

мое влияние БТШ70 на функциональное состояние различных форм протеасом остается неисследованным. Нами было показано, что активность различных форм протеасом меняется разнонаправлено после инкубации с рекомбинантным БТШ70. Так, химотрипсинподобная активность 20S протеасом значительно снижается (более чем на 52%), в то время как активность 26S протеасом возрастает на 125%. Нами также выявлено, что БТШ70 является субстратом 20S протеасом и может деградировать в них без предварительной модификации убиквитином. Это частично объясняет обнаруженное снижение активности 20S протеасом после инкубации с БТШ70. Полученные результаты раскрывают новые стороны взаимодействия БТШ70 и разных форм протеасом, а также указывают на потенциальное наличие дополнительного пути деградации БТШ70 в клетке. Работа выполнена при поддержке гранта Министерства Образования и Науки договор #14.Z50.31.0014 и гранта Президента РФ для молодых ученых МК-3613.2017.4.

БИСПЕЦИФИЧНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

С.Е. Седых, В.В. Принц, В.Н. Бунева, Г.А. Невинский *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Биспецифичными называют иммуноглобулины, содержащие два разных антигенсвязывающих центра и способные связывать два разных антигена. Особый интерес к молекулам биспецифичных иммуноглобулинов обусловлен их терапевтическим применением, в 2015 году журнал *Nat. Rev. Drug. Disc.* назвал биспецифичные иммуноглобулины – «антителами нового поколения» (*Next generation antibodies*). Исследования, опубликованные в последние годы, посвящены различным способам получения моноклональных биспецифичных иммуноглобулинов, доклиническим и клиническим испытаниям этих препаратов, а также возможным перспективам их использования. В молоке, плаценте и крови здоровых доноров мы обнаружили природные биспецифичные иммуноглобулины. Определено содержание биспецифичных молекул в данных биологических объектах, а также соотношение биспецифичных молекул к моноспецифичным. Литературные данные указывают на то, что одновременная экспрессия двух генов легких цепей в одном клоне В-лимфоцита возможна при хронической лимфоцитарной лейкемии, такие молекулы обнаружены в клетках миеломы S107, в клетках гибридом, в случае индуцированной плазматомы мыши. Ранее высказаны предположения, что эти случаи могут быть связаны с вторичной перестройкой генов иммуноглобулинов и с тем, что некоторые периферические популяции В-лимфоцитов избегают аллельного исключения. Обнаруженные нами природные биспецифичные молекулы, по-видимому, образуются в организме человека *in vivo* в результате обмена иммуноглобулинов НL-фрагментами (половинами молекул). Полученные данные указывают на то, что данный процесс в крови, молоке и плаценте человека происходит между IgG всех подклассов, а также на возможную роль обмена НL-фрагментами при беременности и лактации. Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-60066 мол_а_дк, 16-34-00163 мол_а, а также грантом Президента РФ МК МК-410.2017.4.

ТИОРЕДОКСИН И ГЛУТАРЕДОКСИН: РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева *Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

Опухолевый рост сопровождается дисрегуляцией пролиферации и апоптоза, что играет важную роль в патогенезе злокачественных новообразований молочной железы. Цель: оценить роль тио- и глутаредоксина в молекулярных механизмах регуляции пролиферации клеток линии MCF-7 при модуляции редокс-статуса блокатором SH-групп белков и пептидов N-этилмалеимидом (NEM, 5 мМ) и протектором тиоловых групп – 1,4-дитиозэритритолом (DTE, 5 мМ). Для исследований использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7. Содержание тио- и глутаредоксина определяли методом вестерн-блоттинга. Оценку распределения по фазам клеточного цикла и количество аннексин-положительных клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии. При действии NEM в клетках линии MCF-7 возрастало содержание тиоредоксина на 8% ($p < 0,05$) и глутаредоксина на 16% ($p < 0,01$) по сравнению с интактной культурой (1,86 (1,83-1,87) и 1,66 (1,61-1,68) у.е., соответственно), что отражало высокую потребность клеток в редокс-белках в условиях защиты макромолекул от окислительного стресса и для выживания опухолевых клеток при изменении редокс-статуса. Увеличение содержания тио- и глутаредоксина при действии NEM сопровождалось остановкой клеточного цикла в S фазе и повышением количества аннексин-положительных клеток линии MCF-7. При добавлении DTE – увеличивалось содержание тиоредоксина на 4% ($p < 0,05$) и глутаредоксина на 23% ($p < 0,01$) по сравнению с интактной культурой линии MCF-7. DTE способствовал остановке клеточного цикла в G0/G1 фазах, что может быть связано с высокой способностью глутаредоксина и глутатиона вступать в реакции глутатионилирования/деглутатионилирования белков, в том числе факторов транскрипции, сопровождающиеся изменениями их структуры и функциональных свойств, что влияет на синтез белков регуляторов пролиферации – циклинов и циклинзависимых киназ. Таким образом, снижение пролиферации клеток линии MCF-7 при действии редокс-модуляторов может быть связано с изменениями активности редокс-чувствительных белковых комплексов, регулирующих клеточный цикл, что позволяет рассматривать тио- и глутаредоксин как молекулярные мишени регуляции пролиферации опухолевых клеток. Исследование выполнено в рамках гранта Президента Российской Федерации № МК-1742.2017.7.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ КАК ИСТОЧНИК АНТИГЕННЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ АУТОРЕАКТИВНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Е.С. Шилов *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Аутореактивные Т-лимфоциты, узнающие эпитопы собственных белков организма, удаляются в процессе развития в тимусе в ходе отрицательной селекции. Для отрицательной селекции Т-клеток необходимо, чтобы протеом организма был представлен им наиболее полным образом, по этой причине эпителиальные клетки тимуса экспрессируют более 20 тысяч различных кодирующих белки генов. Однако некоторые эпитопы собственных белков организма могут не участвовать в процессе селекции Т-клеток по причине альтернативного сплайсинга мРНК. Гипотеза о том, что различия сплайсинга пре-мРНК между тимусом и органом нормальной экспрессии гена-мишени приводит к уходу эпитопа от отрицательной селекции и развитию аутоиммунного заболевания, у человека впервые была доказана в 2001 г. для диабета I типа. Настоящая работа посвящена проверке этой гипотезы на мышинной модели. В работе были использованы 45 мышинных ортологов генов с альтернативным сплайсингом из работы Ng et al., а также 297 генов мыши с различиями паттерна сплайсинга между эпителием

тимуса и другими эпителиальными клетками из работы Keane et al. Для всех 342 генов была выполнена верификация их экспрессии в ткани тимуса по материалам работы Sansom et al, а также на основе аннотированных профилей библиотек EST базы данных UniGene. Для соответствующих белков при помощи баз данных Uniprot и NCBI Protein было проанализировано число изоформ, возникающих в результате альтернативного сплайсинга. При помощи базы данных Immune Epitope Database для белков были получены профили их Т-клеточных антигенов. По результатам анализа был составлен список из 10 кандидатных генов, для которых был возможен альтернативный сплайсинг в тимусе и связанные с этим потенциальные Т-клеточные эпитопы. Были получены кДНК из тимуса, селезенки, головного мозга, печени, почек, легких и скелетных мышц мышей C57BL/6, которые использовали для сплайс-форм-специфической RT-ПЦР. 2 гена с низкой экспрессией: Add2 и Dst были технически исключены из анализа, 5 генов: Dcl1, Gbr2, Mag2, Mbp и Ubf показали сбалансированный паттерн сплайсинга в тимусе, для 3 генов: Golga7, Lmna и Nasr были подтверждены редкие для тимуса сплайсформы мРНК.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-04-01188.

Литература

1. Ng et al, J Allergy Clin Immunol, 2004.
2. Keane et al, Bioinformatics, 2015.
3. Sansom et al, Genome Res, 2014.

ИССЛЕДОВАНИЕ МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ, КОНТРОЛИРУЕМО ВОЗДЕЙСТВУЮЩИХ НА КЛЕТКИ ЭУКАРИОТ, ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ АГЕНТОВ ТЕРАНОСТИКИ

В.О. Шипунова^{1,2,3}, М.П. Никитин^{1,3,4}, П.И. Никитин⁴, С.М. Деев^{1,2} ¹Институт биорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; ³Московский физико-технический институт; ⁴Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

В настоящее время значительные усилия исследователей в области нанобиотехнологии нацелены на разработку агентов для терапистики. Привлекательной платформой для создания терапистических агентов являются наночастицы различной природы. Помимо собственных уникальных свойств, диагностические и терапевтические модальности наночастицы приобретают за счёт модификации поверхности различными биомолекулами, например лектинами (поскольку профиль гликозилирования раковых клеток может отличаться от такового у нормальных, лектины являются перспективными молекулами для адресной доставки соединений). Нами были синтезированы и модифицированы рядом лектинов золотые и магнитные наночастицы; специфичность и селективность их связывания с различными гликопротеинами предварительно исследовали в бесклеточной системе в формате иммунохроматографии. Для количественного исследования связывания данных структур с раковыми клетками мы разработали новый высокочувствительный метод МРQ-цитометрии. Мы показали, что полученные лектин-модифицированные наночастицы специфично и, более того, обратимо связываются с клетками эукариот (структуры элюировали с поверхности клеток специфичным лектину моносахаридом). Более того, было установлено, что конъюгаты наночастиц с агглютинином зародыша пшеницы могут быть использованы для разделения клеточных линий (а именно, Jurkat и 7.16.4). Полученные данные использовали для разработки терапистических структур нового поколения, а именно – биороботов на основе наночастиц. Было показано, что данные структуры могут выполнять полный набор булевых функций и специфично связываться с поверхностью клеток-мишеней на основе логического анализа молекулярного микроокружения клеток, таким образом, выступая в качестве перспективных агентов терапистики, одновременно анализирующих несколько параметров биохимической информации и принимающих заранее заданное решение. *Исследование выполнено при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» в рамках научного проекта № 17-34-80105 «мол эв а» (работа с клеточными культурами) и финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта №14-24-00106 (модификация и синтез наночастиц).*

РОЛЬ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОИММУННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ СТРЕССЕ

И.А. Янкевич^{1,2}, Г.М. Алешина², В.Н. Кокряков², Т.А. Филатенкова² ¹Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург; ²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

На протяжении многих лет антимикробные белки и пептиды нейтрофильных гранулоцитов рассматривались как противомикробные молекулярные факторы прямого действия системы врожденного иммунитета. Позже было показано, что эти молекулы вовлечены в более широкий спектр физиологических и патофизиологических реакций, в том числе накоплены многочисленные данные о влиянии антимикробных белков и пептидов на протекание иммунных реакций организма. Помимо иммунных реакций, целью которых является поддержание антигенного гомеостаза организма, к защитным реакциям относят и так называемые системные адаптивные реакции организма, запускаемые в ответ на стрессорные воздействия различной природы. Причем, по-видимому, эти реакции тесно связаны между собой и имеют как общие механизмы реализации, так и общие регуляторные молекулярные факторы, которыми могут являться антимикробные белки и пептиды. Целью нашей работы являлось изучение роли антимикробных белков и пептидов нейтрофильных гранулоцитов в регуляции нейроэндокриноиммунных взаимодействий при экспериментальном стрессе. Было показано, что дефенсины крыс и лактоферрин человека снижают уровень гормона стресса – кортикостерона в плазме крови экспериментальных животных. Участие эндогенных дефенсинов в регуляции уровня кортикостерона при стрессе было подтверждено нами опытом с превентивным введением экспериментальным животным антител к тотальной фракции дефенсинов. При введении антител уровень кортикостерона через 3 ч после стресса не снижался до базового уровня, характерного для естественного течения стресс-реакции, а оставался на повышенном уровне. Кроме того, дефенсины и лактоферрин нормализовали стресс-индуцированное перераспределение лейкоцитов крови и уровни экспрессии генов противовоспалительного цитокина IL-4 и паттерн-распознающего рецептора TLR4 в клетках селезенки крыс. Также нами установлен факт того, что при естественном течении стресс-реакции, через 30 мин после стрессорного воздействия секреция дефенсинов нейтрофилами возрастает, а к трем часам их концентрация в плазме существенно повышается. По совокупности полученных данных можно сделать вывод о том, что молекулярные факторы врожденного иммунитета играют медиаторную роль в регуляции адаптивных реакций при стрессе.