. Б.<sup>1,2</sup>, Орехов А. С.<sup>1,2</sup>,  
Бородина Т. Н.<sup>2</sup>, Букреева Т. В.<sup>1,2</sup>, Васильев А. Л.<sup>1,2</sup>*

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

<sup>2</sup> Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография  
и фотоника» РАН, Москва, Россия

[kamyshinsky.roman@gmail.com](mailto:kamyshinsky.roman@gmail.com)

Для исследования биосовместимых полимерных контейнеров, предназначенных для капсулирования и адресной доставки лекарственных веществ в жидкой форме, предлагается использовать методы криогенной сканирующей электронной микроскопии. Контейнеры представляют собой структуру типа ядро-оболочка, в которой гидрофобное ядро, включающее в себя жирорастворимые компоненты (обладающие, к примеру, противоопухолевой активностью), покрыто полимерной оболочкой. Оболочка сохраняет содержимое контейнеров от окисления и деградации под влиянием внешних факторов. Поверхность контейнеров модифицирована магнитными наночастицами, что позволит концентрировать их в определенной области организма под воздействием внешнего магнитного поля.

Эксперименты проводились с помощью сканирующего электронно-ионного микроскопа FEI Versa 3D (США), оснащенного криогенной приставкой Quorum PP3010T (Великобритания), при температуре -140 °С. Образец был заморожен с помощью переохлажденного азота и перенесен в предварительно откачанную до 10<sup>-5</sup> Па камеру микроскопа. Приготовление поперечных срезов с помощью фокусированного ионного пучка позволило исследовать внутреннюю микроструктуру объекта, выявив, в частности, расположение магнитных наночастиц в оболочке. Постепенное повышение температуры позволило изучить деградацию контейнеров. Использованный метод оказался крайне информативным в части исследования полимерных контейнеров с жирорастворимым ядром в нативных условиях в режиме высокого вакуума.

**Изучение взаимодействий амилоидов,  
ассоциированных с развитием заболеваний человека,  
на дрожжевой модели**

*Качкин Д. В.<sup>1</sup>, Рубель А. А.<sup>1</sup>, Лаикул В. В.<sup>1</sup>,  
Нужина Ю. В.<sup>1</sup>, Чернов Ю. О.<sup>1,2</sup>*

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

<sup>2</sup> Технологический институт Джорджии, Атланта, США

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

Амилоидами называют высокоупорядоченные белковые агрегаты фибриллярной природы, имеющие в своем составе структуры обогащенные  $\beta$ -слоями и способные катализировать присоединение к себе мономерных молекул того же белка с изменением их нормальной конформации. Амилоиды особенно интересны в связи с вызываемыми ими заболеваниями у человека и животных, которых на сегодняшний день насчитывается более 50-ти, и все они являются неизлечимыми. Также существуют данные о том, что развитие одного амилоидного заболевания может инициировать развитие другого амилоидоза в организме человека и животных.

Данная работа направлена на исследование возможности физического взаимодействия гетерологичных амилоидных белков млекопитающих, ассоциированных с развитием наиболее социально-значимых амилоидозов – диабета II-типа и болезни Альцгеймера. Исследование проводилось на дрожжевой модели, зарекомендовавшей себя в ходе предыдущих наших исследований. В ходе данной работы были изучены амилоидные свойства белков человека (IAPP, или амилин, связанный с диабетом II типа и A $\beta$ , амилоид бэта связанный с болезнью Альцгеймера), слитых с флуоресцентными белками YFP и CFP. Установлено, что оба белка формируют видимые под микроскопом флуоресцентные агрегаты. Агрегаты белка IAPP-YFP устойчивы к действию детергента (3 % саркозина), что указывает на их вероятную амилоидную природу. Методами конфокальной микроскопии проанализирована возможность взаимодействия агрегатов белка PrP (связанного с прионными заболеваниями) и пептида A $\beta$  (связанного с болезнью Альцгеймера) с белком IAPP. Установлено, что агрегаты PrP колокализуются с белком IAPP, но при этом физически с ним не взаимодействуют. Пептид A $\beta$  эффективно колокализуется и физически взаимодействует с белком IAPP. Таким образом, впервые получены данные о том, что пептид A $\beta$  может специфично взаимодействовать с белком IAPP в клетках дрожжей.

Взаимодействие пептида A $\beta$  с белком IAPP может объяснять частое сочетание таких заболеваний как диабет II-типа и болезнь Альцгеймера,

и дает основание для предположения о влиянии этого взаимодействия на развитие и патогенез данных заболеваний.

Работа выполнена при поддержке грантов РНФ № 14-50-00069 и РФФИ № 15-04-08159.

Для выполнения исследований использовалась приборная база ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС», «РМиКТ» и «Биобанк» научного парка СПбГУ.

### **Уровни микроРНК в тромбоцитах и тромбоцитарных мембранных везикулах при хранении тромбоцитного концентрата**

*Кишенко В. В.<sup>1</sup>, Кондратов К. А.<sup>1</sup>, Сироткина О. В.<sup>1,2</sup>, Федоров А. В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup> *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

**Введение.** Процесс приготовления и хранения препаратов тромбоцитного концентрата может сопровождаться активацией тромбоцитов, в результате чего усиливается образование тромбоцитарных мембранных везикул. Тромбоцитарные мембранные везикулы, посредством переноса биомолекул, способны передавать сигналы межклеточной коммуникации и участвовать в ряде физиологических и патологических процессов, включая регуляцию воспалительных реакций и гомеостаза. Таким образом, свойства препаратов тромбоцитного концентрата зависят от характеристик присутствующих в их составе мембранных везикул. Однако молекулярный состав тромбоцитарных мембранных везикул и его изменение в ответ на различные внешние стимулы до сих пор остаются малоизученными. Одним из классов регуляторных биомолекул присутствующих в тромбоцитах и их везикулах, являются микроРНК.

**Целью** данного исследования является анализ изменений свойств тромбоцитного концентрата в процессе хранения путем измерения уровней микроРНК в тромбоцитах и тромбоцитарных мембранных везикулах.

**Материалы и методы.** Объектом исследования были пулированные тромбоцитные концентраты, полученные по стандартным протоколам станции переливания крови НМИЦ им. В. А. Алмазова от здоровых доноров (мужчины, возраст 20-35 лет, с I (0) группой крови и Rh+, не курящие). Контейнеры с тромбоцитными концентратами хранили 7 дней в инкубаторе с тромбомиксером при 22 °С. Образцы для исследования отбирали из контейнеров на 2-й и 7-й день хранения.

С помощью дифференциального центрифугирования получали фракции тромбоцитов, мембранных везикул, осаждаемых при 16 000 g и 100 000 g, а также фракцию супернатанта. Общую РНК, включая микроРНК, выделяли с помощью реагента Trizol LS по стандартной методике. Уровни микроРНК определяли методом количественной ПЦР в реальном времени с помощью наборов для детекции зрелых микроРНК.

**Результаты.** Во фракции мембранных везикул, осаждаемых при 16 000 g, в процессе хранения достоверно повышаются уровни: miR-223 в 2 раза ( $p=0.03$ ), miR-126 в 3 раза ( $p=0.03$ ) и miR-15a в 2,5 раза ( $p=0.03$ ). Во фракции мембранных везикул, осаждаемых при 100 000 g, в процессе хранения также повышаются уровни miR-223 и miR-126 – в 3 и 4 раза, соответственно ( $p=0.03$ ), а кроме того miR-451 – в 2,5 раза ( $p=0.03$ ), miR-21 – в 2 раза ( $p=0.03$ ), miR-221 – в 5,6 раза ( $p=0.03$ ) и miR-210 – в 3 раза ( $p=0.03$ ). При этом не было выявлено статистически значимых различий между уровнями исследуемых микроРНК в разные дни хранения во фракции тромбоцитов за исключением miR-451, уровень которой возрастал в 1,8 раза на 7-й день,  $p=0.03$ ).

**Вывод.** При хранении тромбоцитного концентрата происходит изменение уровней микроРНК в тромбоцитарных мембранных везикулах. Выявленные изменения молекулярного состава тромбоцитарных мембранных везикул в процессе хранения могут влиять на свойства и функциональные возможности препаратов тромбоцитного концентрата.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-04-01142).

**Исследование молекулярных предпосылок активации  
первого семейства протеинкиназ С (РКС)  
посредством диацилглицерина (DAG)  
в рамках методов молекулярного моделирования**

*Клюев П. Н.<sup>1</sup>, Рамазанов Р. Р.<sup>1</sup>, Щеголев Б. Ф.<sup>2</sup>*

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

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

[phillveber@gmail.com](mailto:phillveber@gmail.com)

Протеинкиназа С – подмембранный белок, имеющий важное значение в клеточной системе передачи сигналов. Выделяют четыре семейства изоформ, отличающихся в основном по типам активаторов и в меньшей степени по структуре. Для первого семейства протеинкиназ С ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ) характерно наличие двух доменов – регуляторный и каталитический, при этом регуляторный крепится к мембране С2 субъединицей и включает субъединицы С1А, С1В, блокирующие активные центры каталитического домена. На сегодня известно, что в процессе активации протеинкиназы С высвобождается каталитический домен, открываются активные центры и в присутствии ионов кальция происходит фосфорилирование белков [1].

В настоящей работе проводились исследования предпосылок поэтапной активации протеинкиназы С первого семейства на примере РКС  $\beta$ II с использованием методов молекулярного моделирования. Был рассмотрен процесс, учитывающий активацию в два этапа: сначала происходит связывание одной молекулы DAG с субъединицей С1А, а затем второй молекулы DAG с субъединицей С1В, что приводит к высвобождению каталитической части белка. Частично данный процесс был описан на основе данных рентгеноструктурного анализа отдельных преактивированных форм белка [2, 3], однако полной последовательной картины механизма активации до сих пор не представлено. В работе на первом этапе проводили докинг молекулы DAG в структуру РКС в разных формах, а затем для наиболее выгодных по энергии комплексов проводили расчеты молекулярной динамики. На основе данных результатов расчетов были сделаны выводы о преимущественном связывании молекулы DAG с РКС и проанализированы траектории тепловой динамики, сопутствующей открытию активных центров белка.

1. Newton A.C. Chem. Rev. (2001), 101, 2353–2364.
2. Steinberg S.F. Physiol Rev. (2008), 88, 1341–1378.
3. Leonard T.A. et al. Cell (2011), 144, 55–66.

## **Исследование изменения уровня экспрессии микроРНК в различных типах узловых образований щитовидной железы**

*Князева М. С.<sup>1,2</sup>, Коробкина Е. А.<sup>1,2</sup>, Малек А. В.<sup>2</sup>, Штам Т. А.<sup>3</sup>*

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

<sup>2</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
им. Н. Н. Петрова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>3</sup> *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

[Margo9793@gmail.com](mailto:Margo9793@gmail.com)

Узловые заболевания щитовидной железы (ЩЖ) являются распространенной патологией органов эндокринной системы. Рак ЩЖ (РЩЖ) классифицируется на несколько типов в зависимости от гистологической структуры опухолевой ткани. Гистология определяет прогноз заболевания и лечебную тактику. Проблема заключается в том, что точное гистологическое заключение можно сделать лишь после анализа ткани удаленной железы, т.е. после операции, а решение о необходимости проведения этой операции должно быть принято раньше. В настоящее время в качестве диагностического стандарта принято проведение тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) с цитологическим анализом полученного биоптата [1]. В ходе ТАБ структура ткани не сохраняется, и цитологическое заключение не всегда дает ответы на все клинические вопросы и не позволяет точно определить лечебную тактику [2, 3].

Целью данной работы было создание тест-системы для первичной или дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы на основе анализа микроРНК в материале ТАБ/ цитологических препаратов.

В исследование были включены архивные гистологические образцы, полученные от пациентов с различными формами узловых заболеваний ЩЖ, проходивших лечение в МНИЦ онкологии им. Н.Н.Петрова. Из каждого образца были получены тонкие срезы, была выделена тотальная РНК. Для анализа уровня экспрессии отдельных молекул микроРНК использовался метод обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в режиме «реального времени» (RT-qPCR). После анализа уровней экспрессии в комплексных образцах, было выбрано 22 «маркерные» молекулы. В каждом образце были получены уровни экспрессии для каждой «маркерной» молекулы.

В рамках исследования был разработан диагностический алгоритм для дифференциальной диагностики двух групп заболеваний: в основе этого алгоритма лежит вычисление отношения эффективности амплификации двух молекул с реципрокным характером регуляции в таких группах.

С использованием данного алгоритма были предложены подходы к дифференциальной диагностике:

1. Нетоксического зоба и злокачественных новообразований ЩЖ.
2. Папиллярного рака и фолликулярного варианта папиллярного рака.
3. Фолликулярной аденомы и фолликулярной карциномы.

1. Gharib H., Papina E., Paschke R. et al. American Association of Clinical Endocrinologists and Associazione Medici Endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules. *Endocr Pract* 2006;12(1):63–102.
2. Kato M.A., Fahey T.J.3rd. Molecular markers in thyroid cancer diagnostics. *Surg Clin North Am* 2009;89(5):1139–55.
3. Wang C.C., Friedman L., Kennedy G.C. et al. A large multicenter correlation study of thyroid nodule cytopathology and histopathology. *Thyroid* 2011;21(3):243–51.
4. Mehanna H.M., Jain A., Morton R.P. et al. Investigating the thyroid nodule. *BMJ* 2009;338:b733.
5. Keutgen X.M., Filicori F., Crowley M.J. et al. A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration. *Clin Cancer Res* 2012;18(7): 2032–8.
6. Zhang Y., Zhong Q., Chen X. et al. Diagnostic value of microRNAs in discriminating malignant thyroid nodules from benign ones on fine-needle aspiration samples. *Tumour Biol* 2014;35(9):9343–53.
7. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Веряскина Ю.А. МикроРНК, эволюция и рак. *Цитология* 2013;55(3):159–64. [Kolesnikov N.N., Titov S.E., Veryaskina Yu.A. MicroRNAs, evolutions and cancer. *Tsitologiya = Cytology* 2013;55(3):159–64. (In Russ.)].
8. Nikiforova M.N., Tseng G.C., Steward D. et al. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(5):1600–8.

## **Белки Orai необходимы для активации эндогенных депо-управляемых каналов TRPC1 в клетках HEK293**

*Колесников Д. О., Перевозникова А. В., Скопин А. Ю.,  
Глушанкова Л. Н., Казначеева Е. В., Шалыгин А. В.*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

*koledmi3@mail.ru*

Система кальциевой сигнализации участвует в регуляции жизнедеятельности клетки. Кальций может поступать в цитоплазму из кальциевого депо — эндоплазматического ретикулума. В ответ на снижение концентрации кальция в депо кальциевые сенсоры STIM, пронизывающие мембрану ретикулума, активируют депо-управляемые кальциевые каналы, расположенные на плазматической мембране [1].

Есть сведения о существовании, по меньшей мере, двух типов белков, образующих депо-управляемые каналы: группы белков Orai и группы TRPC. Данные о взаимодействии этих групп противоречивы [2].

Для изучения регуляции каналов TRPC нами был выбран эндогенный депо-управляемый канал  $I_{\max}$ , состоящий из белков TRPC1 [3].

Мы работали на клетках HEK293 с различным уровнем экспрессии белков TRPC, Orai и STIM. Измеряли активность каналов в разных проводящих растворах методом локальной фиксации потенциала и оценивали изменение внутриклеточной концентрации кальция, используя кальциевый индикатор fura-2am.

Мы сравнили вероятности открытого состояния каналов Orai и  $I_{\max}$  и выяснили, что они схожи для растворов  $Ba^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ .

Также мы оценили влияние белков Orai и STIM на активность канала  $I_{\max}$ . Результаты указывают на то, что в клетках, с выключенными белками Orai, каналы  $I_{\max}$  продолжают работать, но становятся не чувствительны к опустошению депо. При этом в отличие от каналов Orai, селективность канала  $I_{\max}$  не зависела от уровня экспрессии сенсора STIM.

Таким образом, согласно нашим данным, белки Orai не входят в пору канала TRPC1  $I_{\max}$ , но необходимы для поддержания чувствительности канала к депо.

Исследование финансировалось грантами РФФИ № 14-14-00720, РФФИ № 16-04-01792.

1. Clapham D.E. Calcium Signaling // Cell. 2007. V. 131. No. 6. P. 1047–1058.
2. Nilius B., Flockerzi V. Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels. Volume II. , 2014. 1035–1054 с.
3. Skopin A. и др. TRPC1 protein forms only one type of native store-operated channels in HEK293 cells // Biochimie. 2013. V. 95. No. 2. P. 347–353.

## Систематический поиск структурных мотивов связывания дипептидов с двунитевой ДНК

*Колчина Н. В.<sup>1,2</sup>, Линькова Н. С.<sup>2,3</sup>, Хавинсон В. Х.<sup>3,4</sup>, Петухов М. Г.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

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

<sup>3</sup> *Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии,  
Санкт-Петербург, Россия*

<sup>4</sup> *Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

[nina.v.kolchina@gmail.com](mailto:nina.v.kolchina@gmail.com)

Специфическое взаимодействие белков с ДНК, РНК и другими малыми органическими молекулами является основой жизнедеятельности клетки. Как правило, молекулярные взаимодействия определяются пространственной структурой участвующих в них соединений. В этом смысле большой интерес представляют биологически активные пептиды, участвующие в пролиферации, дифференцировке и апоптозе клеток [1]. Однако механизмы взаимодействия между короткими пептидами и двунитевой ДНК (днДНК) исследованы недостаточно. На сегодняшний день имеется всего несколько структур комплексов коротких пептидов с днДНК, центральным элементом которых является мотив RGR [2].

С помощью методов молекулярного моделирования и докинга пептидов в ДНК (пакет программ ICM-Pro Molsoft LLC, США) впервые была проанализирована возможность связывания всех возможных дипептидов (все возможные комбинации 20 стандартных аминокислот) с заряженными и защитными группами на N- и C-концах со всеми возможными пространственными структурами днДНК в В-форме, состоящих из 4-х пар нуклеотидов (136 уникальных вариантов). Нам удалось выявить 57 дипептидов с высоким значением ICM-Score, которые способны селективно связываться с определенными участками днДНК. Наиболее низкоэнергетические селективные комплексы были получены для дипептида KE с заряженными группами и дипептида Ac-WT-NH<sub>2</sub> с защитными группами на N- и C-концах с участками днДНК «TCGA» и «TGTG», соответственно. Показано, что дипептид RR (и некоторые другие положительно заряженные дипептиды) способны не селективно связываться со многими последовательностями днДНК. Более 50 % всех возможных дипептидов не способны связываться с днДНК. Полученные результаты показывают, что при увеличении длины пептидов увеличивается их вероятность селективного связывания с днДНК.

1. Suc J., Tumir L. et al., Org. Biomol. Chem., 4865, 14 (2016).
2. Huth J.R., Bewley C.A. et al., Nat. Struct. Biol. 657, 4 (1997).

## **Нарушение метаболизма скелетных мышц и резидентных стволовых клеток при хронической сердечной недостаточности**

*Комарова М. Ю.<sup>2</sup>, Иванова О. А.<sup>2</sup>,  
Галенко В. Л.<sup>1</sup>, Лелявина Т. А.<sup>1</sup>, Дмитриева Р. И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

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

[margaritka96@yandex.ru](mailto:margaritka96@yandex.ru)

**Введение.** Сердечная недостаточность определяется как неспособность сердца к нормальной перфузии периферических тканей. Клинический синдром хронической сердечной недостаточности (ХСН) является снижением активности миокарда. Классическими симптомами ХСН являются усталость и одышка [1]. Сократительная дисфункция миокарда влияет не только на саму сердечную мышцу, но и на скелетные мышцы, сосудистую систему и легкие. В работе было проведено исследование влияния ХСН на функциональные характеристики мышечной ткани и свойства резидентных стволовых клеток скелетной мускулатуры.

**Методы и результаты.** Биоптаты мышечной ткани и резидентные стволовые клетки были выделены из скелетной мускулатуры здоровых доноров и пациентов с изолированной ХСН (II-IV функциональный класс). Одну часть биоптата замораживали в жидком азоте для непосредственного выделения из нее тотальной РНК. Другую часть биоптата измельчали скальпелем и обрабатывали коллагеназой второго типа для удаления межклеточных контактов для дальнейшего культивирования. Методом селекции по адгезии отбиралась культура резидентных стволовых клеток. Далее из биоптатов и культуры выделяли тотальную РНК, проводили обратную транскрипцию. Изменение экспрессии генов измеряли с помощью Q-PCR.

После нормализации результатов Q-PCR на контроль было выявлено, что в мышечной ткани пациентов с ХСН нарушены: баланс эмбриональных и «взрослых» миозинов, регуляция липидного обмена, митохондриогенеза и системы натрийуретических пептидов. Нарушение липидного обмена может привести к липотоксичности, что ведет к гибели клетки.

Некоторые тенденции, выявленные в биоптатах, подтвердились в стволовых клетках. Так, экспрессия MYH8 была повышена как в ткани, так и в резидентных стволовых клетках больных ХСН; снижение экспрессии NPRC и NPRA в тканях и клетках может говорить о снижении активности

системы натрийуретических пептидов в мышечной ткани при сердечной недостаточности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ, Соглашение № 16-15-10178 от 18 мая 2016 г.

1. Cynthia Zizola, P. Christian Schulze. Metabolic and structural impairment of skeletal muscle in heart failure. Heart Fail Rev (2013) 18:623–630.

### **Влияние дозозависимого ингибирования ферментативной активности GCase на накопление субстратов реакции и альфа-синуклеина в макрофагах человека**

*Копытова А. Э.<sup>1</sup>, Николаев М. А.<sup>1,2</sup>, Безрукова А. И.<sup>1</sup>, Байдакова Г. В.<sup>3</sup>,  
Беркович О. А.<sup>2</sup>, Захарова Е. Ю.<sup>3</sup>, Пчелина С. Н.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИИ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

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

<sup>3</sup> *Медико-генетический научный центр РАН, Москва, Россия*

*[kopytovaalena@mail.ru](mailto:kopytovaalena@mail.ru)*

Болезнь Гоше – аутосомно-рецессивное заболевание, относящееся к классу лизосомных болезней накопления, обусловлена мутациями в гене *GBA*, кодирующем лизосомный фермент – глюкоцереброзидазу (GCase). GCase гидролизует глюкоцерамид до глюкозы и церамида. Мутации в гене *GBA*, в том числе и в гетерозиготном состоянии, повышают риск развития болезни Паркинсона (БП). Механизм развития БП у носителей мутаций в гене *GBA* остается неизвестным.

Целью исследования была оценка дозо-зависимого ингибирования ферментативной активности GCase на накопление субстрата и белка альфа-синуклеина в макрофагах человека.

У лиц без нейродегенеративных заболеваний (n=8) был произведен забор крови с последующим выделением моноклеарной фракции с помощью градиента Фиколла. Полученные клетки дифференцировали в макрофаги в течение 4-х дней с ежедневной заменой среды: среда (RPMI Medium), 10 % бычьей сыворотки, 1 % стрептомицин-пенициллин, фактор роста макрофагов (M-SCF) с конечной концентрацией 10 нг/мл. На 4-й день культивирования макрофагов в чашки с клетками добавляли специфичный ковалентный ингибитор GCase кондуритол-В-эпоксид (СВЕ) различной конечной концентрации – 0, 150 и 450 нг/мл, затем клетки помещались еще на 4 дня в инкубатор, без ежедневной замены среды.

Ферментативная активность GCase и концентрация субстратов реакции (смесь гликозилсфингозина и галактозилсфингозина) были оценены методом масс-спектрометрического анализа в сухих пятнах макрофагов. Уровень общего альфа-синуклеина определяли методом ИФА.

В нашем исследовании мы показали достоверное уменьшение активности GCase у клеток с СВЕ 150 и 450 нг/мл, по сравнению с клетками без добавления СВЕ ( $p < 0.001$  и  $p < 0.001$ , соответственно). Выявлено дозо-зависимое увеличение концентрации субстратов в клетках, с концентрацией СВЕ 150 и 450 нг/мл по сравнению с клетками без добавления СВЕ ( $p < 0.001$  и  $p < 0.001$ , соответственно), а также достоверное различие субстратов в макрофагах при различных концентрациях ингибитора СВЕ 150 и 450 нг/мл ( $p = 0.036$ ). Достоверного различия в уровне альфа-синуклеина между клетками с разной концентрацией СВЕ не обнаружено.

В нашем исследовании было показано дозо-зависимое влияние СВЕ на накопление лизосфинголипидов (гликозилсфингозина и галактозилсфингозина) в макрофагах. Мы показали способность макрофагов накапливать субстрат с течением времени при дисфункции GCase, что показывает адекватность использования макрофагов *in vitro* в качестве модели Гоше для апробации лекарственных средств.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-04-00764а.

## **Роль нового трансмембранного регулятора регенерации и развития мозга *c-Answer* в функционировании пуринэргического рецептора P2Y1 и рецептора факторов роста фибробластов FGFR4**

*Короткова Д. Д.<sup>1,2</sup>, Иванова А. С.<sup>1</sup>, Мартынова Н. Ю.<sup>1</sup>, Любецкий В. А.<sup>3</sup>, Селиверстов А. В.<sup>3</sup>, Нестеренко А. М.<sup>1,4</sup>, Терёшина М. Б.<sup>1</sup>, Зарайский А. Г.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

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

<sup>3</sup> *Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН, Москва, Россия*

<sup>4</sup> *Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

[ddkorotkova@gmail.com](mailto:ddkorotkova@gmail.com)

Ген *c-Answer* был идентифицирован нами совместно с лабораторией математических моделей в биологии (ИППИ РАН) с помощью биоинформатического скрининга геномов представителей всех классов позвоночных животных, направленного на поиск генов, исчезнувших в ходе эволюции на этапе перехода к теплокровным животным. Ранее нами были впервые описаны физиологические функции *c-Answer* и установлено его участие в регенерации и развитии мозга шпорцевой лягушки посредством взаимодействия с рецептором факторов роста фибробластов – FGFR4 и рецептором пуринэргического сигнального пути – P2Y1.

Целью настоящей работы было изучение механизмов и роли взаимодействия *c-Answer* с рецепторами P2Y1 и FGFR4, а также подтверждение установленной ранее роли *c-Answer* в регенерации хвоста головастика шпорцевой лягушки и в развитии мозга путем нокаута гена *c-Answer* с помощью системы CRISPR/Cas9.

Мы показали, что за взаимодействие с обоими рецепторами отвечает внеклеточный домен *c-Answer*, а благодаря взаимодействию внутриклеточного и трансмембранного доменов *c-Answer* способен образовывать гомодимер.

С применением разработанной нами методики детекции уровня  $Ca^{2+}$  в культуре клеток зародышей, ко-экспрессирующих *c-Answer* и рецептор P2Y1, с помощью  $Ca^{2+}$ -сенсора Case12, мы установили, что *c-Answer* оказывает стимулирующее влияние на работу пуринового рецептора P2Y1.

Нами также было установлено, что нокаут гена *c-Answer* методом CRISPR/Cas9 вызывает аномалии регенерации и общее уменьшение размеров головастика. Результаты хорошо согласуются с гипотезой о стимулирующем влиянии *c-Answer* на пуринэргический и Fgf-сигнальные пути, которые играют важную роль в развитии головного мозга, глаз и в регенерации. Мы предполагаем, что исчезновение *c-Answer*

в эволюции у предков теплокровных животных могло быть одной из причин потери способности к регенерации конечностей и могло привести к созданию условий для прогрессивного развития головного мозга в результате изменения активности Fgf и пуринаргического сигнальных каскадов.

## **Роль протеинкиназы А в эффектах сероводорода на НМДА-рецепторы в гиппокампе крыс**

*Курмашова Е. Д., Гатаулина Э. Д., Яковлев А. В.*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

[kurmashovaed@gmail.com](mailto:kurmashovaed@gmail.com)

Известно, что эндогенный сероводород  $H_2S$  участвует в различных физиологических и патофизиологических процессах. В нервной системе синтез  $H_2S$  обеспечивается ферментом цистатионин  $\beta$ -синтаза. Показано, что высокий уровень экспрессии фермента необходим в ранние периоды развития организма для созревания нейрональных сетей и их защиты в условиях оксидативного стресса. Одной из мишеней действия  $H_2S$  является НМДА-рецепторы. Так показано, что в первичной культуре нейронов мозжечка  $H_2S$  усиливает НМДА-ток за счет активации аденилатциклазы и протеникиназы А. В тоже время, в незрелых нейронах гиппокампа донор  $H_2S$  вызывает угнетение НМДА-вызванного тока.

Целью данного исследования стало выявление роли активности аденилатциклазы в эффектах донора  $H_2S$  на НМДА- опосредованные токи в пирамидальных нейронах гиппокампа крыс в течение постнатального развития гиппокампа крысы.

Эксперименты проводились на горизонтальных срезах головного мозга новорожденных и взрослых крысят (P3–P7 и P18-26, где P0 – день рождения). НМДА-опосредованные токи пирамидных нейронов гиппокампа регистрировали при помощи пэтч-кламп регистрации, в режиме «целая клетка». В качестве донора  $H_2S$  использовался NaHS в концентрации 100  $\mu$ M. Для ингибирования аденилатциклазы применялся селективный блокатор MDL-12330A.

Анализ данных выявил, что донор  $H_2S$  оказывал необратимый ингибирующий эффект на амплитуду НМДА-вызванного тока нейронов у новорожденного крысенка в СА3 области гиппокампа. Однако в гиппокампе взрослых крысят аппликация  $H_2S$  вызывала потенциацию НМДА-индуцированных ответов. Предварительное ингибирование аденилатциклазы не снимало эффекты  $H_2S$  на НМДА-вызванные токи

пирамидных нейронов гиппокампа как у новорожденных, так и у взрослых крыс.

Таким образом, можно предположить, что действие  $H_2S$  на НМДА-вызванные токи пирамидных нейронов гиппокампа крыс не связаны с активностью аденилатциклазной системой.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-15-00618.

### **Оценка влияния дофамина на уровень ДНК-метилтрансферазы (DNMT1) при болезни Паркинсона**

*Лавринова А. О.<sup>1</sup>, Литусова Е. М.<sup>1</sup>, Милюхина И. В.<sup>2, 4</sup>,  
Николаев М. А.<sup>1, 2, 3</sup>, Пчелина С. Н.<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Емельянов А. К.<sup>1, 2, 3</sup>*

<sup>1</sup> *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

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

<sup>3</sup> *Санкт-Петербургский национальный исследовательский  
Академический университет РАН, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>4</sup> *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

[lavrinoва.anna@gmail.com](mailto:lavrinoва.anna@gmail.com)

**Введение.** Считается, что механизм нейродегенерации при болезни Паркинсона (БП) ассоциирован с агрегацией белка альфа-синуклеина. Известно, что увеличение концентрации дофамина в клетке способствует его олигомеризации. В тоже время, олигомерные формы альфа-синуклеина способствуют потере ядерной локализации DNMT1, приводя к гипометилированию регуляторной области гена *SNCA*. Мы предполагаем, что гибель дофаминергических нейронов при БП обусловлена влиянием дофамина на эпигенетические пути регуляции экспрессии гена *SNCA* за счет увеличения олигомеризации альфа-синуклеина и потери естественной локализации DNMT1 в клетке.

**Цель.** Оценка влияния дофамина на содержание DNMT1 в ядерной и цитозольной белковых фракциях лимфоцитов периферической крови (ЛПК) у пациентов с БП и контроля.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 10 пациентов (средний возраст  $63 \pm 6,46$  лет) с БП, не принимающих Л-ДОФА-содержащие препараты и 11 индивидуумов (средний возраст  $64 \pm 8,2$  лет) контрольной группы без неврологических заболеваний. Было проведено культивирование ЛПК в течение трех суток (5 %  $CO_2$ , 37 °C) в присутствии 100 мкМ гидрохлорида дофамина (ГД) (Sigma-Aldrich, США). Измерение уровня DNMT1 (нг/мкг) в указанных группах проводилось методом ИФА

(DNMT1 Assay Kit (Epigentek, США)) в цитозольной и ядерной фракциях ЛПК, выделенных с применением набора EpiQuik nuclear extraction kit (Epigentek, США). Статистические расчеты были проведены в программе SPSS 21.0.

**Результаты.** Выявлено снижение уровня белка DNMT1 в группе пациентов с БП как в цитозольной, так и в ядерной белковых фракциях ЛПК при сравнении ее с контролем, вне зависимости от присутствия в питательной среде ГД ( $p < 0,02$ ). В то же время влияния ГД в группе пациентов с БП, контроле, а также в объединенных группах на уровень DNMT1 в указанных белковых фракциях обнаружено не было ( $p > 0,05$ ).

**Заключение.** Таким образом, полученные данные позволяют предположить участие DNMT1 ЛПК в патогенезе БП.

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-04-01187.

## **Влияние раннего постнатального стресса на транскриптом гиппокампа головного мозга 15-дневных мышей**

*Лепешко А. А.<sup>1,2</sup>, Рябушкина Ю. А.<sup>1,2</sup>, Решетников В. В.<sup>2</sup>, Бондарь Н. П.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

<sup>2</sup> *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

[arina94\\_123@mail.ru](mailto:arina94_123@mail.ru)

После рождения организма, его головной мозг продолжает развиваться, следуя комбинации генетически управляемых процессов и воздействия окружающей среды [1]. Как таковой, этот период является чувствительным к различным стрессовым стимулам. Стресс дезорганизует специфические нейронные связи и приводит к изменениям в морфологии и функционировании мозга [2]. Стресс в раннем постнатальном периоде может привести к индуцируемым изменениям, которые могут проявляться непосредственно, либо иметь отсроченные эффекты. Хорошо известно, что детеныши особенно чувствительны к отделению от матерей на неонатальной стадии, во время которой изменяются нейроэндокринные ответы, уровни нейротрофических факторов и т.д. Очень важным является исследование фундаментальных генетических механизмов ответа на стресс в различных отделах мозга детенышей, подвергавшихся раннему постнатальному стрессу.

Целью работы является исследование транскриптома гиппокампа головного мозга мышей в возрасте 15 дней, подвергавшихся стрессу в ранний постнатальный период. В качестве модели постнатального стресса было использовано два вида раннего отделения детенышей от матерей – на 3 ч/день в течение 2-х недель и однократно на 24 часа на 9-й день жизни. Из образцов гиппокампа 15-дневных особей были приготовлены кДНК-библиотеки для RNA-seq. Полногеномный анализ выявил достоверные изменения в уровне экспрессии 47 генов у детенышей из группы с повторным отделением от матерей по сравнению с контролем. Среди дифференциально экспрессирующихся генов были выявлены гены (*Dok6*, *Cdc42*, *Plcg1*, *Ppp3r1*), задействованные в развитии нервной системы, а также регуляции аксонального роста. На основании полученных данных можно предположить, что эти гены представляют собой возможные мишени действия постнатального стресса и требуют дальнейшего изучения.

1. Jernigan T.L., et al. Progress in Brain Res.189 (2011).

2. Lee Y.-A., Yamaguchi Y., Goto Y. Neural plast.2015 (2015).

## Получение генетической конструкции для экспрессии R15A мутантной формы биназы

Лисевич И. М., Ульянова В. В.

*Институт фундаментальной медицины и биологии,  
Казань, Россия*

[lisevich.ira@mail.ru](mailto:lisevich.ira@mail.ru)

Димеризация является одним из важных свойств, определяющих функционирование многих белков, в том числе и рибонуклеаз, имеющих широкий спектр биологических эффектов. Значение и механизм димеризации прокариотической РНКазы – биназы *Bacillus pumilus* – до конца не ясны. Предполагается, что в естественных условиях, в отличие от кристаллов [1], не один, а оба активных центра фермента могут быть открыты [2]. Об этом говорят большая РНКазная активность димера по сравнению с мономером [2] и результаты теоретических расчетов [3].

Для устранения накопившихся противоречий и экспериментального подтверждения теоретической модели в настоящей работе методом сайт-направленного мутагенеза была внесена мутация в потенциальный сайт димеризации белка: Arg15 был заменен на нейтральный аланин. Наличие замены Arg15Ala в гене биназы было подтверждено секвенированием по Сэнгеру фрагментов полученных плазмид в обоих направлениях. Чтобы добиться гиперэкспрессии, мутантный ген биназы был переклонирован в вектор pET2615 под контроль сильного промотора T7 [4]. Для подтверждения наличия вставки в полученной генетической конструкции проводили рестрикционный анализ. По размеру образовавшихся фрагментов, полностью соответствующих данным *in silico*, можно было заключить, что вставка в плазмиде присутствует. Дополнительно наличие вставки было подтверждено методом ПЦР.

Таким образом, была получена экспрессионная конструкция, несущая ген биназы с мутацией в потенциальном сайте димеризации Arg15Ala под контролем ИПТГ-индуцируемого промотора T7. Она будет использована для наработки и очистки мутантного белка с целью изучения его биохимических и структурных особенностей. Помимо этого, будет оценена важность димеризации в проявлении биназой цитотоксических свойств в отношении опухолевых и вирус-зараженных клеток, а также ее функциональная значимость для бактериальной популяции.

1. Polyakov K.M., Lebedev A.L., Okorokov K.I. et al. The structure of substrate-free microbial ribonuclease binase and of its complexes with 3'GMP and sulfate ions // Biological Crystallography. 2002. V. 58. P. 744–750.
2. Dudkina E.V., Kayumov A.R., Ulyanova V.V. et al. New insights into secreted ribonuclease structure: binase is a natural dimer // PloS One. 2014. V. 9(12). P. e115818. doi:10.1371/journal.pone.0115818.

3. Ermakova E.A. Brownian Dynamics simulation of competitive reactions: binase dimerization and the association of binase and barstar // Biophysical chemistry. 2007. V. 130. P. 26–31.
4. Ulyanova V.V., Shah Mahmud R., Klug G.A set of genetic constructs for binase and barstar overproduction // BioNanoSci. 2017. V. 7(1). P. 222–225.

### **Биоинформатический анализ амилоидогенных свойств N-домена белка eRF3 у представителей разных таксономических групп**

*Лихолетова Д. В.<sup>1</sup>, Данилов Л. Г.<sup>1</sup>,  
Бондарев С. А.<sup>1,2</sup>, Тарасов О. В.<sup>1,3</sup>, Журавлева Г. А.<sup>1,2</sup>*

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

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

<sup>3</sup> *Санкт-Петербургский научный центр РАН, Санкт-Петербург, Россия*

[likholetovadaria@gmail.com](mailto:likholetovadaria@gmail.com)

Прионы — это инфекционные агенты белковой природы, вызывающие ряд нейродегенеративных заболеваний у млекопитающих и способные приводить к появлению адаптивных черт у одноклеточных эукариот. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* известен прион  $[PSI^+]$ , являющийся изоформой фактора терминации трансляции eRF3. В этом белке выделяют три домена: N, M и C. C-домен белка eRF3 консервативен и необходим для терминации трансляции. В отличие от него, N и M домены этого белка являются высоко вариабельными. У *S. cerevisiae* и близкородственных видов N-домен eRF3 обогащен аминокислотными остатками глутамина и аспарагина и необходим для поддержания приона  $[PSI^+]$ . Остается неясным, насколько способность к прионизации является универсальной для всех белков eRF3.

Прионизация в большинстве случаев сопровождается появлением амилоидных агрегатов соответствующего белка. Существует большое количество программ для предсказания амилоидных свойств белков. Одной из них является ArchCandy, которая отличается низким количеством ложноположительных результатов. Именно поэтому мы выбрали ее для оценки амилоидогенных свойств белков eRF3 различных организмов.

Белковые последовательности eRF3 были взяты из базы данных NCBI. На их основании мы получили консенсусные последовательности полноразмерного белка либо его N-домена в пределах отдельных групп грибов, животных и растений. Затем при помощи программы ArchCandy мы оценили способность каждой из таких последовательностей

формировать амилоидные агрегаты. Согласно полученным данным, большинство из них содержит амилоидогенные участки. При этом, в N-домене eRF3 грибов они наиболее протяженные: например, у аскомикот такие участки на порядок длиннее, чем у растений.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (17-54-150002, 16-04-00202).

### **Исследование роли ACTN4 в процессе пролиферации клеточной линии H1299**

*Ломерт Е. В.<sup>1</sup>, Новицкая К. С.<sup>2</sup>, Тентлер Д. Г.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup> *Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия*

[e.lomert@gmail.com](mailto:e.lomert@gmail.com)

Альфа-актинин 4 (ACTN4) - актинсвязывающий белок спектринового суперсемейства, который присутствует как в цитоплазме, так и в ядре клетки. Спектр известных процессов, которые регулируются при его участии, достаточно широк и включает стабилизацию сети актиновых филаментов и их связывание с фокальными контактами, клеточную подвижность, клеточный цикл, репликацию ретровирусов, активацию ядерных рецепторов и NF-карраВ-зависимую транскрипцию. Кроме того, амплификация или сверхэкспрессия ACTN4 являются маркерами различных типов рака. Последние исследования показали, что ACTN4 участвует в миграции раковых клеток, метастазировании и процессе эпителиально-мезенхимального перехода. Однако молекулярные механизмы вовлечения ACTN4 в эти процессы остаются невыясненными.

Для исследования функций ACTN4 в раковых клетках мы трансфецировали клетки немелкоклеточного рака легкого H1299 конструкцией с ACTN4 в одной рамке считывания с GFP. Через два дня после трансфекции GFP-положительные клетки отбирали методом FACS и измеряли уровень пролиферации, клеточный цикл и количество апоптотических клеток. Было обнаружено, что в клетках со сверхэкспрессией ACTN4 увеличен уровень пролиферации по сравнению с контролем, при этом существенных различий в клеточном цикле между клетками со сверхэкспрессией ACTN4 и контрольными обнаружено не было. После добавления аннексина V и PI мы выяснили, что в присутствии экзогенного ACTN4 значительно снижено (в 5,5 раза) количество некротических клеток. Таким образом, увеличение уровня пролиферации

раковых клеток H1299 со сверхэкспрессией актинина может быть частично связано с уменьшением уровня некроза.

Для дальнейшего изучения роли ACTN4 в развитии опухоли мы получаем линии на основе немелкоклеточного рака легкого H1299 с нокаутом ACTN4, частичным нокаутом («выключена» одна аллель) и с активацией транскрипции гена ACTN4 с помощью белка VP64.

### **Сравнение факторов трансляции из мезофильных и термофильных микроорганизмов в гетерологичной белоксинтезирующей системе *in vitro***

Максимова Е. М.<sup>1,2</sup>, Виноградова Д. С.<sup>1,3</sup>,  
Касацкий П. С.<sup>1</sup>, Коневега А. Л.<sup>1,2,4</sup>

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

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

<sup>3</sup> NanoTemper Technologies Rus, Санкт-Петербург, Россия

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

В настоящее время большинство структурных данных функциональных рибосомных комплексов получено с высоким разрешением методом рентгеноструктурного анализа для термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus*. Однако, основной массив биохимических и кинетических данных, раскрывающий особенности молекулярного механизма отдельных реакций в цикле элонгации, получены для мезофильного микроорганизма *Escherichia coli*. В этой работе мы сравнили функциональную активность двух важнейших для биосинтеза белка элонгационных факторов: EF-Tu, ответственного за встраивание аминоксил-тРНК в А сайт рибосомы, и EF-G, катализирующего транслокацию, из организмов *Th. thermophilus* и *E. coli*. Анализ температурных зависимостей связывания аминоксил-тРНК с участием EF-Tu из *Th. thermophilus* и *E. coli* с А сайтом рибосомы показал, что скорость связывания с участием EF-Tu из *E. coli* была в 10 раз выше, чем с участием EF-Tu из *Th. thermophilus* и сохранялась с увеличением температуры (от 20 до 37°C). Эксперименты по связыванию аминоксил-тРНК с участием EF-Tu из *Th. thermophilus* и *E. coli* с А сайтом рибосомы в присутствии тетрациклина также показали сохраняющуюся разницу (в 10 раз) между используемыми элонгационными факторами EF-Tu. Однако использование EF-Tu и рибосом из двух организмов не давало существенного различия в эффективности образования пептидной

связи. В отличие от EF-Tu, при увеличении температуры (от 15 до 50 °C) разницы в скорости транслокации между факторами EF-G из двух организмов не наблюдалось. Использование антибиотиков, таких как гигромицин В, спектиномицин, стрептомицин и виомицин, ингибирующих транслокацию, также не давало разницы в скорости и характере перемещения пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы. Таким образом, две фундаментальные реакции цикла элонгации, характеризуются принципиально разными зависимостями от температуры при рассмотрении гетерологичной системы трансляции *in vitro*. Кинетика реакции декодирования определяется свойствами элонгационного фактора EF-Tu, тогда как кинетические параметры транслокации определяются именно рибосомой, а не элонгационным фактором EF-G.

Эксперименты по изучению функциональной кинетики проведены при поддержке грантом РФФИ 17-14-01416.

# Исследование структуры фосфолипидной транспортной наносистемы методами МУРН и МУРР

*Маслова В. А.<sup>1</sup>, Иваньков А. И.<sup>1,2,3</sup>,  
Грузинов А. Ю.<sup>4</sup>, Земляная Е. В.<sup>1</sup>, Киселев М. А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

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

<sup>3</sup> Институт проблем АЭС, Чернобыль, Украина

<sup>4</sup> European Molecular Biology Laboratory, DESY, Hamburg, Germany

Фосфолипидная транспортная наносистема (ФТНС) – это транспортные наночастицы очень малого размера (150–250 Å), которые имеют строение однослойных везикул [1, 2]. ФТНС используется для транспортировки водонерастворимых лекарств и применяется для увеличения терапевтической эффективности лекарств [3].

Наиболее подходящими методами исследования ФТНС являются малоугловое рассеяние нейтронов (МУРН) и рентгеновских лучей (МУРР) [4, 5].

Эксперименты методом МУРН были выполнены на реакторе ИБР-2 (ОИЯИ, Дубна) [6], методом МУРР на синхротронном источнике КИСИ (НИЦ «Курчатовский институт», Москва).

В представленной работе описаны спектры от фосфолипидной транспортной наносистемы, измеренные на синхротронном и нейтронном источниках, при различной концентрации ФТНС в воде. Определены основные структурные параметры везикулы ФТНС.

Показано, что однородное приближение хорошо описывает спектры МУРН, в то время МУРР плохо поддаются описанию в области Гинье. Это связано с особенной плотностью распределения длины рассеяния нейтрона и фотона в направлении нормали к липидному бислою.

Работа выполнена при финансировании РНФ, грант 14-12-00516.

1. Арчаков А. И., Гусева М. К., Учайкин В. Ф. и др. // Пат. 2463057, Российская Федерация, МПК А61К 31/685 А61К 9/127 А61К 1/16 В82В 1/00.
2. Kiselev M.A., Zemlyanaya E.V., Ipatova O.M., et al. // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2015. V. 114. P. 288.
3. Ipatova O.M., Torkhovskaya T.I., Medvedeva N.V. et al. // Biomedical Chemistry. 2010. V. 4. P. 82.
4. Киселев М. А. // ЭЧАЯ. 2011. Т. 42. С. 578.
5. Свергун Д. И., Фейгин Л. А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986. 276 с.
6. Kuklin A.I., Islamov A.K., Gordeliy V.I. Scientific reviews: Two-detector system for small-angle neutron scattering instrument // Neutron News. 2005. V. 16. No. 3. P. 16–18.

## **Анализ транскриптома *Drosophila melanogaster* при тканеспецифичном нокдауне гена *swiss cheese***

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

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

*Drosophila melanogaster* широко используется для моделирования нейродегенеративных заболеваний человека и для изучения фундаментальных аспектов феномена нейродегенерации. Одним из важных эволюционно консервативных генов, регулирующих у дрозофилы жизнеспособность и функциональную активность как нейронов, так и глиальных клеток, является ген *swiss cheese* (*sws*), мутации в котором приводят к нейродегенерации. Нокдаун *sws*, вызванный тканеспецифичной РНК-интерференцией в нервных клетках, приводит к прогрессирующей с возрастом нейродегенерации, нарушению локомоторной активности и значительному снижению продолжительности жизни. При нокдауне *sws* в клетках глиии кортекса наблюдаются изменения подобного качества, но менее выраженные и более отложенные во времени. Несмотря на то, что известна функция *SWS* как фосфатидилхолин-лизофосфолипазы и регуляторной субъединицы протеинкиназы *A*, ингибирующей каталитическую субъединицу *PKA-C3*, механизмы нейропатии остаются неизвестными.

Для описания изменений, происходящих в клетках нервной системы при нокдауне *sws*, мы провели транскриптомный анализ пула мРНК самцов дрозофилы в возрасте 30 дней жизни, используя микрочипы, которые позволяют оценить уровень 18952 генов. Экспрессию генов у гибридов *elav-Gal4;UAS-RNAi-sws+* (нокдаун *sws+* в нейронах) и *NP2222-Gal4;UAS-RNAi-sws+* (нокдаун *sws+* в глиии кортекса) сравнивали с таковой в контроле (*CantonS*).

Мы показали увеличение представленности транскриптов генов, контролирующих метаболизм глутатиона, ксенобиотиков, аминогликанов и модифицированных аминокислот в обоих изученных нокдаунах. Кроме того, обнаружено уменьшение экспрессии генов, регулирующих образование веретена деления и цитоскелет микротрубочек в обоих изученных нокдаунах.

Полученные результаты помогут найти потенциальных партнёров *sws* и установить генетические сети, в которых *sws* принимает участие.

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

## **Трехмерная реконструкция и анализ биосовместимых полимерных матриц**

Михуткин А. А.<sup>1</sup>, Камышинский Р. А.<sup>1,2</sup>, Орехов А. С.<sup>1</sup>, Тенчурин Т. Х.<sup>1</sup>,  
Григорьев Т. Е.<sup>1</sup>, Чвалун С. Н.<sup>1</sup>, Васильев А. Л.<sup>1</sup>

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

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

Работа [1] посвящена разработке и применению методов трехмерной реконструкции и количественного анализа по данным конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) применительно к исследованию полимерных матриц. Проведено комплексное трехмерное исследование биосовместимых полимерных матриц на основе полиамида-6 для тканевой инженерии с использованием КЛСМ, а также растровой электронно-ионной микроскопии. Рассмотрено влияние экспериментальных условий, различных длин волн лазера и иммерсионных сред, на результаты КЛСМ. Посредством компьютерной обработки экспериментальных данных восстанавливалась структура волокон матрикса и пустотного пространства между ними. Полученные трехмерные реконструкции позволили произвести всесторонний численный анализ, в частности, вычислить пористость и объемную долю волокон. Применялись и были разработаны различные подходы трехмерной реконструкции и анализа волокон и пустотного пространства матриц, и проведена их детальная количественная характеристика. В результате, были оценены среднее расстояние между волокнами в трех направлениях и средний диаметр пор; оценена морфология, текстура и ориентация волокон, подсчитан средний диаметр волокон. Проведено моделирование проникновения клеток в пористое пространство матрикса, предполагая сферическую форму клеток, двумя специально разработанными подходами. Оценена эффективная пористость, т.е. эффективные объемные доли пор для определенного диаметра клетки относительно объема всего пористого пространства. Моделирование показало, что эффективный объем пористого пространства зависит от размера проникающей сферы, уменьшаясь с почти 90 % для сферы диаметром 6 мкм до 0,2 % для сферы диаметром 24 мкм. Данные результаты сравнивались с результатами, полученными с помощью растровой электронной микроскопии. Проведенные исследования позволяют приблизиться к созданию искусственных тканей, в частности биосовместимых матриц с заданным комплексом механических, биохимических и морфологических свойств.

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

1. Mikhutkin A. A., Kamyshinsky R. A. et al., BioNanoSci. (2017).  
<https://doi.org/10.1007/s12668-017-0493-0>

**Роль белка E1A в NaB-зависимой модуляции активности  
транскрипционных факторов FoxO в фибробластах,  
трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras**

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

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

*1195alisa@gmail.com*

Бутират натрия (NaBut) является ингибитором деацетилаз гистонов и вызывает апоптоз в ряде опухолевых клеточных линий. Наше исследование направлено на изучение молекулярного механизма действия NaBut в клетках, трансформированных онкогенами E1A и Ras. В эмбриональных фибробластах мыши, трансформированных онкогенами E1A и Ras (линия E1A+Ras), NaBut не индуцирует апоптоз, а вызывает необратимый блок клеточного цикла и старение [1]. При этом NaBut при продолжительном действии вызывает накопление активных форм кислорода (ROS) в E1A+Ras клетках, что сопровождается и, по-видимому, обусловлено снижением содержания транскрипционных факторов семейства FoxO. В E1A+Ras клетках стабильность белков FoxO обеспечивается балансом активностей двух трансформирующих белков E1A и Ras, каждый из которых вносит вклад в регуляцию стабильности FoxO. Аденовирусный белок E1A стабилизирует белки FoxO, предотвращая их убиквитин-зависимый протеолиз [2]. С другой стороны белок Ras активирует киназный каскад PI3K-РКВ/Akt, что должно приводить к деградации FoxO, и MAPK киназные каскады, которые также регулируют активность и стабильность белков семейства FoxO [3].

Методом иммуноблотинга белков нами было показано, что содержание Ras не изменялось при действии NaBut, тогда как экспрессия E1A драматически снижалась со временем действия NaBut. Методом иммунопреципитации с последующим иммуноблотингом было выявлено взаимодействие белков E1A и FoxO1 в контрольных необработанных клетках E1A+Ras, которое ослабевало со временем действия NaBut. Таким образом, можно предположить, что одной из причин деградации FoxO при действии NaBut является диссоциация стабилизирующего комплекса E1A/FoxO1 вследствие снижения экспрессии E1A.

1. Abramova M.V., Pospelova T.V. et al., J. Biol. Chem. 281, 30 (2006).
2. Su J.-L., Cheng X. et al., Cancer research. 71, 21 (2011).
3. Huang H., Tindall D.J. Cell. Sci. 120, 2479–2487 (2007).

## **Разработка метода селекции обратимых конкурентных ингибиторов ферментов нейродегенеративных заболеваний**

*Мухаметгалиева А. Р., Агълямова А. Р., Фаттахова А. Н., Массон П.*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

*[aliya\\_rafikovna@mail.ru](mailto:aliya_rafikovna@mail.ru)*

Холинэстеразы играют большую роль в нейродегенеративных заболеваниях. Ацетилхолинэстераза (АХЭ) главным образом участвует в процессах нейрогуморальной и синаптической передачи. Ингибирование АХЭ и бутирилхолинэстеразы путем связывания с сериновым активным сайтом является основным механизмом действия фосфорорганических соединений. Несмотря на высокую степень изученности механизмов ферментативного катализа АХЭ, на фармакологическом рынке ощущается недостаток препаратов, купирующих судорожные состояния поперечнополосатых, гладких мышц, а также миокарда.

Ингибиторы медленного связывания обладают фармакологическими преимуществами по сравнению с классическими обратимыми ингибиторами (т.к. пребывания в мишени длительное время приводит к большей эффективности с минимальным побочным действием). Ингибиторы медленного связывания холинэстераз являются перспективными новыми препаратами для лечения болезни Альцгеймера, миастении и нейропротекции, а также при интоксикации химических веществ.

Нами разработана концептуальная модель для селекции обратимых конкурентных ингибиторов, которые проявляют активность в дозах сопоставимых с эндогенными лигандами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ-17-32 (0234/02.34.41036.001).

**Получение клеточных линий рака поджелудочной железы,  
стабильно экспрессирующих  
доксидиклин-зависимую эндонуклеазу Cas9**

*Нургалеева А. К., Скрипова В. С., Минигулова Л. Ф., Киямова Р. Г.*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

[alsina97@mail.ru](mailto:alsina97@mail.ru)

Рак поджелудочной железы является одним из самых агрессивных среди всех видов рака, 5-летняя выживаемость при РПЖ составляет всего 8 % [1]. РПЖ характеризуется локальной инвазией, отдаленным метастазированием и высокой степенью химиорезистентности [2]. На сегодняшний день до конца не выявлены механизмы множественной резистентности РПЖ к химиотерапевтическим препаратам, поэтому идентификация генов, продукты которых вовлечены в эти механизмы, является актуальной задачей. Для поиска таких генов используют различные подходы, в том числе технологию редактирования генома CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) [3].

С помощью технологии CRISPR/Cas9 можно получать нокауты таргетных генов и тем самым определять их роль в развитии устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам. В случае если нокаут таргетного гена способствует увеличению чувствительности или развитию резистентности опухолевых клеток к тестируемому препарату, то следующим шагом может быть поиск и разработка таргетных препаратов, которые бы регулировали экспрессию генов и/или работу продукта данного гена [4]. Одним из этапов использования технологии CRISPR/Cas9, для изучения химиорезистентности опухолей, является получение опухолевых клеточных линий, экспрессирующих эндонуклеазу Cas9.

Целью данной работы является получение клеточной линии рака поджелудочной железы MIA PaCa-2, экспрессирующей доксициклин-зависимую эндонуклеазу Cas9.

**Материалы и методы.** Для получения клеточной линии рака поджелудочной железы, стабильно экспрессирующей доксициклин-зависимую эндонуклеазу Cas9, были амплифицированы рекомбинантные плазмиды с использованием бактерий *E. Coli Nova Blue* (Novagen, США). С помощью амплифицированных упаковочных плазмид и плазмид, несущих ген эндонуклеазы Cas9 слитый с FLAG эпитопом, были получены лентивирусные частицы, содержащие ген эндонуклеазы Cas9. Полученными лентивирусными частицами была проведена трансдукция клеточной линии рака поджелудочной железы MIA PaCa-2 для получения моноклонов, стабильно экспрессирующих эндонуклеазу Cas9. Для проверки наличия экспрессии эндонуклеазы Cas9 в моноклональных клеточных линиях MIA-PaCa-2/Cas9 применяли Вестерн-блот анализ

антителами против FLAG эпитопа (MA1-91878; Thermo Fisher Scientific, США).

**Результаты.** В ходе эксперимента было получено 5 индивидуальных клонов клеточной линии рака поджелудочной железы: MIA PaCa-2/Cas9-B7, MIA PaCa-2/Cas9-B8, MIA PaCa-2/Cas9-C7, MIA PaCa-2/Cas9-D8, MIA PaCa-2/Cas9-G10. Вестерн-блот анализ растворимых фракций лизатов всех индивидуальных клонов клеточной линии MIA PaCa-2/Cas9 показал наличие доксициклин-зависимой экспрессии рекомбинантной эндонуклеазы Cas9 в клетках клонов MIA PaCa-2/Cas9-D8 и MIA PaCa-2/Cas9-G10. Повторный Вестерн-блот анализ подтвердил наличие доксициклин-зависимой экспрессии рекомбинантной эндонуклеазы Cas9 в индивидуальных клонах MIA PaCa-2/Cas9-D8 и MIA PaCa-2/Cas9-G10.

**Выводы.** Таким образом, в результате проведенной работы было получено две моноклональные клеточные линии MIA PaCa-2/Cas9-D8 и MIA PaCa-2/Cas9-G10, стабильно экспрессирующие рекомбинантную доксициклин-зависимую эндонуклеазу Cas9. Эти клеточные линии будут использованы для получения нокаутных клеточных линий с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9, в том числе, для выявления генов, вовлеченных в регуляцию чувствительности к химиопрепаратам, применяемым для лечения рака поджелудочной железы.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-15-20032)

1. Baines A.T., Martin P.M., Rorie C.J. Current and Emerging Targeting Strategies for Treatment of Pancreatic Cancer // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. – 2016. – V.144. – P. 277–320.
2. Liu H., Li L., Chen H., Kong R., Pan S., Hu J., Wang Y., Li Y., Sun B. Silencing IGFBP-2 decreases pancreatic cancer metastasis and enhances chemotherapeuticsensitivity // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. – P. 61674–61686.
3. Bi H., Yang B. Gene Editing With TALEN and CRISPR/Cas in Rice // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. – 2017. – V. 149. – P. 81–98.
4. Gaponova A.V., Deneka A.Y., Beck T.N., Liu H., Andrianov G., Nikonova A.S., Golemis E.A., Serebriiskii I.G. Identification of evolutionarily conserved DNA damage response genes that alter sensitivity to cisplatin // *Oncotarget* – 2017. – V. 8. – P. 19156–19171.

## **Активность кальпаинов клеток ЦНС при повышенном содержании марганца**

*Обламская И. С., Майстренко В. А.,  
Скоморохова Е. А., Карпенко М. Н.*

*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

*I.S.Oblamskaya@mail.ru*

Марганец (Mn) является важным микроэлементом, который необходим для функционирования многих ферментов. Повышение же содержание Mn в организме приводит к развитию тяжелых нарушений ЦНС, напоминающих по симптоматике болезнь Паркинсона; такое состояние носит название марганцевая энцефалопатия [1]. В основном Mn накапливается в клетках базальных ганглиев. Выбор лечения данной формы патологии в настоящее время ограничен препаратами леводопы и ЭДТА. В обоих случаях наблюдается ограниченный и неустойчивый терапевтический эффект. По этой причине необходим поиск новых мишеней для эффективного фармакологического воздействия с целью подавления развития или снижения выраженности марганцевой энцефалопатии. Потенциальной мишенью может быть кальпаиновая система. Неконтролируемая активация кальпаинов вызывает преимущественно дегенерацию дофаминергических нейронов [2].

Работа выполнена на крысах линии Вистар, массой 220–250 г (n=20). Экспериментальная группа крыс (n=10) получала интраназально  $MnCl_2$  (1 мг/дн на животное) в течение 10 недель. Контрольные животные – тот же объем физиологического раствора. Далее при помощи методов ААС были измерены уровни Mn в обонятельных луковицах, гиппокампе и стриатуме. Были определены уровни мРНК, концентрация и активность m-/μ-кальпаинов.

Оказалось, что уровень Mn значительно выше у опытной группы крыс по сравнению с контрольной (в 2 раза в обонятельных луковицах и в 4 раза в стриатуме). Кроме этого мы обнаружили 2-кратное увеличение уровней мРНК m-/μ-кальпаинов в гиппокампе и 2,5-кратное - мРНК m-кальпаина в стриатуме. Было показано, что уровень белка m-кальпаина в стриатуме и гиппокампе повышен, но для μ-кальпаина подобных изменений не было выявлено. Было выявлено, что активность этих двух изоформ кальпаина увеличивается в обеих областях мозга.

1. O'Neal S. L., Zheng W., J. Curr. Environ. Health. Rep, 3, 315–328 (2015).
2. Levesque S., Wilson B., et.al. J. Brain, 3, 808–821 (2010).

## Механизм секреции м-кальпаина из синапсом

*Пестерева Н. С.<sup>1</sup>, Карпенко М. Н.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

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

[pesterevans@yandex.ru](mailto:pesterevans@yandex.ru)

М-кальпаин – наиболее распространенный член семейства кальций-зависимых протеаз – до недавнего времени считался исключительно внутриклеточным белком. Однако в исследованиях последних лет м-кальпаин был найден в сыворотке крови, синовиальной жидкости и ликворе пациентов с нейродегенеративными расстройствами [1, 2]. Механизм секреции/высвобождения кальпаина во внеклеточное пространство ранее не изучался. Данная работа посвящена исследованию способности м-кальпаина секретироваться/высвободиться из клетки и выявлению возможных механизмов его высвобождения. Работа проводилась на выделенных нервных окончаниях – синапсом, способных сохранять свою физиологическую активность в течение нескольких часов. Методом иммунопреципитации с последующим иммуноблоттингом мы показали, что м-кальпаин обнаруживается во внесинапсомальной среде уже через 30 минут после инкубации синапсом в буфере Рингера, причем данный эффект не связан с их механическим разрушением. Далее методом казеиновой зимографии в растворе с использованием FITC-казеина (высокоспецифичного субстрата кальпаина) была показана способность м-кальпаина высвободиться из нервных окончаний в активной форме. Поскольку анализ аминокислотной последовательности м-кальпаина показал отсутствие сигнальной последовательности для классического типа секреции, мы предположили, что кальпаин секретруется по неклассическому пути. Потому в эксперименте был использован ингибитор ABC-транспортёров – глибурид. Было показано, что он подавляет секрецию м-кальпаина.

Таким образом, полученные нами данные, позволяют предположить, что при определенных, вероятнее всего, патологических состояниях м-кальпаин может секретироваться из клетки через ABC-транспортёры.

1. Yamamoto S., Shimizu K, et al., J. Arthritis & Rheumatism. 11, 1309–1317 (1992).
2. Mortensen A. M., Novak R. F., J. Toxicology and applied pharmacology. 2, 180–188 (1992).

## **Сравнительный анализ протеомных профилей клеток глиобластомы и фибробластов на уровне протеоформ**

*Петренко Е. С.<sup>1</sup>, Клейст О. А.<sup>2</sup>, Легина О. К.<sup>2</sup>, Белякова Н. В.<sup>2</sup>,  
Пантина Р. А.<sup>2</sup>, Нарыжный С. Н.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
им. В. Н. Ореховича, Москва, Россия

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

[el.petrenko@bk.ru](mailto:el.petrenko@bk.ru)

Глиобластома, наиболее частая и наиболее агрессивная форма опухоли мозга, которая составляет до 52 % первичных опухолей мозга и до 20 % всех внутричерепных опухолей. Средняя продолжительность жизни пациентов, у которых выявлена глиобластома, составляет около года, что подчеркивает необходимость ранней диагностики и поиска путей лечения опухоли. На сегодняшний день основными методами диагностики данного заболевания являются компьютерная томография и биопсия мозга. Поэтому имеется острая необходимость в разработке новых, не инвазивных методов ранней диагностики.

В качестве анализируемого материала мы использовали нормальные фибробласты и раковые (глиобластомные) клеточные линии. Ранее мы провели анализ протеомных профилей таких линий и показали, что они очень похожи, однако уровни содержания многих белков сильно отличаются. Среди таких белков – альфа-енолаза (ENO1\_HUMAN), аннексин 1 (ANXA1\_HUMAN), аннексин 2 (ANXA2\_HUMAN), PCNA (PCNA\_HUMAN), p53 (TP53\_HUMAN) и другие. С помощью разработанных нами методов исследований, мы теперь имеем возможность для более детального панорамного анализа не просто белков, но и протеоформ (специфических белковых форм). Построение 3D-графиков, где каждый график выражает набор протеоформ, закодированных одним и тем же геном, позволило наглядно представить все их разнообразие. Многие потенциальные биомаркеры глиобластомы характеризуются большим количеством протеоформ. Эти протеоформы могли бы быть источниками высоко специфических маркеров и мишеней для терапии.

Благодарности.

Масс-спектрометрические работы выполнены на приборной базе ЦКП «Протеом человека» в ИБМХ.

## **Криоэлектронная микроскопия 70S рибосомных комплексов с антибиотиками**

*Пичкур Е. Б.<sup>1</sup>, Касацкий П. С.<sup>3,4</sup>, Полесскова Е. В.<sup>3</sup>,  
Максимова Е. М.<sup>3,4</sup>, Баймухаметов Т. Н.<sup>1,3</sup>, Пресняков М. Ю.<sup>1</sup>,  
Мясников А. Г.<sup>5</sup>, Васильев А. Л.<sup>1,2,3</sup>, Коневега А. Л.<sup>1,3,4</sup>*

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

<sup>2</sup> *Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография  
и фотоника» РАН, Москва, Россия*

<sup>3</sup> *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

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

<sup>5</sup> *Калифорнийский университет, Сан-Франциско, США*

[eugene.pichkur@gmail.com](mailto:eugene.pichkur@gmail.com)

Рибосома – это сложный макромолекулярный комплекс, состоящий из РНК и белков, реализующий в живых клетках трансляцию информации с мРНК в последовательность аминокислот. Несмотря на прогресс в изучении структуры и функции рибосом, детальный механизм работы рибосом до сих пор не до конца ясен. Целью данной работы является объяснение молекулярного механизма реакций в цикле элонгации. С этой целью был задействован крио-ПЭМ Krios (FEI, США), оснащенный корректором сферических аберраций и высокоэффективным детектором электронов Falcon II, что позволило установить структуру 70S рибосомы (*E. coli*) с разрешением в среднем 3.2 Å (некоторые части комплекса имеют разрешение 2.8 Å и лучше) в претранслокационном состоянии. Витрификация образца производилась при 4 °C и 100 % влажности в установке Vitrobot Mark IV (FEI). Было собрано 3783 изображений, полученных при ускоряющем напряжении 300 кВ, увеличении 75000х (размер пикселя 0.859 Å) с дефокусами от –0.6 до –3 мкм. Процесс сбора данных занял 7 дней. Было выбрано 505,830 изображений проекций, которые затем были вырезаны в виде изображений 512х512 пикселей при помощи Relion 2.0.2. После выполнения двумерной классификации сжатых в 8 раз изображений, были выделены усредненные классы, свободные от льда и загрязнений. «Частицы», составляющие эти классы, использовались в дальнейшем для двух раундов трехмерной классификации. Отобранные по итогам 161,188 изображений проекций использованы для финальной трехмерной реконструкции. Разрешение финальной структуры, оцененное после постобработки, составило 3.2 Å. Полученная пространственная структура позволяет идентифицировать сайт связывания антибиотика и положения тРНК, в том числе в новых, ранее не описанных в литературе, промежуточных положениях, соответствующих движению тРНК в процессе транслкации.

Работа поддержана грантом РНФ 17-14-01416.

## **N-(Сульфонил)-фосфорамидные олигонуклеотиды (СФО) как потенциальные антисмысловые терапевтические агенты**

*Прохорова Д. В.<sup>1,2</sup>, Буракова Е. А.<sup>2</sup>,  
Фокина А. А.<sup>2</sup>, Челобанов Б. П.<sup>1,2</sup>, Стеценко Д. А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Россия

[prohorova1994@gmail.com](mailto:prohorova1994@gmail.com)

Аналоги ДНК, модифицированные по межнуклеотидной фосфатной группе, рассматриваются в настоящее время как перспективные антисмысловые терапевтические препараты для лечения рака, генетических болезней, вирусных или бактериальных инфекций. Ранее было показано, что олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие одну или несколько N-(сульфонил)-фосфорамидных групп, образуют устойчивые комплексы с ДНК, однако оставалось неизвестным средство данных производных к РНК, что не позволяло сделать вывод об их применимости как потенциальных терапевтических средств.

Нами были синтезированы новые N-(сульфонил)-фосфорамидные олигодезоксирибонуклеотиды (СФО), в которых фосфатные группы полностью замещены тозилфосфорамидными, мезилфосфорамидными или другими подобными группами [1, 2]. Было выявлено, что некоторые N-(сульфонил)-фосфорамидные олигонуклеотиды способны активировать фермент РНКазу Н в зависимости от структуры: природный олигодезоксинуклеотид  $\geq$  мезилфосфорамидный олигодезоксинуклеотид  $>$  N-(1-гексансульфонил)-фосфорамидный олигодезоксинуклеотид  $\gg$  N-(1-бутансульфонил)-фосфорамидный олигодезоксинуклеотид.

Таким образом, нами было показано, что мезилфосфорамидные и N-(1-гексансульфонил)-фосфорамидные олигодезоксинуклеотиды образуют прочные комплементарные комплексы как с ДНК, так и с РНК, устойчивы к нуклеазам и способны необратимо инактивировать РНК с использованием клеточной РНКазы Н. Это позволяет рассматривать данные аналоги ДНК как перспективную основу для создания антисмысловых терапевтических препаратов.

Авторы благодарят РФФИ за частичную поддержку (грант № 16-03-01055). Синтез олигонуклеотидов проводился за счет гранта РНФ № 17-44-07003.

1. Prokhorova D.V., Chelobanov B.P., Burakova E.A., Fokina A.A., Stetsenko D.A., *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **2017**, 43, 39-43.
2. Chelobanov B.P., Burakova E.A., Prokhorova D.V., Fokina A.A., Stetsenko D.A., *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **2017**, 43, 664-668.

# Структурные нуклеотидные блоки, необходимые для формирования люминесцирующих кластеров серебра на олигонуклеотидной матрице

Рамазанов Р. Р.

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

[r.ramazanov@spbu.ru](mailto:r.ramazanov@spbu.ru)

Сегодня в качестве перспективных люминофоров для создания биомаркеров *in vivo* широко рассматриваются кластеры серебра размером не более 2 нм, стабилизированные биополимерной матрицей, в частности олигонуклеотидной [1]. При возбуждении в УФ диапазоне небольшие кластеры серебра (до 10 атомов) проявляют высокую яркость люминесценции и фотостабильность в широком диапазоне видимого спектра. Несмотря на значительный рост количества экспериментов в этой области последние 10 лет на сегодняшний день не существует оформленных представлений о структуре получаемых люминофоров и предпосылках их роста.

В нашей работе мы применили подход, основанный на сравнительном анализе экспериментальных и расчетных спектров возбуждения и поляризации люминесценции [2]. Теоретическая часть работы включала расчеты равновесных геометрий и МД-расчеты колебательной структуры в ансамбле NVT на протяжении 5 пс с шагом в 0.5 фс в рамках комбинированного метода КМ/ММ полноразмерных матриц ДНК с кластерами серебра в реальном водно-солевом окружении в условиях полной электронейтральности. Полученные колебательные траектории позволили выполнить расчеты спектров возбуждения и поляризации люминесценции для различных металлических структур кластеров в реальном окружении полимерной матрицы и провести сравнение с экспериментальными данными. На основе полученных данных предложена модель образования люминесцирующих кластеров серебра и были выделены два элементарных блока –  $[Y_4(Ag^+)_2Ag^0]$  и  $[Y_4X_2(Ag^+)_2(Ag^0)_2]$ , где Y – только G или только C, а X – C или T, из которых посредством комбинации могут быть получены люминофоры видимого диапазона на произвольных олигонуклеотидных матрицах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №16-32-00293 мол\_а.

1. Shang L., Dong S., Nienhaus G.U. Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano Today*. (2011), 6 (4), 401–418.
2. Ramazanov R.R. et al. Ag–DNA Emitter: Metal Nanorod or Supramolecular Complex? *J. Phys. Chem. Lett.* (2016), 7, 3560–3566.

## **Вторичная и надмолекулярная структура сывороточного альбумина человека в растворах при различных рН**

*Романов Н. М., Баранова Ю. В., Везо О. С., Поляничко А. М.*

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

*[nikmromanov@gmail.com](mailto:nikmromanov@gmail.com)*

Сывороточный альбумин человека (САЧ) является одним из главных белков-переносчиков в крови человека. В данной работе представлены результаты исследований влияния рН раствора на форму и вторичную структуру белка. Возможность переноса альбумином ионов металлов зависит как от состояния белка (мономер, димер, олигомер), так и от его формы и вторичной структуры [1].

Для анализа формы и размеров молекул САЧ в работе использовался метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и динамического светорассеяния в диапазоне рН 2-11.

Вторичная структура белка определялась по спектрам ИК поглощения методом декомпозиции полосы амид I [2]. Такой анализ позволяет различить в составе белка до 5-7 подтипов вторичной структуры [3–5]. При увеличении рН от 7 до 11  $\alpha$ -спиральность САЧ уменьшается с 70 % до 58 %.

Методом МУРР было установлено, что в растворах САЧ при рН от 4 до 11 наблюдаются два типа объектов, различные по форме и размерам. Радиус инерции белковых молекул находится в пределах от 2,59 до 2,83 нм, максимальный линейный размер частицы  $7,0 \leq D_{\max} \leq 9,4$  нм, объем Порода находится в интервале от 94,5 до 115 нм<sup>3</sup>. При понижении рН < 4 в растворе появляются частицы третьего типа с радиусом инерции 3,4 нм,  $10,2 \leq D_{\max} \leq 11,0$  , и объемом Порода 66-78 нм<sup>3</sup>.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-08-06876, № 18-08-01500). Часть исследований проведены в ресурсных центрах Научного Парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники».

1. Поляничко А. М. и др. Инфракрасная спектроскопия растворов альбуминов в присутствии ионов металлов, Вестник СПбГУ. Физика и химия. 146, 62 (2017).
2. Byler D.M., Susi H., Biopolymer. 469 (1986).
3. Kong J., Yu S., Acta biochimica et biophysica Sinica., 549 (2007).
4. Поляничко А. М. и др. Анализ вторичной структуры линкерного гистона H1 по спектрам инфракрасного поглощения, Цитология, 316, 4 (2014).
5. Polyanichko A.M. et al., Cell and Tissue Biology, 352, 4 (2014).

## **Проявление размерных эффектов в кристаллизации и плавлении водных кластеров в нативном и аморфном крахмалах по данным ДСК**

*Романова А. Ю., Белопольская Т. В.,  
Церетели Т. И., Грунина Н. А., Смирнова О. И.*

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

*[ppollikk@yandex.ru](mailto:ppollikk@yandex.ru)*

К изучению фазового перехода воды, замерзающей при охлаждении ниже 0°, т.е. переохлажденной воды, до сих пор проявляется большой интерес. Такая вымораживаемая вода (ВВ) в системе биополимер-вода при нагревании плавится. В результате проведенных исследований с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии были изучены процессы плавления и кристаллизации воды, диспергированной в картофельном крахмале в интервале изменения влажности биополимера от 27 до 45 % [1, 2]. Получены зависимости температур и теплот исследуемых процессов от степени гидратации крахмала в нативном и аморфном состояниях. Установлен размерный эффект в зависимостях теплот плавления и кристаллизации ВВ для обоих состояний крахмала. Полученные значения теплот кристаллизации и плавления ВВ при увеличении степени гидратации крахмала изменяются нелинейно. Напротив, проявление размерного эффекта в зависимостях температур плавления и кристаллизации вымораживаемой воды обнаружено лишь для нативного состояния биополимера. Подобный эффект в аморфном крахмале не был обнаружен. При этом после аморфизации крахмала была получена обратная зависимость: с уменьшением влажности температуры обоих переходов ВВ повышаются. Обсуждены возможные причины отсутствия размерного эффекта в зависимостях температур обоих переходов от влажности аморфного крахмала, которые существенно отличаются для процессов плавления и кристаллизации ВВ в этом случае. Обнаружен характерный для малых частиц гистерезис при плавлении и кристаллизации вымораживаемой воды, проявление которого заметно отличается для нативного и аморфного состояний картофельного крахмала.

1. Белопольская Т. В., Церетели Г. И., Грунина Н. А., Смирнова О. И., Романова А. Ю. Материалы XV Международной конференции по термическому анализу и калориметрии в России (RTAC-2016).
2. Церетели Г. И., Белопольская Т. В., Грунина Н. А., Смирнова О. И., Романова А. Ю. Биофизика, 6 (2016).

**Исследование структуры амилоидных фибрилл  
на основе дрожжевого прионного белка Sup35p  
с использованием флуоресцентного зонда тιοфлавина Т**

*Сулацкая А. И.<sup>1</sup>, Родина Н. П.<sup>1,2</sup>, Сулацкий М. И.<sup>1</sup>, Белоусов М. В.<sup>3</sup>,  
Бондарев С. А.<sup>3</sup>, Журавлева Г. А.<sup>3</sup>, Кузнецова И. М.<sup>1</sup>, Туроверов К. К.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

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

<sup>3</sup> *Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия*

[natalia240994@gmail.com](mailto:natalia240994@gmail.com)

Одним из широко используемых подходов для изучения амилоидных фибрилл является исследование их взаимодействия с флуоресцентными зондами и, в частности, с бензтиазольным красителем тιοфлавином Т (ThT). Исследования последних лет показали перспективность использования ThT не только в качестве маркера на образование амилоидных фибрилл, но и для сравнительного изучения их структуры. Целью настоящей работы стало исследование структуры амилоидных фибрилл на основе дрожжевого прионного белка Sup35p.

Изучение взаимодействия ThT с амилоидными фибриллами осложняется присутствием в исследуемых образцах равновесной системы свободного и связанного с фибриллами красителя. Для определения характеристик каждой из этих фракций ThT нами был предложен подход, основанный на подготовке исследуемых растворов методом равновесного микродиализа [1]. Применение данного подхода позволило определить параметры связывания ThT с амилоидными фибриллами на основе Sup35p (число мод связывания, аффинность и стехиометрию взаимодействия с каждой из этих мод), а также фотофизические характеристики связанного с фибриллами красителя (коэффициент молярной экстинкции, квантовый выход флуоресценции и др.). При исследовании флуоресцентных характеристик ThT регистрируемые значения интенсивности флуоресценции красителя были скорректированы на эффект первичного внутреннего фильтра [2]. Так же были определены время жизни и анизотропия флуоресценции связанного с фибриллами ThT. Анализ полученных результатов позволил показать сходства во взаимодействии красителя с фибриллами на основе Sup35p и на основе других амилоидогенных белков, а также выявить структурные особенности амилоидных фибрилл на основе Sup35p.

Работа выполнена при поддержке Программы «Молекулярная и клеточная биология» РАН, гранта РФФИ 16-04-01614\_а и стипендии Президента РФ СП-841.2018.4.

1. Kuznetsova I.M., Sulatskaya A.I. et al., Mol. Neurobiol. 45, 488-498 (2012).

2. Fonin A.V., Sulatskaya A.I. et al., Plos One. 9 (7), e103878 (2014).

# **Динамика сокращения шприцеобразного механизма бактериофага Т4 и других биологических наномашин**

Рошаль Д. С.

*Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия*

[rochal.d@yandex.ru](mailto:rochal.d@yandex.ru)

Исследование устройства и принципов функционирования шприцеобразных наномашин важно, так как они могут быть использованы для антибактериальной терапии, особенно в случае развития у вредоносных бактерий резистентности по отношению к традиционным антибиотикам.

В работе построена простая модель, объясняющая принципы устройства и особенности работы шприцеобразных наномашин, выявлена роль соразмерности между белковыми трубками хвостового механизма бактериофага Т4 и пиоцина R2 [1]. Показано, что при срабатывании наномашин перестройка структуры чехла, приводящая к его сжатию и скручиванию, происходит таким образом, что сжатая оболочка вновь становится соразмерной с внутренней трубкой. Найденная соразмерность проявляется в ранее неизвестной простой геометрической связи между параметрами внешней и внутренней нанотрубок. Появление соразмерности между сжатой оболочкой и внутренней трубкой уменьшает как энергию их взаимодействия, так и общую внутреннюю энергию системы. Это повышает эффективность работы наномашин, так как полученный выигрыш в свободной энергии увеличивает крутящий момент внутренней трубки, пробивающей клеточную мембрану [1].

Проведено моделирование динамики сокращения хвоста бактериофага Т4 и пиоцина R2. Как известно, процесс сокращения наномашин, приводящий к инфицированию бактериальной клетки, может быть представлен как движение солитоноподобного возмущения, распространяющегося по внешней трубке шприцеобразной наномашин от опорной пластины. Показано, что сокращение наномашин можно описать начальным толчком, приводящим к переходу первых колец внешней трубки наномашин в сжатое состояние, и дальнейшим движением внешней трубки в предложенном нами двухминимумном потенциале. Минимумы потенциала соответствуют геометрическим параметрам чехла бактериофага Т4 или пиоцина R2 в начальном и сжатом состоянии.

Работа выполнена при поддержке РНФ, грант № 15-12-10004.

1. Rochal S.B, Roshal D.S., Myasnikova A.E., V.L. Lorman, Nanoscale, 2018, DOI: 10.1039/C7NR06940E.

## **Мутации в гене *swiss cheese* приводят к дегенерации определенных типов глиальных клеток в мозге *Drosophila melanogaster***

Рябова Е. В., Сурина Н. В.,  
Жмуйдина Д. Р., Мелентьев П. А., Саранцева С. В.

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

Ген *swiss cheese* (*sws*) *Drosophila melanogaster* кодирует нейрональный трансмембранный белок, который, как предполагается, участвует в взаимодействии нейрон-глия. На данный момент предполагают, что SWS выполняет функцию сериновой эстеразы, мутации в гене которого приводят к ранней гибели, прогрессирующей с возрастом нейродегенерации в мозге, апоптозу нейронов и глиальных клеток, и образованию многослойной глиальной мембраны. Ген *sws* является ортологом гена *NTE* (*neuropathy target esterase*) человека, мутации в котором приводят к ряду заболеваний человека: наследственной спастической параплегии типа SPG39, синдрому Лоренса-Муна, синдрому Гордона Холмса, синдрому Гаучера-Нейгауза и синдрому Оливера-Макфарлейна. На данный момент механизмы развития данных заболеваний до конца не понятны. В данной работе мы использовали линии *долзофилы* с мутациями в гене *sws* (*sws*<sup>1</sup>, *sws*<sup>76-15</sup>) и трансгенные линии с изменением экспрессии (гиперэкспрессия и подавление экспрессии). Ранее нами было показано, что *sws* локализуется в нейронах, но в большей степени в глиальных клетках. В мутантных линиях происходит уменьшение SWS в сравнении с контролем. В работе была исследована морфология различных типов глиальных клеток имаго *Drosophila melanogaster* разного возраста: субпериневральная, глия кортекса и глия кортекса. Результаты показали, что с возрастом нарушается целостность субпериневральной глии, участвующей в образовании гэматоэнцефалического барьера, а также нарушается морфология глии кортекса.

Работа поддержана грантом РФФИ №15-04-09041.

## **Влияние ингибирования SMARCA 2/4 на чувствительность опухолевой клеточной линии SCC61 к цисплатину**

Савенкова Д. В.<sup>1</sup>, Минигулова Л. Ф.<sup>1</sup>, Гавриш К. В.<sup>1</sup>,  
Скрипова В. С.<sup>1</sup>, Серебрянский И. Г.<sup>2</sup>, Киямова Р. Г.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Центр исследований рака "Fox Chase", Филадельфия, США

[darina.sava1@gmail.com](mailto:darina.sava1@gmail.com)

Препараты платины – цитостатические противоопухолевые химиотерапевтические препараты алкилирующего типа, содержащие в составе молекул двухвалентную платину (II). Механизм действия цисплатина основан на нарушении функций ДНК, вызванном химическим повреждением ее оснований. Повреждения ДНК возникают путем образования координационных связей между атомом платины и двумя основаниями ДНК, в результате чего в ДНК образуются внутри- и межнитевые сшивки. На клеточном уровне цисплатин вызывает нарушение репликации и транскрипции, что ведет к задержке клеточного цикла и апоптозу.

Установлено, что у ряда злокачественных опухолей может развиваться резистентность к цисплатину в связи с нарушениями его накопления в клетке, или нарушением механизмов репарации ДНК в опухоли. Поэтому актуальной задачей является увеличение чувствительности опухолевых клеток к действию цисплатины путем поиска новых генов-мишеней, продукты которых могут участвовать в регуляции чувствительности к препарату.

Известно, что снижение экспрессии генов АТФ-зависимых хеликаз SMARCA2 и SMARCA4 может влиять на чувствительность опухолевых клеток к цисплатину (O.Fedorov et al., *Cell Biology*, 2015). В связи с этим был выбран селективный ингибитор продуктов генов SMARCA2, SMARCA4 – PFI-3 (B.Vangamudi et al., *Cancer Research*, 2015).

Целью работы было изучение влияния ингибирования SMARCA2/4 с помощью PFI-3 на чувствительность опухолевой клеточной линии плоскоклеточной карциномы головы и шеи SCC61 к цисплатину.

Для изучения влияния ингибирования продуктов генов SMARCA 2 и SMARCA 4 клетки линии SCC61 инкубировали с цисплатином в диапазоне концентраций от 1 до 128 мкМ с добавлением ингибитора Physcion (25 и 50 мкМ). Согласно полученным данным были построены кривые жизнеспособности в программе GraphPad Prism и определены значения IC50. Уровень статистической значимости между значениями IC50 в экспериментах с добавлением ингибитора и без, определяли согласно критерию Фишера. Статистически значимыми признавались значения  $p < 0,05$ .

В результате было показано, что PFI-3 в количестве 25 и 50 мкМ понижал чувствительность клеточной линии SCC61 к цисплатину на 28 и 65 процентов, соответственно.

Таким образом, при ингибировании белков SMARCA2 и SMARCA4 с помощью PFI-3 наблюдается уменьшение чувствительности клеточной линии SCC61 к цисплатину. Дальнейшее исследование наблюдаемого эффекта важно для изучения механизмов резистентности опухолей к терапии цисплатином.

**Исследование механизмов восстановления транскрипционной активности p53 с мутацией Y220C при помощи низкомолекулярных стабилизаторов**

*Саярова Р. М.<sup>1</sup>, Карцева О. В.<sup>1</sup>, Игнатьев Ю. В.<sup>1</sup>,  
Ризванов А. А.<sup>1</sup>, Бауд М.<sup>2</sup>, Булатов Э. Р.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup> Университет Саутгемптона, Саутгемптон, Великобритания

[sayarova.regina@gmail.com](mailto:sayarova.regina@gmail.com)

Примерно в 50 % случаев инактивация белка p53 в опухолях обусловлена наличием мутаций, которые чаще всего затрагивают ДНК-связывающий домен. Мутации приводят к дестабилизации третичной структуры p53 и, как следствие, нарушению его транскрипционной активности. Онкогенная мутация Y220C является одной из наиболее распространенных для p53. Однако, утраченную функциональную активность Y220C-p53 мутанта в опухолевых клетках возможно восстановить посредством воздействия селективных низкомолекулярных реактиваторов.

В коллаборации с научным коллективом из университета Саутгемптона (Великобритания) было разработано низкомолекулярное соединение MB725 ( $K_d = 4$  мкМ). В настоящее время данное соединение является самым активным из всех известных реактиваторов Y220C-p53 мутанта.

В рамках данного проекта была клонирована плазмида GFP-p53[Y220C] на основе коммерческой плазмиды GFP-p53 (#12091, Addgene) методом сайт-направленного мутагенеза. Проведено секвенирование плазмиды, подтверждено наличие мутации Y220C и отсутствие неспецифических мутаций. В дальнейшем данная плазмида будет трансфицирована в p53-негативную клеточную линию, например, Saos-2 для исследования восстановления утраченной функциональной активности Y220C-p53 мутанта в опухолевых клетках посредством воздействия селективных низкомолекулярных реактиваторов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Гранта Президента РФ МК-4253.2018.4.

## **Модифицирующее влияние патологии легких на уровень хромосомных обменов**

Сердюкова Е. С.

*Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия*

[katya.serdyukova.1997@mail.ru](mailto:katya.serdyukova.1997@mail.ru)

Кемеровская область является крупным промышленным регионом, в котором большую часть предприятий занимают угольные разрезы. Работники угледобывающих предприятий подвержены высокому экспонированию различными генотоксическими факторами, способных оказывать сильное воздействие на генетический аппарат. Среди шахтеров наблюдается высокая частота профессиональных легочных патологий пылевого генеза.

Цель данного исследования – изучить модифицирующее влияние воспалительных заболеваний на уровень хромосомных аберраций (ХА).

Были сформированы когорты по 100 человек: репрезентативный популяционный контроль, здоровые шахтеры, шахтеры с хроническим пылевым бронхитом (ХПБ), шахтеры, страдающие антракосиликозом (АС).

Цитогенетические исследования выполнялись с помощью стандартной методики ХА в лимфоцитах крови, а молекулярно-генетический анализ проводился на методе выделения РНК с последующей количественной ПЦР при использовании генов радиочувствительности – THBS1, ADAMTS, RBFOX1, WHSC1.

Было установлено, что у работников угольных предприятий увеличение всех типов ХА в 3 раза в сопоставлении с популяционным контролем. Так же было показано увеличение хромосомных обменов (ХО) (в первую очередь за счет повышения уровня дицентрических хромосом). Анализ данных ПЦР показал прямую корреляцию между наличием ХО и степенью экспрессируемости гена WHSC1, также отмечено увеличение уровня экспрессии гена с наличием патологии АС [1].

Полученные результаты показывают, что процесс воспаления, происходящий в легких достоверно коррелирует между экспрессией гена гистон-метилтрансферазы NSD2 (WHSC1), что приводит к оксидативному стрессу и увеличению показателя ХО [2].

1. С. А. Васильев и др. Ответ на радиационно-индуцированное повреждение ДНК в нокаутных модельных системах. Актуальные вопросы фундаментальной и клинической онкологии. Томск. 27-28 апреля 2017. С. 26.
2. Schipler A, Iliakis G. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. Nucleic Acids Research. 2013. Vol. 41(16).

## **Исследование молекулярных характеристик хитозанов, полученных из различного природного сырья**

*Слюсаренко М. А.<sup>1</sup>, Дресвянина Е. Н.<sup>2</sup>,  
Губарев А. С.<sup>1</sup>, Евлампиева Н. П.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup> *Санкт-Петербургский государственный университет  
промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, Россия*

В настоящее время хитозан широчайшим образом применяется в косметологии, фармакологии, медицине, пищевой промышленности и других отраслях индустрии. За последнее десятилетие хитозан нашел множество новых применений в современных биотехнологиях, таких как тканевая инженерия, системы таргетивной доставки лекарственных препаратов, генная терапия и другие. Фирмы-производители коммерчески доступного хитозана используют для его получения хитин различного происхождения, выделяемого из скелетов беспозвоночных многих типов, панцирей ракообразных, коконов насекомых, некоторых грибов. Методики выделения также могут варьироваться, поскольку природный хитин находится в составе комплексов с другими биомолекулами, как и методики последующего деацетилирования очищенного продукта. Поскольку эти процедуры связаны с химическим воздействием на полисахаридные цепи, то важно проверить идентичность хитозанов, полученных из разного природного сырья. Для этой цели были приобретены образцы хитозанов, различных фирм, изготовленные в Японии, Германии и России из разного сырья с высокой степенью деацетилирования. Образцы дополнительно переосаждали и определяли их молекулярную массу методом диффузионно-седиментационного анализа, являющегося абсолютным. Методом ЯМР <sup>13</sup>C подтверждали степень деацетилирования, которая варьировалась в интервале 82–94 %. Для сравнения использовали гомологический ряд хитозанов, полученных частичным гидролизом одного исходного высокомолекулярного образца. Был произведен полный анализ гидродинамических параметров макромолекул хитозанов в разбавленных растворах с использованием вискозиметрии, динамического светорассеяния, методов поступательной диффузии и скоростной седиментации. В работе показано, что на уровне молекулярных гидродинамических свойств полисахаридные цепи хитозанов различного происхождения при высокой степени деацетилирования можно рассматривать как идентичные.

## Иммунотерапия НМРЛ

*Старкина О. В., Соколова Т. Н., Калинина А. А.*

*Нижегородский государственный технический университет им. Р. Е. Алексеева,  
Нижний Новгород, Россия*

*[ovshergilova@cellthera.ru](mailto:ovshergilova@cellthera.ru)*

Несмотря на гранты, выделенные на улучшение методов скрининга рака легких, существует проблема раннего выявления заболевания. Более чем у 70 % больных онкология выявляется на поздних стадиях.

Основным методом лечения рака легкого является хирургический. Однако радикальную операцию удастся выполнить только 10–20 % всех заболевших [1].

Лучевую терапию обычно проводят больным без отдельных метастаз, которым не показано хирургическое лечение.

Лечение больных с распространенным НМРЛ осуществляется с помощью системной цитотоксической химиотерапии, основной целью которой является уничтожение растущих или быстро делящихся клеток.

В последние годы активно изучались молекулярные нарушения при раке легкого. Существующие и предполагаемые молекулярные маркеры должны быть предусмотрены при выборе стратегического направления в лечении конкретного больного (индивидуализируемая терапия).

Тестирование генетических маркеров стало более распространенной процедурой. Для пациентов с НМРЛ в 2015, наиболее часто тестировали мутации EGFR и ALK. Чаше тесты на EGFR проводят в Европе (80 % в Германии и 98 % во Франции). Для сравнения, в США 74 %, в Японии 90 %. В Китае самый низкий процент тестирования – 56 %.

Среди маркеров, обнаруженных не так давно, тестирование проводится на KRAS, ROS1, MET и BRAF V600E.

Для пациентов с неплоскоклеточным раком в 2015 г. на первом месте по тестированию стоит KRAS – 34 %, затем ROS1 – 25 %, после MET и BRAF V600E – их доля составляет 14 % [3].

В настоящее время зарегистрирован ряд препаратов для таргетной терапии НМРЛ, доказавших свою эффективность: гефитиниб, цетуксимаб, бевацизумаб, эрлотиниб.

Большой интерес вызывает возможность использования антигенпрезентирующих ДК в составе противоопухолевых вакцин.

С 1996 г. ведутся клинические испытания дендритно-клеточных вакцин при раке различных локализаций.

Применения ДК-вакцин является перспективным методом лечения НМРЛ, поскольку демонстрирует высокие показатели эффективности при минимальных побочных эффектах.

1. Бычков М. Б. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком легкого / М. Б. Бычков, В. А. Горбунова. – М: Ассоциация онкологов России, 2014.
2. Кожанова И. Н. Таргетная терапия распространенных форм немелкоклеточного рака легких / И. Н. Кожанова, 2016.
3. Rosenberg S.A. Development of effective immunotherapy for the treatment of patients with cancer. J. Am. Coll. Surg., 2004
4. Cranmer L.D., Trevor K.T., Hersh E.M. Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer, 2011.

## **Изучение конформационных переходов человеческого сывороточного альбумина спектральными методами**

*Танковская С. А., Пастон С. В.*

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

*tasva-ara1@yandex.ru*

Сывороточный альбумин – один из главных белков крови, отвечающий за транспорт различных низкомолекулярных соединений и регулирующий коллоидно-осмотическое давление плазмы [1]. Будучи легкодоступным для выделения, повсеместно исследуется и используется как модельный. Изучение структуры сывороточного альбумина в различных условиях имеет большое значение для медицины.

В данной работе рассматриваются изменения УФ и флуоресцентных спектров сывороточного альбумина человека (САЧ) в растворах с различными значениями pH. Эти изменения сопоставимы с обратимыми переходами в различные изомерные формы, которые белок претерпевает по мере изменения pH [1].

Положение максимума УФ спектра САЧ соответствует поглощению ароматических аминокислот, преимущественно Trp и Tyr. В диапазоне значений pH 4–10 белок стабилен: положение максимума не изменяется. При переходе в щелочную область происходит заметное красное смещение спектра, в кислой среде наблюдается небольшой сдвиг спектра в коротковолновую область.

Флуоресценция САЧ в значительной мере определяется флуоресценцией единственного остатка Trp. Варьируя длину волны возбуждающего света, можно вызвать возбуждение только Trp, либо Trp и Tyr [1]. Изменения положения максимума и формы спектров испускания при отклонениях от нейтральных pH свидетельствуют об изменении ближнего окружения ароматических аминокислот в молекуле белка. Титрование САЧ показывает, что при  $pH > 10.0$  и  $pH < 3$  происходит, соответственно, депротонирование и протонирование боковых групп белка. Возрастающее электростатическое расталкивание одноименных

зарядов в цепи САЧ приводит к переходу глобула – расплавленная глобула [2].

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества».

1. T. Peters Jr. All about albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, Academic Press, 1995.
2. A.V. Finkelstein, O. B. Ptitsyn. Protein Physics. A Course of Lectures. 2002 Elsevier Ltd.

### **Изучение препарата на основе коротких интерферирующих РНК, инкапсулированных в гибридные микроносители для терапии гриппозной инфекции *in vivo***

*Тараскин А. С.<sup>1,2</sup>, Федорова В. А.<sup>1</sup>, Бродская А. В.<sup>1,2</sup>,  
Штро А. А.<sup>1</sup>, Муслимов А. Р.<sup>1,3</sup>, Тимин А. С.<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава РФ,  
Санкт-Петербург, Россия

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

<sup>3</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Томский политехнический университет, Томск, Россия

[taraskin\\_07@bk.ru](mailto:taraskin_07@bk.ru)

Вирусы гриппа считаются одними из наиболее распространенных и опасных возбудителей респираторной инфекции у человека, способных вызвать системные нарушения, в том числе с летальным исходом. Наличие специфических противогриппозных препаратов, направленных на подавление функций таких вирусных белков, как нейраминидаза (осельтамивир и занамивир) и ионный канал М2 (ремантадин и амантадин), не позволило элиминировать возбудитель или прекратить возникновение ежегодных эпидемий. Причиной этому служит регулярное появление новых резистентных штаммов из-за высокой мутационной активности вируса. Исследование механизмов такого биологического феномена как РНК интерференция открыло новые возможности для разработки специфических противовирусных соединений, чувствительных к широкому спектру штаммов [1]. На данный момент известен терапевтический эффект многих коротких интерферирующих РНК (siРНК) против вируса гриппа А *in vitro*, однако доставка таких препаратов *in vivo* имеет ряд ограничений [2].

Коллективом авторов была разработана и предложена система, основанная на гибридных микроносителях [3], содержащих коктейль из siРНК к консервативным областям трех вирусных генов, для ингибирования вируса гриппа А (ВГА) *in vitro*. Было показано успешное применение данной системы для нетоксичной и высокоэффективной доставки siРНК в клетки, и продемонстрировано универсальное и специфическое противовирусное действие отдельных siРНК на различные штаммы ВГА [4].

В данной работе получены характеристики распределения предложенного препарата с флуоресцентно меченной siРНК- Cy7 в гибридных микрокапсулах и проведены эксперименты по острой токсичности на животной модели лабораторных мышей BALB/c. Распределение метки на уровне макроорганизма проводилось путем оценки флуоресценции в IVIS Lumia II через сутки после введения интраназально – исследуемые препараты были обнаружены в респираторном эпителии дыхательных путей. Далее животные подвергались эвтаназии, производился забор и фиксация органов верхних дыхательных путей. По результатам гистологического анализа отмечается перинуклеарная локализация микроносителей, в клетках респираторного эпителия верхних дыхательных путей; явных признаков острой токсичности не выявлено.

Помимо этого, эксперимент по определению острой токсичности показал отсутствие смертности у лабораторных мышей вплоть до пятых суток с момента введения, для всех применяемых доз препарата (500 - 0,2 пикомоль на мышь). Однако гистологические исследования легких, выявили наличие воспаления, в случае максимальной дозировки.

Таким образом, исследуемое соединение может претендовать на роль нового перспективного препарата против вируса гриппа А. На данный момент осуществляется оценка противовирусной активности данного соединения.

1. Горшков А. Н., Петрова А. В., Васин А. В. РНК-интерференция и патогенез вируса гриппа А //Цитология. – 2017. – Т. 59. – №. 8.
2. Shim M.S., Kwon Y.J. Efficient and targeted delivery of siRNA *in vivo* //The FEBS journal. – 2010. – V. 277. – No. 23. – P. 4814-4827.
3. Timin A.S. et al. Hybrid inorganic-organic capsules for efficient intracellular delivery of novel siRNAs against influenza A (H1N1) virus infection //Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – No. 1. – P. 102.
4. Aleksandra V. Brodskaja, Alexander S. Timin, Andrey N. Gorshkov, Albert R. Muslimov, Andrei B. Bondarenko, Yana V. Tarakanchikova, Yana A. Zabrodsкая, Irina L. Baranovskaya, Eugenia V. Il'inskaja, Gleb B. Sukhorukov, Andrey V. Vasin. Inhibition of Influenza A virus by mixed siRNAs, targeting the PA, NP, and NS genes, delivered by hybrid microcarriers. (Unpublished.)

# Влияние производных фуллерена C<sub>60</sub> разной структуры на митохондриальную активность дрожжей *Yarrowia lipolytica*

Тарасова Г. Р.<sup>1</sup>, Фазлеева Г. М.<sup>2</sup>,  
Губская В. П.<sup>2</sup>, Черепнев Г. В.<sup>1</sup>, Калачева Н. В.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова, Казань, Россия

[7gulzada7@mail.ru](mailto:7gulzada7@mail.ru)

Многочисленные публикации, посвященные фуллерену и его производным, свидетельствуют о пристальном интересе ученых к этим уникальным соединениям.

Объектами настоящего исследования являются производные фуллерена C<sub>60</sub>, отличающиеся друг от друга структурой и растворимостью: бис-нитроксидный метанофуллерен C<sub>61</sub>[COOC<sub>5</sub>H<sub>5</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NO]<sub>2</sub> растворяется в твине-80 (20 мг/мл, pH 7,0–7,2); 3-фосфо-пентафуллереновая кислота C<sub>62</sub>[PO(OH)PO(OH)<sub>2</sub>PO(OH)<sub>2</sub>] – в трис-буфере с pH 9,0; метанофуллеренол C<sub>60</sub>[C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>((OH)<sub>4</sub>)<sub>6</sub> и его гомолог C<sub>60</sub>[C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>((OH)<sub>4</sub>)<sub>6</sub> – в 0,9%-ном растворе NaCl с широким диапазоном pH (от 4 до 9).

Методом лазерной проточной цитометрии изучено влияние этих производных на трансмембранный потенциал митохондрий (Ψ<sub>m</sub>) дрожжей *Y. lipolytica*. Клетки *Y. lipolytica* являются строгими аэробами и имеют сходную с млекопитающими структуру митохондриального комплекса I. В связи с этим они представляют собой корректную модель для изучения влияния различных соединений на биоэнергетический статус клетки. Трансмембранный митохондриальный потенциал (Ψ<sub>m</sub>) измеряли с помощью витального ратиометрического катионного флуорохрома JC-1.

Установлено, что бис-нитроксидное производное метанофуллерена и 3-фосфо-пентафуллереновая кислота проявляют цитопротекторный эффект по отношению к клеткам дрожжей, находящихся в стрессовых условиях. Оба соединения тормозят падение трансмембранного митохондриального потенциала и увеличивают долю клеток с высоким Ψ<sub>m</sub> в 6 раз и в 1,5 раза соответственно. Полученные результаты обосновывают дальнейшее изучение этих производных как митохондриальных цитопротекторов.

У метанофуллеренолов C<sub>60</sub>[C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>((OH)<sub>4</sub>)<sub>6</sub> и C<sub>60</sub>[C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>((OH)<sub>4</sub>)<sub>6</sub> выявлено новое свойство – способность снижать Ψ<sub>m</sub> и долю клеток с высоким Ψ<sub>m</sub> по сравнению с контролем. При этом основные морфологические показатели клеток (размер, гранулярность) сохраняются. Обнаруженное свойство характеризует эти соединения как митохондриально-адресованные антиоксиданты и стимулирует исследования в этом направлении.

## **Влияние фармакологического ингибирования аутофагии на чувствительность клеток рака легкого к цисплатину**

*Топчу Ю. А., Мазитова А. М., Габбасов Р. Т., Абрамова З. И.*

*Институт фундаментальной биологии и медицины,  
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

[topchu\\_1993@mail.ru](mailto:topchu_1993@mail.ru)

Аутофагия и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) одни из основных биологических процессов при канцерогенезе [1]. Аутофагия – катаболический процесс, в ходе которого поврежденные компоненты клетки удаляются, помогая преодолевать внутриклеточный и внеклеточный стресс, включая лишение питательных веществ, гипоксию и эффект лечения лекарствами [2]. ЭМП представляет собой сложную трансдифференцировку, через которую опухолевые клетки приобретают мезенхимальные особенности, включая подвижность и метастатический потенциал [3].

Цель данной работы – исследование роли аутофагии в ответе клеток немелкоклеточного рака легкого на лечение цисплатином и влияние данного процесса на приобретение клетками мезенхимального фенотипа.

В ходе исследования было показано, что при лечении цисплатином в течении 24, 48 и 72 часов клетки аденокарциномы легкого A549 отвечают повышением уровня аутофагии (повышение уровня белков LC3B и p62). Этот эффект сопровождается блокированием апоптоза (снижение уровня активированной каспазы-3). Также при индукции аутофагии наблюдалась снижение уровня маркера эпителиального фенотипа клеток – E-кадгерина. Фармакологическое ингибирование аутофагии с помощью 3-метиладенина в концентрации 5 мМ приводило к повышению доли апоптотических клеток и повышению уровня E-кадгерина.

Показано, что индукция аутофагии под действием цисплатина способствовала миграции клеток (тест «лечение раны»). Фармакологическое ингибирование аутофагии подавляло усиленную миграцию клеток.

На основании приведенных данных можно предположить, что при лечении цисплатином клетки перестраиваются в сторону мезенхимального фенотипа, что, возможно, регулируется аутофагией.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00495».

1. Gugnoni M., Sancisi V., Manzotti G. et al., Cell Death Dis. 7(12): e2520 (2016).
2. Kalluri R, Weinberg RA. J Clin Invest 119: 1420–1428 (2009).
3. Boya P., Reggiori F., Codogno P. Nat Cell Biol. 15: 713–720 (2013).

## Изменение вторичной структуры молекулы ДНК при взаимодействии с дихлородиамминплатиной(II)

Травкина В. И.<sup>1</sup>, Тымченко Е. Е.<sup>1</sup>,  
Солдатова А. А.<sup>1</sup>, Чихиржина Е. В.<sup>2</sup>, Поляничко А. М.<sup>1</sup>

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

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

[travkinaveronika@gmail.com](mailto:travkinaveronika@gmail.com)

В настоящее время, лечение злокачественных образований является актуальной задачей. В медицинской практике применяется ряд противоопухолевых препаратов на основе координационных соединений платины. Дихлородиамминплатина(II), ДДП, является первым открытым препаратом данного класса [1]. *Цис*-изомер ДДП способен образовать аддукты на двойной спирали ДНК, что препятствует ее функционированию в живой клетке [2]. ДДП изучается на протяжении нескольких десятилетий и несмотря на обилие экспериментальных данных, накопленных к настоящему моменту, молекулярные механизмы действия *цис*-ДДП остаются не до конца изученными.

В данной работе мы изучали изменения вторичной структуры молекулы ДНК при взаимодействии с *цис*- и *транс*-ДДП методами инфракрасной (ИК) спектроскопии и тепловой денатурации. При помощи ИК-спектроскопии был произведен сравнительный анализ влияния изомеров ДДП на вторичную структуру ДНК. Обработка ИК спектров поглощения в области оснований ДНК производилась с использованием анализа второй производной [3]. Было показано, что полосы поглощения, соответствующие колебаниям групп в составе азотистых оснований, чувствительны к платинированию ДНК. В работе обсуждается влияние *цис*-ДДП и *транс*-ДДП на стабильность молекулы ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №15-08-06876 и №18-08-01500). Часть работ была выполнена на оборудовании Научного парка СПбГУ: «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники», «Криогенный отдел», «Оптические и лазерные методы исследования веществ» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

1. Jamieson E., Lippard S., Chem. Rev. 2467, 99 (1999).
2. Wang D., Lippard S.J., Nat. Rev. Drug Discov. 307, 4 (2005).
3. Тымченко Е.Е., Поляничко А.М., Вестник СПбГУ. 153, 62 (2017).

## Взаимодействие координационных соединений платины с сывороточными альбуминами

*Тымченко Е. Е., Травкина В. И., Поляничко А. М.*

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

*[e.tymchenko@yandex.ru](mailto:e.tymchenko@yandex.ru)*

В данной работе изучали влияние изомеров дихлородиамминплатины(II) (цис- и транс-ДДП) на вторичную структуру бычьего сывороточного альбумина (БСА) методом ИК-Фурье-спектроскопии. Для анализа спектральных данных производилась декомпозиция спектра в области Амид I ( $1700\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ ) методом анализа второй производной.

Цис-ДДП (цисплатин) известен своей высокой противоопухолевой активностью. При этом, при попадании в кровоток, цисплатин взаимодействует с белками крови. Транс-изомер ДДП не проявил биологической активности, но также способен вступить во взаимодействие с белками. [1]

Бычий сывороточный альбумин – хорошо изученный белок, широко применяемый в качестве модельного объекта. БСА представляет собой глобулярный белок, состоящий преимущественно из  $\alpha$ -спиральных участков ( $\sim 50\%$ ). [2]

На основе анализа ИК спектров растворов белка нами были установлены количественные изменения параметров вторичной структуры БСА при взаимодействии с ДДП ( $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур). Определено влияние способа изотопного замещения на вторичную структуру белка в комплексе. Было установлено, что при замене растворителя  $\text{H}_2\text{O}$  на  $\text{D}_2\text{O}$  методом спин-фильтрации уменьшается доля  $\alpha$ -спиральных участков и одновременно увеличивается доля  $\beta$ -структур. В то же время, при проведении замещения путем лиофилизации наблюдается увеличение степени  $\alpha$ -спиральности белка в комплексе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-08-06876, № 18-08-01500). Часть исследований проведены в ресурсных центрах Научного Парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники».

1. E. Wong and C.M. Giandomenico, "Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs," *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 9, pp. 2451–2466, 1999.
2. K.A. Majorek *et al.*, "Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins," *Mol. Immunol.*, vol. 52, no. 3–4, pp. 174–182, 2012.

## Тест модели *in vitro* для доклинических исследований лекарственных средств – опыт внедрения стандарта GLP

Хотин М. Г., Александрова О. И.,  
Хорольская Ю. И., Блинова М. И., Михайлова Н. А.

Центр клеточных технологий Института цитологии РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

Использование *in vitro* тест моделей при проведении доклинических исследований становится все более актуальным. Предпосылками для этого являются расширение арсенала методов и приборных возможностей для анализа физиологического состояния клетки в культуре; ужесточение этических норм использования лабораторных животных; необходимость параллельного тестирования больших массивов потенциальных лекарственных препаратов.

Правила проведения доклинических исследований требуют применения норм GLP (good laboratory practice). Они направлены на стандартизацию всех элементов деятельности лаборатории, и призваны обеспечить достоверность и воспроизводимость результатов.

На базе Центра клеточных технологий (ЦКТ) Института цитологии РАН успешно проводятся доклинические исследования лекарственных препаратов и на тест-моделях культур клеток и тканей с соблюдением стандарта GLP. Накоплен существенный опыт по исследованию действия изделий и препаратов на клетки тканей глаза (лимб, роговица), эндотелиальную, сердечно-сосудистую системы, костную ткань, кожу. Разработаны тест модели различных патологических состояний тканей – эндотелиальной дисфункции, гипоксии.

В работе используются современные системы и методы, позволяющие получать динамические характеристики таких процессов как пролиферация, миграция, энергетический метаболизм. Примером успешности применения тест моделей *in vitro* служит цикл работ по исследованию широкого спектра глазных капель, в результате которого выявлены те, которые обладают цитотоксическим эффектом и не должны применяться. Другой препарат – эндотелиопротектор показал положительное влияние на течение основных физиологических процессов у эндотелиоцитов в культуре.

Развивающийся арсенал методов анализа клеток в культуре и создание новых тест систем на основе биочипов и iPS клеток позволяет предполагать возрастание востребованности таких работ в ближайшие годы.

Разработка тест-моделей *in vitro* ведется при поддержке гранта РНФ 14-50-00068.

## **Оценка биосовместимости синтетических полимерных скаффолдов для реконструкции роговицы в условиях *in vitro* с использованием клеточных тест-систем**

*Хорольская Ю. И.<sup>1</sup>, Александрова О. И.<sup>1</sup>,  
Нащекина Ю. А.<sup>1</sup>, Карпович В. В.<sup>2</sup>, Блинова М. И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup> *Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия*

*[juliya\\_khorolskaya@mail.ru](mailto:juliya_khorolskaya@mail.ru)*

Лечение заболеваний и повреждений глаза, при которых имеется выраженная несостоятельность процессов регенерации, приводящая в исходе к значительному снижению остроты зрения и слепоте, является актуальной проблемой современной медицины. При различных патологиях переднего отрезка глазного яблока часто развивается синдром лимбальной недостаточности, возникающий в результате дисфункции, повреждения или гибели лимбальных стволовых клеток (ЛСК) роговицы. ЛСК – мультипотентные стволовые клетки, которые обеспечивают обновление эпителия роговицы. Не всегда удается добиться восстановления поврежденных тканей при помощи традиционных методов, поэтому встает вопрос о разработке клеточных продуктов, способных компенсировать потерю функциональности ЛСК.

Важным этапом при разработке клеточных продуктов является выбор адекватной матрицы. В настоящее время ведутся разработки скаффолдов на основе различных природных и синтетических материалов. Синтетические скаффолды получают из искусственных материалов, что позволяет исключить риск передачи трансмиссивных заболеваний и избежать проблемы недостатка донорского материала.

Целью настоящего исследования была оценка взаимодействия клеточных культур тканей глаза и синтетических полимерных скаффолдов поликапролактона, полилактид-ко-гликолида и полилактида-ко-капролактона. Данные матрицы механически устойчивы, прозрачны, способны к биodeградации, что позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для создания клеточного продукта для восстановления поврежденной роговицы глаза. Можно ожидать, что использование лимбальных клеток в комплексе с синтетическими полимерными скаффолдами, откроет новые возможности в области регенеративной медицины, в том числе в офтальмологии для регенерации глазной поверхности.

## **Исследование влияния бромистого этидия на динамику фотобиологических реакций**

*Хохлова А. В., Столяров Д. А., Ворсина С. Н., Толочманова О. В.*

*Научно-исследовательский технологический институт им. С. П. Капицы,  
Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия*

[avhohlova@gmail.com](mailto:avhohlova@gmail.com)

В настоящее время широко исследуется и находит биомедицинское применение низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ). Предполагается, что его главным акцептором на длинах волн 1260–1270 нм являются митохондрии [1, 2]. Однако механизмы возникновения фотобиологических реакций, характерных для данного диапазона, не до конца ясны.

Для выявления роли митохондриальной ДНК (мтДНК) в ответе клетки на воздействие НИЛИ был использован бромистый этидий, обладающий способностью снижать количество копий мтДНК в делящихся клетках [3, 4].

Культура НСТ116 (АССТ® CCL-247™) содержалась в течение трех недель с добавлением 250 нг/мл бромистого этидия (SigmaAldrich). Далее определялась степень деградации мтДНК и уровень кардиолипина. Часть клеток облучалась непрерывным полупроводниковым лазером (YenistaOptics, OSICS) с длиной волны 1265 нм, при мощности 4,2 мВт в течение 30 минут. Через 30 минут и 3 часа определялась внутриклеточная концентрация активных форм кислорода (АФК) и митохондриальный потенциал.

В присутствии бромистого этидия произошла полная деградация мтДНК, и наблюдался пятикратный рост уровня кардиолипина, что можно объяснить наличием компенсаторных механизмов в ответ на присутствие в среде мутагена.

Через 30 минут после облучения увеличивалась внутриклеточная концентрация АФК в опытных группах. Через 3 часа после облучения уровень АФК снижался до контрольных значений, а при дополнительном воздействии бромистого этидия оставался достоверно высоким.

Непосредственно после облучения наблюдалось снижение митохондриального потенциала. Однако в группе с совместным воздействием лазера и бромистого этидия такого не наблюдалось. При наличии в среде бромистого этидия повышался митохондриальный потенциал по сравнению с необработанным контролем.

Таким образом, бромистый этидий, подавляя синтез мтДНК, приводит к изменению клеточного ответа на воздействие НИЛИ с длиной волны 1265 нм, что проявляется повышением уровня и более длительным воздействием на клетку окислительного стресса.

1. Giuliani A., L. Lorenzini, M. Gallamini, A. Massella, L. Giardino, and L. Calzà (2009) Low infra-red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. *BMC Complement Altern. Med.* 9(1), 8.
2. Karu T.I., L.V. Pyatibrat, S.F. Kolyakov, and N.I. Afanasyeva (2005) Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B* 81, 98–106.
3. Man Yu, Yurong Shi, Xiyin Wei, Yi Yang, Yunli Zhou, Xishan Hao, Ning Zhang, Ruifang Niu (2007) Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells. *Toxicology Letters* 170, 83–93.
4. Meyer R.R., Simpson M.V. (1969) DNA biosynthesis in mitochondria. Differential inhibition of mitochondrial and nuclear DNA polymerases by the mutagenic dyes ethidium bromide and acriflavin. *Biochem Biophys Res Commun.* 34(2), 238–44.

### **Доля полноразмерных транскриптов гена *SMN2* как потенциальный биомаркер спинальной мышечной атрофии**

Цыганова Н. А.<sup>1</sup>, Маретина М. А.<sup>1,2</sup>, Егорова А. А.<sup>2</sup>, Киселев А. В.<sup>2</sup>

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

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

nadya-ts@mail.ru

Спинальная мышечная атрофия (СМА) – аутосомно-рецессивное нейродегенеративное заболевание, возникающее при мутациях в гене *SMN1*. Его центромерная копия – ген *SMN2*, отличается пятью нуклеотидами. Ген *SMN1* экспрессирует полноразмерный транскрипт (*FL-SMN*), с которого считывается функциональный белок SMN. Ген *SMN2* в основном производит усеченный транскрипт (*del7-SMN*) из-за нарушения сплайсинга в результате однонуклеотидной замены в 7 экзоне. Ведется поиск надежных биомаркеров для терапии СМА, показатели которых различаются у пациентов, носителей СМА и здоровых индивидов. Ген *SMN2* есть у всех пациентов со СМА и количество его копий коррелирует с тяжестью СМА, что делает его мишенью для терапии. Изменение уровня *FL-SMN* и *del7-SMN* от характерных для пациентов со СМА до уровня носителей СМА или здоровых индивидов будет указывать на эффективность терапии.

Количество транскриптов SMN было определено у 20 здоровых индивидов, 35 носителей и 32 пациентов со СМА с помощью разработанной нами методики, основанной на анализе программой Image J интенсивности свечения ампликонов на геле в после полуколичественной ОТ-ПЦР. Полученные данные были верифицированы КФ-ОТ-ПЦР.

Средние значения доли *FL-SMN* значительно различались: 0,61 у здоровых индивидов, 0,29 у носителей и 0,17 у пациентов со СМА.

Поскольку у носителей СМА нет симптомов, можно предположить, что для успешной терапии достаточно увеличение количества *FL-SMN* до уровня носителей СМА. Расчет доли *FL-SMN* и соотношения *FL-SMN/del7-SMN* выявил корреляцию у пациентов с 3 и 4 копиями между числом копий гена *SMN2* и уровнем транскриптов *SMN*.

Далее с помощью антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) была проведена коррекция сплайсинга гена *SMN2* в первичных культурах фибробластов пациентов со СМА. После доставки АСО наблюдалось значимое увеличение доли *FL-SMN* по сравнению с контролем.

Таким образом, доля *FL-SMN* рассматривается как биомаркер СМА, позволяющий быстро оценить эффективность коррекции сплайсинга гена *SMN2* при терапии.

### **Высокостабильная эукариотическая фуозидаза FFpI, клонированная из *Fusarium proliferatum* LE1**

Чеблоков А. А.<sup>1,2</sup>, Кульминская А. А.<sup>1,2</sup>, Бобров К. С.<sup>1</sup>

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

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

[haro39@yandex.ru](mailto:haro39@yandex.ru)

L-фукоза и L-фукозсодержащие конъюгаты вносят важный вклад в протекание различных физиологических и патологических процессов, чем и привлекают интерес исследователей. Противоопухолевые и противовоспалительные эффекты L-фукозы имеют потенциальное применение в медицине и фармакологии [1]. Получение L-фукозы ферментативным методом является перспективной альтернативой современным трудоемким и дорогостоящим методам химического синтеза данного сахара [2]. Одним из двух типов ферментов, преобразующих фукоз-содержащие конъюгаты, являются фукозидазы [3].

$\alpha$ -L-фукозидазы (КФ 3.1.2.51) – гликозидгидролазы, катализирующие реакции гидролиза фукозидных связей с образованием молекул L-фукозы. Ранее сотрудниками лаборатории энзимологии был выделен и идентифицирован мицелиальный гриб *Fusarium proliferatum* LE1 [4], у которого были обнаружены две фукозидазы. Одна из них была детально охарактеризована [5].

Целью данной работы являлась физико-химическая характеристика минорной  $\alpha$ -L-фукозидазы из *F. proliferatum* LE1. Была создана система экспрессии  $\alpha$ -L-фукозидазы в дрожжах *Pichia pastoris*. В ходе работы была разработана схема выделения и очистки фермента. Для реакции гидролиза модельного субстрата *n*-нитрофенил-альфа-L-фукозида (*n*-НФФ), катализируемой ферментом, определили оптимальные значения pH и температуры (5.0 и 50°C соответственно). Кинетические параметры реакции составили  $K_m = 3,61 \pm 0,6$  мМ и  $k_{cat} = 1,41$  с<sup>-1</sup>.

Анализ реакционной смеси, полученной после реакции гидролиза при высоких концентрациях *n*-НФФ, методом тонкослойной хроматографии показал наличие продуктов реакции, соответствующих дифукозиду, модифицированному хромофорной группой *para*-нитрофенол, что свидетельствует о способности рекомбинантной  $\alpha$ -L-фукозидазы катализировать реакцию трансгликозилирования.

Результаты работы послужат основой для дальнейших исследований фермента и его практической реализации в биотехнологии. Работа выполняется при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект No 16-14-00109).

1. Самченко А., Кондратьев М. С., Черенков Д. А., Корнеева О. С., 2012. Сравнительный анализ альфа-фукозидаз с применением методов биоинформатики. Актуальная Биотехнология 29–32.
2. Vanhooren P.T., Vandamme E.J. l-Fucose, occurrence, physiological role, chemical, enzymatic, and microbial synthesis. J. Chem. Technol. Biotechnol. 74 (1999).
3. Ma B., Simala-Grant J.L., Taylor D.E. Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. Glycobiology. 16 (2006).
4. Shvetsova S.V., Zhurishkina E.V., Bobrov K.S., Ronzhina N.L., Lapina I.M., Ivanen D.R., Gagkaeva T.Y., Kulminskaya A.A., 2015. The novel strain *Fusarium proliferatum* LE1 (RCAM02409) produces  $\alpha$ -L-fucosidase and arylsulfatase during the growth on fucoidan: Alfa-L-fucosidase and arylsulfatase from the novel strain *Fusarium proliferatum*. Journal of Basic Microbiology 55, 471–479.
5. Shvetsova S.V., Shabalin K.A., Bobrov K.S., Ivanen D.R., Ustyuzhanina N.E., Krylov V.B., Nifantiev N.E., Naryzhny S.N., Zgoda V.G., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., 2017. Characterization of a new  $\alpha$ -l-fucosidase isolated from *Fusarium proliferatum* LE1 that is regioselective to  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4)-l-fucosidic linkage in the hydrolysis of  $\alpha$ -l-fucobiosides. Biochimie 132, 54–65.

## **Количественное определение внутриклеточного содержания дезоксирибонуклеозид трифосфатов**

Червякова Д. Б.<sup>1</sup>, Кожина Т. Н.<sup>2</sup>, Вербенко В. Н.<sup>2</sup>, Королев В. Г.<sup>2</sup>

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

*Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова*

*НИИ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

Точность таких фундаментальных процессов, как репарация и репликация, напрямую зависит от внутриклеточного баланса концентраций дезоксирибонуклеозид трифосфатов (дНТФ). Результатом нарушений физиологических соотношений концентраций дНТФ внутри клетки является мутагенез, который, в свою очередь, индуцирует развитие серьезных патологий в функционировании отдельных клеток и систем на уровне организма в целом. Например, известно, что экстремально высокая скорость эволюционирования вируса иммунодефицита человека сопряжена с дисбалансом дНТФ. В связи с этим, одной из парадигм в разработках антиретровирусных препаратов является восстановление баланса внутриклеточных количеств дНТФ.

Возможность точного определения минутных количеств каждого из дНТФ, присутствующих в данный момент в клетке, позволит установить фундаментальные биологические механизмы, приводящие к изменению уровней дНТФ в клетках и возникающей вследствие этого геномной нестабильности, а также к объяснению механизмов действия многих лекарств; будет иметь практическое применение для диагностики патологических состояний, вызывающих дисбаланс дНТФ.

Существует два основных направления в способах измерения внутриклеточных количеств дНТФ. Одна группа подходов основана на разделении и подсчете дНТФ с помощью различных типов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ионообменная, обратнофазная и т. п.). Другая группа методов базируется на анализе ферментативного включения лимитирующего анализируемого дНТФ в новосинтезируемую цепь ДНК с радиоактивной или флуоресцентной детекцией. Оптимизированный нами высокочувствительный метод детекции дНТФ относится ко второй группе подходов и основывается на ферментативном включении лимитирующих количеств анализируемого дНТФ в растущую цепь ДНК с флуоресцентной детекцией. Включение лимитирующего дНТФ в новосинтезируемую цепь ДНК сопровождается 5' – 3' экзонуклеазной активностью ДНК-полимеразы, гидролизующей флуоресцентно меченый зонд, у которого в отсутствие полимеразной активности флуоресценция погашена. Детекция кинетик флуоресценции осуществляется с помощью прибора для ПЦР в реальном времени. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству включаемых в синтезируемую цепь ДНК лимитирующих количеств дНТФ.

Представленная методика позволяет детектировать количества дНТФ в диапазоне от 0,5 до 100 пмоль.

## **Панель сенсорных линий на основе широко нейтрализующего антитела 10E8**

*Черникова Д. С.<sup>1,2</sup>, Горчаков А. А.<sup>1,2</sup>, Кулемзин С. В.<sup>2</sup>,  
Баранов К. О.<sup>2</sup>, Волкова О. Ю.<sup>2</sup>, Таранин А. В.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

[chern\\_ds@mcb.nsc.ru](mailto:chern_ds@mcb.nsc.ru)

Создание иммуногена, способного индуцировать аффинное созревание широко нейтрализующих антител (bnAb), является одним из самых перспективных направлений в разработке вакцины против ВИЧ-1 [1]. Для поиска иммуногенов и оценки эффективности активации ими В-клеток, несущих на своей поверхности bnAb, необходимо создание тест-системы. Такой моделью может служить клеточная линия-сенсор с поверхностной экспрессией bnAb в виде В-клеточных рецепторов. В связи с тем, что широко нейтрализующее антитела характеризуются высоким уровнем соматического гипермутагенеза в ходе аффинного созревания, мы работаем над созданием целой серии сенсорных линий, имитирующих начальные стадии созревания bnAb, что позволит проводить тестирование иммуногенов, направляющих развитие В-клеточного ответа в сторону зрелой формы bnAb.

Целью данной работы являлось создание трех функциональных стабильных сенсорных линии с поверхностной экспрессией gl10E8 – зародышевой версии антитела 10E8 и двух промежуточных вариантов – i<sub>1</sub>10E8 и i<sub>2</sub>10E8. Выбор данного антитела обусловлен тем, что оно характеризуется высоким нейтрализующим потенциалом, достигающим 97–99 %, что является одним из лучших показателей среди всех bnAb.

В ходе данной работы путем молекулярного клонирования были созданы лентивирусные конструкции, кодирующие сенсоры на основе gl10E8, i<sub>1</sub>10E8 и i<sub>2</sub>10E8. Для трансдукции в качестве целевой клеточной линии мы использовали линию В-клеточной лимфомы человека DG-75. Функциональность полученной серии клеточных линий-сенсоров была проверена методом Ca-flux. Данная сенсорная платформа используется для тестирования невирусных иммуногенов, направленных против зародышевой формы и ранних форм созревания антитела 10E8.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 16-04-00915).

1. Haynes B. F., Kelsoe G., Harrison S. C., Kepler T. B. B-cell-lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study. *Nat Biotechnol*, v. 30, no. 5, pp. 423–433. (2012).

**Молекулярное моделирование и эксперимент:  
от низкомолекулярных химических соединений до биомакромолекул**

*Швецов А. В.<sup>1,2</sup>, Титов А. И.<sup>1</sup>, Кольцов М. А.<sup>1,3</sup>, Егоров В. В.<sup>1,4</sup>,  
Забродская Я. А.<sup>1,4</sup>, Лебедев Д. В.<sup>1</sup>, Коневега А. Л.<sup>1</sup>, Исаев-Иванов В. В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

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

<sup>3</sup> *Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия*

<sup>4</sup> *Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава РФ,  
Санкт-Петербург, Россия*

*[shvetsov\\_av@pnpi.nrcki.ru](mailto:shvetsov_av@pnpi.nrcki.ru)*

Развитие современных методов молекулярного моделирования, таких как метод молекулярной динамики (МД) позволяет создавать реалистичные модели поведения для различных молекулярных систем: как для различных низкомолекулярных химических соединений, так и для биомакромолекул и их комплексов массой до нескольких сотен килодальтон. При этом такие модели будут содержать как сведения о предполагаемой полноатомной структуре соответствующих молекулярных систем в растворе, так и информацию о конформационной подвижности макромолекулярных комплексов на временных периодах в десятки и сотни наносекунд. Сведения о поведении молекулярных систем, полученные из таких моделей, позволяют использовать для интерпретации или прямого сопоставления с результатами экспериментов, таких как различные модификации методов малоуглового нейтронного и рентгеновского рассеяния, лазерная корреляционная спектроскопия, FRET и другие физические методы.

## **Преимущественное возникновение и распространение аноксической деполяризации в четвертом слое бочонковой коры крыс**

*Юзекаева Э. Р., Гайнутдинов А. Р.,  
Насретдинов А. Р., Мухтаров М. Р.*

*Научно-исследовательская лаборатория «Нейробиология»,  
Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия*

[elvirajuzekaeva@gmail.com](mailto:elvirajuzekaeva@gmail.com)

Аноксическая деполяризация (АД) является отличительным признаком ишемического повреждения головного мозга. АД ассоциирована с распространяющейся волной деполяризации и увеличением пропускания света. Однако возникновение и распространение АД по слоям соматосенсорной коры остается в значительной степени неизвестным.

Эксперименты проводили *in vitro* на препаратах срезов бочонковой коры крыс обоих полов возраста P16 – P23. Обработка полученных данных осуществлялась в среде машинного анализа MATLAB (MathWorks, США) с помощью процедур, написанных в лаборатории. Возникновение и распространение АД оценивалось путем одновременной внеклеточной регистрации локального полевого потенциала (ЛПП) и внутреннего оптического сигнала в режиме пропускания света в 4-м слое бочонковой коры крыс. Ишемические условия имитировались путем замены в растворе искусственной цереброспинальной жидкости, омывающей срезы мозга, кислорода на азот и глюкозы на сахарозу (кислородно-глюкозная депривация, КГД). Было показано, что КГД вызывает АД в 4-м слое в виде большого отрицательного сдвига ЛПП ( $8.9 \pm 0.6$  мВ,  $n = 17$ ) и увеличения светопропускания ( $29.2 \pm 3.0$  %,  $n = 17$ ) через 6–13 мин ( $9.5 \pm 0.5$  мин,  $n = 17$ ) воздействия КГД. Впервые показано, что в соматосенсорной коре АД возникает в отдельном бочонке и затем распространяется преимущественно через 4-й слой. В условиях повышенного содержания внеклеточного калия (8.5 мМ) задержка начала АД составила  $5.9 \pm 0.4$  мин ( $n = 13$ ), что было почти в два раза быстрее, чем в нормальных условиях ( $9.5 \pm 0.5$  мин;  $n = 17$ ). Окрашивание живых срезов соматосенсорной коры головного мозга крысы 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом, маркером метаболической активности митохондриальной дегидрогеназы, продемонстрировало наибольшую интенсивность окрашивания в 4-м слое с отчетливым окрашиванием отдельных бочонков.

Полученные данные свидетельствуют о том, что 4-й слой бочонковой коры является областью, наиболее подверженной АД, что может быть связано с наибольшей метаболической активностью и плотностью клеток в этом слое.

## **Экспрессия Толл-подобных рецепторов в условиях экспериментального стресса**

*Янкевич И. А.<sup>1,2</sup>, Султанова Р. Ф.<sup>1</sup>, Курашкина Е. А.<sup>1</sup>, Алешина Г. М.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup> *Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия  
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

*[irina.yankelevich@pharminnotech.com](mailto:irina.yankelevich@pharminnotech.com)*

Согласно современным научным представлениям Толл-подобные рецепторы (TLR) играют критическую роль в раннем врожденном иммунном ответе на патоген-ассоциированные сигналы опасности [1]. TLR являются эволюционно консервативными рецепторами, распознающими структурные мотивы, известные как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), характерные для микробных патогенов. Также эти рецепторы могут распознавать эндогенные сигналы опасности (DAMP). Стимуляция TLR с помощью PAMP или DAMP инициирует сигнальные каскады, приводящие к продукции цитокинов, хемокинов, рекрутингу различных иммунных клеток и развитию воспаления [2].

Целью наших исследований являлось изучение экспрессии генов TLR в условиях действия на организм непатогенных стимулов. В качестве модели был выбран эмоционально-физический стресс. Ранее, на этой модели нами было показано, что в ответ на стрессирующее воздействие в спленоцитах экспериментальных животных инициировалось повышение экспрессии гена TLR-4 на сроке в 3 часа после аппликации стрессирующего воздействия [3].

В настоящем исследовании, в аналогичных условиях, нами была изучена экспрессия генов паттерн-распознающих рецепторов TLR-2 и TLR-3. Исследования показали достоверное понижение экспрессии генов TLR-2 и TLR-3 через 3 часа после аппликации стресса. Таким образом, полученные данные демонстрируют систематический ответ системы Толл-подобных рецепторов организма на стресс.

1. Janeway, Ch. Jr. A trip through my life with an immunological theme / Ch. Janeway // Annu. Rev. Immunol. – 2002. – No. 20. – P. 1–28.
2. Piccinini, A.M. DAMPening Inflammation byModulating TLR Signalling / A.M. Piccinini, K.S. Midwood // Mediators of Inflammation. – 2010. – Vol.2010. – P. 1–22.
3. Yankelevich I.A., Aleshina G.M., Kokryakov V.N. Increase of TLR4 gene expression as a response to stress condition // Abstracts: VI International symposium “Interaction of the nervous and immune systems in health and disease” June 20 – June 23, 2017, Saint-Petersburg. Russia.

### Алфавитный указатель

| Ф. И. О.            | стр.     |
|---------------------|----------|
| Dattan R.           | 78       |
| Golebiowski J.      | 5        |
| Waldeck J.          | 4        |
| Абрамова З. И.      | 179      |
| Агълямова А. Р.     | 155      |
| Александрова О. И.  | 182, 183 |
| Алексеева Е. А.     | 60       |
| Алемасова Е. Э.     | 65       |
| Алешина Г. М.       | 192      |
| Анарбаев Р. О.      | 65       |
| Аниол В. А.         | 7, 74    |
| Антифеев И. Е.      | 80       |
| Аравин А. А.        | 66       |
| Артамонова Т. О.    | 108      |
| Артёмов М. Н.       | 97       |
| Архипов В. И.       | 69       |
| Асцатуров И. А.     | 68       |
| Афонина Ж. А.       | 82       |
| Багров Д. В.        | 93       |
| Байдакова Г. В.     | 139      |
| Байдюк Е. В.        | 89       |
| Баймухаметов Т. Н.  | 82, 161  |
| Байтин Д. М.        | 78       |
| Балановский О. П.   | 9        |
| Баранов К. О.       | 189      |
| Баранова Е. Д.      | 83       |
| Баранова Е. И.      | 70       |
| Баранова Ю. В.      | 164      |
| Баранова Ю. Г.      | 84       |
| Барановская И. Л.   | 85       |
| Барлев Н. А.        | 12       |
| Бауд М.             | 171      |
| Бахмет Е. И.        | 86       |
| Безпрозванный И. Б. | 113      |
| Безрукова А. И.     | 139      |
| Белинская М. А.     | 114      |
| Белопольская Т. В.  | 165      |
| Белоусов М. В.      | 104, 166 |
| Беляева О. Д.       | 70       |

| Ф. И. О.          | стр.                 |
|-------------------|----------------------|
| Белякова Н. В.    | 160                  |
| Бережная Е. В.    | 106                  |
| Березина О. В.    | 119                  |
| Беркович О. А.    | 139                  |
| Бикмуллин А. Г.   | 87                   |
| Блинова М. И.     | 182, 183             |
| Бобков Д. Е.      | 89                   |
| Бобров К. С.      | 186                  |
| Большакова О. И.  | 73                   |
| Бондарев С. А.    | 104, 147, 166        |
| Бондаренко А. Б.  | 90                   |
| Бондарь Н. П.     | 145                  |
| Бородина Т. Н.    | 129                  |
| Бочаров Э. В.     | 14                   |
| Бровин Д. Л.      | 70                   |
| Бродская А. В.    | 80, 85, 90, 176      |
| Букреева Т. В.    | 129                  |
| Булатов Э. Р.     | 92, 171              |
| Буракова Е. А.    | 162                  |
| Вавилова Т. В.    | 111                  |
| Валидов Ш. З.     | 87                   |
| Валиуллина А. Х.  | 92                   |
| Василов Р. Г.     | 16                   |
| Васильев А. Л.    | 82, 129,<br>153, 161 |
| Васин А. В.       | 85, 90               |
| Везо О. С.        | 164                  |
| Вербенко В. Н.    | 188                  |
| Виноградова Д. С. | 149                  |
| Внукова А. А.     | 93                   |
| Волкова О. Ю.     | 189                  |
| Волокитина М. В.  | 124                  |
| Воронина Е. В.    | 94                   |
| Ворсина С. Н.     | 184                  |
| Габбасов Р. Т.    | 179                  |
| Гавриш К. В.      | 169                  |
| Гагарская Ю. А.   | 96                   |
| Гайковая Л. Б.    | 111                  |
| Гайнуллина А. Н.  | 97                   |

|                    |              |
|--------------------|--------------|
| Гайнутдинов А. Р.  | 191          |
| Галенко В. Л.      | 138          |
| Галиева А. А.      | 98           |
| Гатаулина Э. Д.    | 142          |
| Гладышева А. В.    | 100          |
| Глушанкова Л. Н.   | 136          |
| Гнедина О. О.      | 154          |
| Годованный А. В.   | 94           |
| Горбач Д. П.       | 102          |
| Горчаков А. А.     | 189          |
| Горшков А. Н.      | 90           |
| Гречишникова Е. Г. | 101          |
| Григорьев Т. Е.    | 153          |
| Грузинов А. Ю.     | 151          |
| Грунина М. Н.      | 61, 117      |
| Грунина Н. А.      | 165          |
| Губарев А. С.      | 173          |
| Губская В. П.      | 178          |
| Гусева М. А.       | 123          |
| Данилов Л. Г.      | 104, 147     |
| Демин В. А.        | 16           |
| Дербилов Д. Д.     | 105          |
| Дженлода Р. Х.     | 80           |
| Дзрелян В. А.      | 106          |
| Дмитриев И. Д.     | 107          |
| Дмитриева А. А.    | 123          |
| Дмитриева Р. И.    | 125, 138     |
| Дресвянина Е. Н.   | 173          |
| Дробышевский С. В. | 18           |
| Дружинин В. Г.     | 83           |
| Дьерке Ш.          | 89           |
| Дьяконов Е. Е.     | 108          |
| Дюдеева Е. С.      | 109          |
| Евлампиева Н. П.   | 173          |
| Евстюхина Т. А.    | 60           |
| Егоров В. В.       | 190          |
| Егорова А. А.      | 79, 85, 185  |
| Емельянов А. К.    | 143          |
| Ермаков А. И.      | 111          |
| Ершов Е. Е.        | 61, 114, 117 |
| Есюнина Д. М.      | 66           |
| Ефимова С. С.      | 122          |
| Ефремова Т. Н.     | 128          |

|                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| Жемков В. А.       | 113                  |
| Жмуйдина Д. Р.     | 168                  |
| Журавлев А. С.     | 114                  |
| Журавлева Г. А.    | 19, 104,<br>147, 166 |
| Забегина Л. М.     | 115                  |
| Заботина А. М.     | 61, 114, 117         |
| Забродская Я. А.   | 190                  |
| Завьялов А. В.     | 119                  |
| Зайцева А. К.      | 120                  |
| Зарайский А. Г.    | 141                  |
| Захарова А. А.     | 122                  |
| Захарова Е. Ю.     | 139                  |
| Земляная Е. В.     | 151                  |
| Змиевская Е. А.    | 92                   |
| Иванов А. С.       | 20                   |
| Иванов И. А.       | 23                   |
| Иванова А. А.      | 123                  |
| Иванова А. С.      | 141                  |
| Иванова Л. А.      | 124                  |
| Иванова О. А.      | 125, 138             |
| Иванова Ю. С.      | 127                  |
| Иваньков А. И.     | 107, 151             |
| Ивлев А. П.        | 128                  |
| Игнатъев Ю. В.     | 171                  |
| Иготти М. В.       | 154                  |
| Иллариошкин С. Н.  | 25                   |
| Индейкина М. И.    | 94                   |
| Иоффе А. И.        | 26                   |
| Исаев-Иванов В. В. | 78, 190              |
| Каганский А. М.    | 27                   |
| Казначеева Е. В.   | 136                  |
| Калачева Н. В.     | 178                  |
| Калинина А. А.     | 174                  |
| Камалтдинова Э. Р. | 69                   |
| Камышинский Р. А.  | 129, 153             |
| Карасёв М. М.      | 96                   |
| Карпенко М. Н.     | 158, 159             |
| Карпович В. В.     | 183                  |
| Карпушев А. В.     | 120                  |
| Карцева О. В.      | 171                  |
| Касацкий П. С.     | 149, 161             |
| Качкин Д. В.       | 130                  |

|                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| Ким М. В.            | 113                  |
| Киселев А. В.        | 79, 185              |
| Киселев М. А.        | 28, 107, 151         |
| Кищенко В. В.        | 131                  |
| Киямова Р. Г.        | 156, 169             |
| Клейст О. А.         | 160                  |
| Клишин А. А.         | 94                   |
| Клопов Н. В.         | 78                   |
| Клюев П. Н.          | 133                  |
| Князева М. С.        | 134                  |
| Ковальчук А. А.      | 115                  |
| Кожемякина Н. В.     | 30                   |
| Кожина Т. Н.         | 188                  |
| Колесников Д. О.     | 136                  |
| Колчина Н. В.        | 137                  |
| Кольцов М. А.        | 190                  |
| Комарова М. Ю.       | 125, 138             |
| Кондратов К. А.      | 131                  |
| Коневега А. Л.       | 78, 149,<br>161, 190 |
| Коновалова С. Н.     | 100                  |
| Кононихин А. С.      | 94                   |
| Кононов А. И.        | 84                   |
| Константинова Н. Н.  | 80                   |
| Копытова А. Э.       | 139                  |
| Корбан С. А.         | 113                  |
| Коржикова-Влах Е. Г. | 124                  |
| Коробкина Е. А.      | 134                  |
| Королев В. Г.        | 60, 188              |
| Короткова Д. Д.      | 141                  |
| Костарева А. А.      | 32, 120, 125         |
| Котелевцев Ю. В.     | 33                   |
| Красикова Р. Н.      | 35                   |
| Краснова Т. С.       | 62                   |
| Крупницкий Е. М.     | 61, 114, 117         |
| Кубасов И. В.        | 89                   |
| Кузнецова А. И.      | 62                   |
| Кузнецова И. М.      | 96, 166              |
| Кузьминкова А. А.    | 98                   |
| Кулемзин С. В.       | 189                  |
| Куликова В. А.       | 64                   |
| Кульбачинский А. В.  | 66                   |
| Кульминская А. А.    | 113, 124, 186        |

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Курашкина Е. А.   | 192      |
| Кургина Т. А.     | 65       |
| Курмашова Е. Д.   | 142      |
| Кутушенко В. П.   | 94       |
| Лаврик О. И.      | 65       |
| Лавринова А. О.   | 143      |
| Лавров К. В.      | 101      |
| Лашкул В. В.      | 130      |
| Лебедев Д. В.     | 78, 190  |
| Лебедев И. Н.     | 37       |
| Легина О. К.      | 160      |
| Лелявина Т. А.    | 138      |
| Лепешко А. А.     | 145      |
| Линькова Н. С.    | 137      |
| Лисевич И. М.     | 146      |
| Лисицкая Л. А.    | 66       |
| Литусова Е. М.    | 143      |
| Лихолетова Д. В.  | 147      |
| Локтев В. Б.      | 100      |
| Ломерт Е. В.      | 148      |
| Любецкий В. А.    | 141      |
| Люблинская О. Г.  | 127      |
| Мазитова А. М.    | 68, 179  |
| Майстренко В. А.  | 158      |
| Максимова Е. М.   | 149, 161 |
| Малашичева А. Б.  | 71, 120  |
| Малек А. В.       | 115, 134 |
| Маретина М. А.    | 185      |
| Мартынова Н. Ю.   | 141      |
| Марыгин Р. А.     | 94       |
| Маслова В. А.     | 151      |
| Массон П.         | 155      |
| Мелентьев П. А.   | 152, 168 |
| Микрюкова Т. П.   | 100      |
| Милюхина И. В.    | 143      |
| Минигулова Л. Ф.  | 156, 169 |
| Мирошникова В. В. | 70       |
| Миттенберг А. Г.  | 102      |
| Михайлова Н. А.   | 182      |
| Михеева И. Б.     | 69       |
| Михуткин А. А.    | 153      |
| Моршнева А. В.    | 154      |
| Муслимов А. Р.    | 176      |

|                      |              |
|----------------------|--------------|
| Мухаметгалиева А. Р. | 155          |
| Мухтаров М. Р.       | 191          |
| Мясников А. Г.       | 40, 161      |
| Назаров И. Б.        | 86           |
| Нарыжный С. Н.       | 160          |
| Насретдинов А. Р.    | 191          |
| Насырова Р. Ф.       | 61, 114, 117 |
| Науменко К. Н.       | 65           |
| Нащекина Ю. А.       | 183          |
| Негинская М. А.      | 106          |
| Нериновский К. Б.    | 64           |
| Нестеренко А. М.     | 141          |
| Никифоров А. А.      | 64           |
| Николаев М. А.       | 139, 143     |
| Николаева В. В.      | 94           |
| Новиков А. Д.        | 105          |
| Новицкая К. С.       | 148          |
| Нужина Ю. В.         | 130          |
| Нургалиева А. К.     | 156          |
| Обламская И. С.      | 158          |
| Орехов А. С.         | 129, 153     |
| Орехова А. С.        | 62           |
| Орлов Ю. Н.          | 42           |
| Орлова Н. В.         | 94           |
| Осинникова Д. Н.     | 84           |
| Остроумова О. С.     | 122          |
| Павлова А. С.        | 109          |
| Паевский А. С.       | 44           |
| Пантелеева А. А.     | 70           |
| Пантина Р. А.        | 160          |
| Панченко А. В.       | 64           |
| Пастон С. В.         | 175          |
| Перевозникова А. В.  | 136          |
| Пермяков С. Е.       | 94           |
| Першина Е. В.        | 69           |
| Пестерева Н. С.      | 159          |
| Петренко Е. С.       | 160          |
| Петров Д. Г.         | 80           |
| Петухов М. Г.        | 137          |
| Петушков И. В.       | 66           |
| Пешехонов В. Т.      | 60           |
| Пичкур Е. Б.         | 161          |
| Плотникова М. А.     | 90           |

|                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| Побожева И. А.     | 70                   |
| Поварова О. И.     | 96                   |
| Полесскова Е. В.   | 161                  |
| Поляничко А. М.    | 84, 164,<br>180, 181 |
| Полянская А. В.    | 89                   |
| Пономарева Е. П.   | 100                  |
| Пресняков М. Ю.    | 161                  |
| Протопопова Е. В.  | 100                  |
| Прохорова Д. В.    | 162                  |
| Пуговкина Н. А.    | 127                  |
| Пчелина М. М.      | 61, 117              |
| Пчелина С. Н.      | 70, 139, 143         |
| Разгильдина Н. Д.  | 70                   |
| Рамазанов Р. Р.    | 133, 163             |
| Ревегук З. В.      | 84                   |
| Решетников В. В.   | 145                  |
| Ризванов А. А.     | 92, 171              |
| Родина Н. П.       | 96, 166              |
| Романов Н. М.      | 84, 164              |
| Романова А. Ю.     | 165                  |
| Рошаль Д. С.       | 167                  |
| Рубель А. А.       | 130                  |
| Рубцов П. М.       | 62                   |
| Рудковский М. В.   | 106                  |
| Рыков С. В.        | 119                  |
| Рябова Е. В.       | 152, 168             |
| Рябушкина Ю. А.    | 145                  |
| Савенкова Д. В.    | 169                  |
| Сакута Г. А.       | 89                   |
| Саранцева С. В.    | 73, 152, 168         |
| Саярова Р. М.      | 171                  |
| Светлова М. П.     | 64                   |
| Селиверстов А. В.  | 141                  |
| Семенова А. А.     | 90                   |
| Семенова Д. С.     | 71                   |
| Семина С. Е.       | 93                   |
| Сергеева М. В.     | 85                   |
| Сергушичев А. А.   | 97                   |
| Сердюкова Е. С.    | 172                  |
| Серебрянский И. Г. | 68, 169              |
| Серегин Ю. А.      | 94                   |
| Сидоренко А. И.    | 72                   |

|                   |              |
|-------------------|--------------|
| Синолицкий М. К.  | 105          |
| Сироткина О. В.   | 111, 131     |
| Склярченко А. В.  | 72           |
| Скобелева Н. А.   | 68           |
| Скоморохова Е. А. | 158          |
| Скопин А. Ю.      | 136          |
| Скрипова В. С.    | 68, 156, 169 |
| Слободина А. Д.   | 73           |
| Слюсаренко М. А.  | 173          |
| Смирнова О. И.    | 165          |
| Сокол А. Д.       | 98           |
| Соколова Т. Н.    | 174          |
| Солдатова А. А.   | 180          |
| Соловьева Л. В.   | 64           |
| Сосин Д. Н.       | 61, 114, 117 |
| Сосина К. А.      | 117          |
| Сохраняева Л. С.  | 74           |
| Старкина О. В.    | 174          |
| Старунов В. В.    | 45           |
| Степанов А. В.    | 89           |
| Степанова Д. С.   | 75           |
| Стеценко Д. А.    | 162          |
| Столяров Д. А.    | 184          |
| Сулацкая А. И.    | 166          |
| Сулацкий М. И.    | 166          |
| Султанова Р. Ф.   | 192          |
| Сурина Н. В.      | 168          |
| Танковская С. А.  | 175          |
| Таранин А. В.     | 189          |
| Тараскин А. С.    | 176          |
| Тараскина А. Е.   | 61, 114, 117 |
| Тарасов О. В.     | 147          |
| Тарасова Г. Р.    | 178          |
| Тентлер Д. Г.     | 148          |
| Тенчурин Т. Х.    | 153          |
| Терёшина М. Б.    | 141          |
| Терновой В. А.    | 100          |
| Тимин А. С.       | 90, 176      |
| Титов А. И.       | 190          |
| Толочманова О. В. | 184          |
| Томилин А. Н.     | 86           |
| Топчу Ю. А.       | 179          |
| Травкина В. И.    | 180, 181     |

|                    |          |
|--------------------|----------|
| Трахтман Н. В.     | 87       |
| Трушина Д. Б.      | 129      |
| Туроверов К. К.    | 96, 166  |
| Тымченко Е. Е.     | 180, 181 |
| Тюльганова Д. А.   | 75       |
| Ульянова В. В.     | 146      |
| Фазлеева Г. М.     | 178      |
| Фаттахова А. Н.    | 155      |
| Федоров А. А.      | 80, 131  |
| Федорова В. А.     | 176      |
| Финкельштейн А. В. | 46       |
| Фокина А. А.       | 162      |
| Хавинсон В. Х.     | 137      |
| Хазак В. Э.        | 68       |
| Хайтлина С. Ю.     | 128      |
| Ходорковский М. А. | 64, 108  |
| Хорольская Ю. И.   | 182, 183 |
| Хотин М. Г.        | 182      |
| Хохлова А. В.      | 184      |
| Хромова Н. В.      | 125      |
| Худяков А. А.      | 120      |
| Хусаинов И. Ш.     | 87       |
| Церетели Т. И.     | 165      |
| Цимоха А. С.       | 108      |
| Цыганова Н. А.     | 185      |
| Чаусов Е. В.       | 100      |
| Чвалун С. Н.       | 49, 153  |
| Чеблоков А. А.     | 186      |
| Челобанов Б. П.    | 162      |
| Червякова Д. Б.    | 188      |
| Черемных Т. А.     | 78       |
| Черепнев Г. В.     | 178      |
| Черепушкин С. А.   | 94       |
| Черникова Д. С.    | 189      |
| Чернов Ю. О.       | 130      |
| Чесноков Ю. М.     | 82       |
| Чихиржина Е. В.    | 180      |
| Шабалин К. А.      | 64       |
| Шалыгин А. В.      | 136      |
| Швалов А. Н.       | 100      |
| Шварцман А. Л.     | 73       |
| Швецов А. В.       | 78, 190  |
| Швецова С. В.      | 124      |

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Шемякина А. О.    | 101      |
| Шимановский Н. Л. | 75       |
| Широков В. А.     | 82       |
| Штам Т. А.        | 115, 134 |
| Штро А. А.        | 176      |
| Штыкалова С. В.   | 79       |
| Щеголев Б. Ф.     | 133      |

|                 |          |
|-----------------|----------|
| Юзекаева Э. Р.  | 191      |
| Юсупов М. М.    | 87       |
| Якимов А. П.    | 64       |
| Яковлев А. В.   | 142      |
| Яненко А. С.    | 101, 105 |
| Янкелевич И. А. | 192      |
| Яроцкий С. В.   | 72, 119  |

**Для заметок**

[illegible]

**Для заметок**

This image shows a single page of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

**Для заметок**

[illegible]

**Для заметок**

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

**Для заметок**

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

**Для заметок**

[illegible]

**Для заметок**

[illegible]

**Для заметок**

[illegible]

**Для заметок**

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

Отпечатано с готового оригинал-макета  
в типографии НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ

188300, Гатчина Ленинградской обл., мкр. Орлова роща, д. 1  
Зак. 43, тир. 280, уч.-изд. л. 13; 05.02.2018 г.  
Формат 70 × 100 1/16, печать офсетная