

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

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

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

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

**Москва, 8-11 февраля 2022 г.**



## **СБОРНИК ТЕЗИСОВ**

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

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

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

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

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

**Москва, 8-11 февраля 2022 г.**

## **СБОРНИК ТЕЗИСОВ**

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

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

Составители:

Овчинникова Т.В., Стукачева Е.А., Шереметьева Э.В.

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

Отпечатано на полиграфическом участке ИБХ РАН

Печать офсетная. Печ. л. 14,4. Тираж 250 экз.

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 2022 г.

# **ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ**

## СЕКЦИЯ 1

### СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ. БИОКАТАЛИЗ

#### 1.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ГИСТОНОПОДОБНЫХ HU-БЕЛКОВ МЕТОДОМ ММ-GBSA

Агапова Ю.К.<sup>1</sup>, Тимофеев В.И.<sup>1,2,3</sup>, Ракитина Т.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>НИЦ Курчатовский институт, Москва

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

<sup>3</sup>Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва  
agapova.jk@gmail.com

ДНК-связывающие HU белки присутствуют во всех бактериях и относятся к семейству белков, ассоциированных с бактериальным нуклеоидом (nucleoid associated proteins, NAPs). Они отвечают за поддержание компактизации ДНК клеток прокариот, а также за регуляцию ДНК-зависимых процессов. HU-белки являются хорошей моделью для изучения структурных основ термостабильности [1].

Термостабильные белки разных классов весьма востребованы как в научных исследованиях, так и в биотехнологических производственных процессах. Несмотря на то, что именно белки из термофильных бактерий и архей обычно имеют высокую термостабильность, белки из мезофильных организмов также могут обладать этим свойством. Примером является термостабильный гистоноподобный HU-белок из микоплазмы *Spiroplasma melliferum* (HUSpm), в то же время его аналог из микоплазмы *Micoplasma gallisepticum* (HUMgal) этим свойством не обладает [2].

При помощи метода ММ-GBSA была изучена корреляция между структурными особенностями и энергиями взаимодействия мономеров в димерах ряда HU-белков, а также их термостабильность. ММ-GBSA - метод расчёта свободной энергии связывания с использованием комбинации молекулярной механики, обобщённой модели Борна и гидрофобного вклада. В эксперименте были задействованы микоплазменные HU-белки, HUMgal, HUSpm и его мутанты со сниженной термостабильностью, и два типа HU-димеров из *Escherichia coli*: HUalpha и HUbeta.

Полученные результаты подтвердили, что используемый метод может быть успешно задействован для предсказания термостабильности, а также показали, что в разных белках даже одного класса термостабильность может быть обусловлена разными структурными факторами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 20-04-01001.

*Литература:*

1. Boyko K.M., et.al. Structural basis of the high thermal stability of the histone-like HU protein from the mollicute *Spiroplasma melliferum* KC3// Sci Rep. 2016 Nov 3;6:36366.
2. Timofeev V.I., et.al. Structural plasticity and thermal stability of the histone-like protein from *Spiroplasma melliferum* are due to phenylalanine insertions into the conservative scaffold // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. V. 36. P. 4392-4404.

## 1.2. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЛЕКУЛЫ ФИБРИНОГЕНА, ВЫЗВАННЫЕ ПЕРОКСИДИНДУЦИРОВАННЫМ ОКИСЛЕНИЕМ

*Азарова Д.Ю.<sup>1,2</sup>, Гаврилина Е.С.<sup>1</sup>, Юрина Л.В.<sup>1</sup>, Васильева А.Д.<sup>1</sup>, Бургова А.Е.<sup>1</sup>, Кононихин А.С.<sup>2,3</sup>, Николаев Е.Н.<sup>4</sup>, Розенфельд М.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

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

<sup>3</sup>Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Гальперина РАН, Москва

<sup>4</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва  
azarovadana@mail.ru

Фибриноген (ФГ) является одним из белков плазмы крови, наиболее подверженных окислительной модификации. ФГ играет важную роль в процессе свертывания крови, фибринолизе, клеточных и матричных взаимодействиях, воспалительных процессах, заживлении ран и неоплазии.

Методом масс-спектрометрии были проанализированы образцы неокисленного и обработанного 300 мкМ  $H_2O_2$  фибриногена. Методом масс-спектрометрии было обнаружено, что множество аминокислотных остатков, локализованных во всех трех полипептидных цепях и основных структурных элементах фибриногена, участвуют в окислении. Под воздействием  $H_2O_2$  в молекуле фибриногена наиболее подверженными окислению оказались остатки метионина, триптофана и гистидина. Среди модификаций, обнаруженных в этих аминокислотных остатках, имеются случаи образования метионин сульфоксида, 2-оксигистидина и гидрокситриптофана вследствие присоединения одного атома кислорода к боковой цепи (+15,99), окисления триптофана до кинуренина (+3.99) и отщепления метантиола от боковой цепи Met (-48.00). Модифицированные аминокислотные остатки были обнаружены во всех трех полипептидных цепях и всех структурных областях молекулы фибриногена, за исключением E области.

Аминокислотные остатки, участвующие в связывании тромбина, не были подвержены окислительной модификации, что указывает на сохранение тромбин-связывающих сайтов молекулы фибриногена при окислении. Содержащей наибольшее количество окислительных сайтов является  $\alpha$ C область, что подтверждает гипотезу о возможности данной области служить ловушкой для молекул АФК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 21-74-00146. В работе использовалось оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

### 1.3. ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ РЕАКЦИИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ *NEONOTHOPANUS NAMBI*

Андрианова А.А.<sup>1</sup>, Гороховатский А.Ю.<sup>2</sup>, Мышкина Н.М.<sup>2</sup>,  
Осипова З.М.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва

nandrianova2000@gmail.com

Биолюминесценция - это процесс испускания света в видимой области спектра живыми организмами, которое происходит в результате окисления субстрата - люциферина и катализируется ферментом - люциферазой. Биолюминесцентная система *Neonothopanus nambi*, представителя высших грибов, является перспективной для использования в биоимиджинге. В нашей лаборатории ранее были выделены люциферин и оксилуциферин *N. nambi*, а также подтверждена их структура [1]. Кроме того, была определена первичная структура люциферазы и получен рекомбинантный фермент [2].

Люцифераза *N. nambi* является мембранным белком, что усложняет выделение чистого препарата белка, получение его кристаллов и определение пространственной структуры. В связи с этим исследование оптимальных условий биолюминесцентной реакции является отдельной экспериментальной задачей. В данной работе мы изучили влияние различных факторов на скорость и квантовый выход люциферин-люциферазной реакции. Для реакции биолюминесценции были определены константа Михаэлиса и константа ингибирования продуктом реакции.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-74-00075, <https://rscf.ru/project/21-74-00075/>.

*Литература:*

1. Kaskova Z.M. et al. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Sci. Adv.* 3, e1602847 (2017).
2. Kotlobay A.A. et al. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *Proc Natl Acad Sci* 115, 12728-12732 (2018).

#### 1.4. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ II КЛАССА

Антошина Д.В., Ваваев М.А., Овчинникова Т.В., Баландин С.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
tiruka11@mail.ru

Бактериоцины II класса составляют значительную часть бактериальных антимикробных пептидов, синтезируемых рибосомальным путем и, в отличие от бактериоцинов класса I, не претерпевают посттрансляционных модификаций, за исключением образования внутримолекулярных дисульфидных связей у части представителей. В настоящее время бактериоцины рассматриваются как перспективные антимикробные средства для применения в медицине и ветеринарии, а также в качестве консервантов в пищевой промышленности благодаря их способности подавлять рост многих клинически значимых патогенных бактерий (включая антибиотикорезистентные штаммы), нередко сочетающейся с низкой токсичностью для человека и животных. Исследование бактериоцинов и их аналогов является одним из значимых направлений разработки новых эффективных антимикробных лекарственных средств.

Целью данной работы было выявление структурных элементов, определяющих антимикробную активность представителей двух малоисследованных семейств бактериоцинов II класса. Одним из преимуществ этих пептидов является простота их биотехнологического получения и изменения их структуры с помощью методов геной инженерии. В ходе работы с помощью гетерологической экспрессии в *E. coli* BL21(DE3) были получены мутантные аналоги педиоцин-подобных бактериоцинов BCN179 и BCN196 и лактококцин А-подобного бактериоцина BCN239. Методом серийных разведений в жидкой питательной среде проведено тестирование антимикробной активности полученных пептидов в отношении панели штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Определены значения минимальной гемолитической концентрации в отношении эритроцитов человека. Результаты работы позволяют дать первоначальную оценку вклада N- и C-концевых участков, а также дисульфидных связей в реализацию биологической активности исследуемых бактериоцинов.

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

## 1.5. ПРОСТЕЙШАЯ МЕХАНИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ХИРАЛЬНЫХ БИОМОЛЕКУЛ

*Багрова О.Е., Малышко Е.В.*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
o-bagrova@mail.ru

Хиральность - свойство объектов не совмещаться в пространстве с их зеркальными отражениями. Хиральными могут быть не только биомолекулы (аминокислоты, сахара), но и структурные элементы биополимеров ( $\alpha$ -спираль, двойная спираль ДНК) [1]. Хиральность по-видимому играет важную роль в фолдинге, поскольку уже на этапе трансляции в цепь включаются аминокислоты только одного типа (левые) [2]. Приобретая необходимую для выполнения своей функции структуру, некоторые молекулы выступают в роли молекулярных машин в организме. Они преобразуют энергию и совершают полезную работу на молекулярном уровне. Эти молекулы можно использовать в качестве мишеней для лекарственных средств. Хиральность белков важно учитывать при рассмотрении биоактивности лекарственных средств разной хиральности [2].

Особый интерес вызывает вопрос возникновения хиральной асимметрии и её роли в функционировании живых систем. Целью работы является выявление закономерностей в формировании хиральных структур в биологических системах. В рамках данной работы был проведён предварительный анализ механических свойств модельных конструкций различной хиральности. В качестве модельного объекта выбрана суперспираль coiled coil, построенная из  $\alpha$ -спиралей. В работе в рамках теории упругих сред рассмотрена энергия трёх систем: суперспирали состоящей только из правых  $\alpha$ -спиралей; только из левых; из одной правой и другой левой. Также в работе учитывались внешние силы (крутящий момент). Так, в случае невозмущённых систем (без внешних воздействий) получено, что наиболее стабильные суперспирали те, которые изменяют знак хиральности относительно  $\alpha$ -спиралей: coiled coil левозакрученная в случае правых  $\alpha$ -спиралей, а в случае левых  $\alpha$ -спиралей - правозакрученная. Смешанная система не образовывала суперспирали вовсе. При наложении внешнего момента суперспираль вела себя подобно вентильному элементу: при разных направлениях крутящего момента, давая разный ответ.

*Литература:*

1. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами. М.: КДУ, 2012. 524 с.
2. Malyshko E. V., Semenova E. V., Bagrova O. E., Murtazina A. R., Tverdislov V. A. Chiral dualism as a unifying principle in molecular biophysics // Biophysica 2021. 1 (1). 22-37.

## 1.6. СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АДЕНОЗИНОВОГО РЕЦЕПТОРА $A_{2A}$ ПРИ ПОМОЩИ СОЛЬВАТОХРОМНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

*Белouсов А.С.<sup>1</sup>, Маслов И.В.<sup>1</sup>, Хорн П.А.<sup>1</sup>, Мишин А.С.<sup>2</sup>, Баранов М.С.<sup>2</sup>,  
Борщевский В.И.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
Belousov.as@phystech.edu

Аденозиновый рецептор  $A_{2A}$ , связанный с G-белком (GPCR), представляет собой трансмембранный белок с семью  $\alpha$ -спиралями. Этот рецептор широко изучался в течение последних нескольких десятилетий, так как он участвует во многих важных процессах в организме. Модуляция активности GPCR во многом осуществляется за счёт связывания с лигандами. Лиганды можно разделить на три основные категории: агонисты, антагонисты и обратные агонисты.

Для изучения белков, их структуры и нахождения лигандов используются различные методы, например, флуоресцентная спектроскопия. Сольватохромные флуоресцентные красители способны изменять свой спектр флуоресценции в зависимости от окружающей их среды. Так как при связывании лиганда меняется конформационное состояние белка, то будет изменяться и локальное окружение красителя, что повлечет за собой изменения в спектрах эмиссии и возбуждения флуоресценции.

Для изучения структуры рецептора  $A_{2A}$ , поиска лигандов, ранее применялось множество биофизических методов, в том числе ЯМР, кристаллография, криоэлектронная микроскопия, флуоресцентная микроскопия (с использованием методов FRET и FLIM), методы молекулярной динамики, связывание радиогандов. Было найдено множество лигандов, в числе которых кофеин, теofilлин, аденозин и регаденозон.

Целью данной работы является поиск сольватохромных флуоресцентных красителей, которые были бы пригодны для определения конформационного состояния рецептора. Открытие новых лигандов дает понимание, в каких процессах в организме участвует белок, а это дает новые возможности в терапии. Мы исследовали 2 красителя, основанные на хромофорном ядре GFP, которые взаимодействуют с цистеинами в белке с помощью малеимид-тиолового взаимодействия. Мы показали связывание рецептора с красителем и изменения фотофизических свойств при добавлении к белку агониста и антагониста.

## 1.7. СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ ПОДСЕМЕЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ ИНСУЛИНА

*Бершацкий Я.В.<sup>1,2</sup>, Бочарова О.В.<sup>1</sup>, Надеждин К.Д.<sup>1</sup>, Арсеньев А.С.<sup>1</sup>,  
Бочаров Э.В.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный  
yaroslav.bershatskiy@phystech.edu

Подсемейство рецепторов инсулина, являющиеся рецепторными тирозинкиназами (РТК), содержит три рецептора: рецептор инсулина (IR), рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R) и рецептор подобный инсулиновому (IRR). Рецепторы подсемейства вовлечены в широкий спектр физиологических и патологических процессов в организме человека. Нарушение функции рецепторов связано с развитием таких заболеваний как диабет, рак и болезнь Альцгеймера. Несмотря на высокую взаимную гомологию последовательности и структуры, локализация, экспрессия и функции рецепторов сильно различаются.

Семейство рецепторов инсулина имеет уникальную структуру среди РТК. Мономер каждого рецептора состоит из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидной связью. В мембране клетки рецепторы существуют исключительно в форме ковалентно связанных димеров. Структурно рецепторы семейства состоят из внеклеточного лиганд-связывающего домена, внутриклеточного тирозинкиназного домена и трансмембранного (ТМ) домена.

В этой работе мы изучили структуру и динамику ТМ доменов InsR, IGF1R и IRR, с помощью ЯМР-спектроскопии. Нами были получены структуры всех ТМ доменов в мицеллах детергента в мономерной форме, а также данные о динамике ТМ доменов в мембрано-подобной среде. Каждая из полученных структур имеет отличительные особенности. ТМ домены InsR и IGF1R представляют собой  $\alpha$ -спирали с изгибом в области остатка пролина. ТМ домен IRR образован двумя  $\alpha$ -спиралями, соединенных гибким линкером, также он обладает более высокой подвижностью, чем ТМ домены InsR и IGF1R.

ЯМР-исследования и биотехнологические работы были поддержаны Российским научным фондом (проект № 18-14-00375).

## 1.8. ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ И ПОВЫШЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР НА АКТИВНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ

**Бычек И.А.<sup>1,2</sup>, Варижук И.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

<sup>2</sup>МИРЭА - Российский технологический университет, Москва  
ira88087642@gmail.com

Пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ) (КФ 2.4.2.1) широко используются в синтезе модифицированных нуклеозидов, ряд которых нашел применение в клинической практике (флударабин, клофарабин, рибавирин, меркаптопурин, тиогуанин и др.).

Ферментативный синтез является важной альтернативой традиционно используемым многостадийным химическим методам синтеза модифицированных нуклеозидов. Однако, использование ферментов ограничено по причине их низкой стабильности в жестких условиях (при повышенной температуре, при высоких или низких значениях pH, в присутствии органических растворителей).

В рамках данной работы на примере различных бактериальных ПНФ (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Thermus thermophilus*) нами было изучено влияние температуры и присутствия органических растворителей (ацетонитрил, этанол, диметилформамид) на активность ПНФ.

Для изучения влияния на активность фермента присутствия органических растворителей нами были выбраны мезофильная ПНФ *Escherichia coli* и термофильная ПНФ *Thermus thermophilus* I. Полученные данные указывают на большую устойчивость мезофильной ПНФ *Escherichia coli*. Данный фермент сохранял активность при содержании органического растворителя до 40%, в то время как ПНФ *Thermus thermophilus* I при повышении процентного содержания растворителей терял свою активность более стремительно, и сохранял остаточную активность максимум до 20% содержания органического растворителя.

Также в рамках данной работы на примере мезофильных ПНФ (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*) нами была исследована зависимость активности данных ферментов от температуры. При повышении температур выше 35°C происходит значительный рост активности, максимум активности ферментов соответствуют 55°C в случае ПНФ *Escherichia coli* (540% от активности при 25°C) и 45°C в случае ПНФ *Enterobacter cloacae* (235% от активности при 25°C). В продолжение исследования нами была изучена долгосрочная стабильность ПНФ *Escherichia coli* в температурном диапазоне 45-65°C.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-14-00346. Выражаем благодарность заведующему лаборатории биофармацевтических технологий ИБХ РАН Есипову Р.С. за любезно предоставленные ПНФы.

## 1.9. ПЕРЕСТРОЙКИ МЕДНОГО КЛАСТЕРА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *HYDROGENOPHILIA BACTERIUM* В ПРОЦЕССЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НА ОСНОВЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫХ ДАННЫХ С АТОМНЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

**Варфоломеева Л.А.<sup>1</sup>, Поляков К.М.<sup>2</sup>, Шипков Н.С.<sup>1</sup>, Дергоусова Н.И.<sup>1</sup>,  
Бойко К.М.<sup>1</sup>, Тихонова Т.В.<sup>1</sup>, Попов В.О.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва  
larisaavarfolomeeva@gmail.com

Тиоцианатдегидрогеназа (trTcDH) - медьсодержащий фермент, впервые выделенный из галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* и катализирующий реакцию окисления тиоцианта по следующей схеме:



Пространственная структура, полученная для trTcDH, позволила идентифицировать в активном центре trTcDH уникальный медный кластер, состоящий из трех ионов меди. Однако изучение тонких деталей строения активного центра фермента, таких как координация и движение ионов меди, на основании пространственных структур trTcDH ограничивалось недостаточно высоким уровнем разрешения и двойникованием кристаллов фермента. Для устранения данных проблем были получены кристаллы гомолога trTcDH из микроорганизма *Hydrogenophilia bacterium* (hbTcDH). Полученные hbTcDH структурные данные с атомным разрешением позволили устранить неопределенности в строении медного кластера TcDH и точно установить координационную сферу и степень окисления каждого из трех ионов меди в открытом и закрытом активном центре. Было выяснено, что при закрытии доступа растворителя в активный центр hbTcDH подвижной петлей происходит не только изменение положения аминокислотных остатков и координационной сферы ионов меди, но и смещение одного из ионов меди почти на 2 Å. Движение иона меди, вероятно, является одним из ключевых этапов в процессе реакции, катализируемой hbTcDH. Структуры hbTcDH с атомным разрешением в разных состояниях активного центра позволили уточнить предполагаемый механизм каталитической реакции окисления тиоцианта.

## 1.10. НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КАТЕПСИНОВОГО ЛИНКЕРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСЩЕПЛЯЕМЫХ КОНЬЮГАТОВ БИОМОЛЕКУЛ

*Ганжула Е.П.<sup>1,2</sup>, Брылёв В.А.<sup>1</sup>, Орешков С.Д.<sup>1,3</sup>, Сапожникова К.А.<sup>1</sup>,  
Коришун В.А.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, Москва

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
katarina.gangula@gmail.com

Таргетная химиотерапия, как способ адресной доставки лекарства непосредственно к клеткам опухоли, является весьма востребованным, хоть и молодым направлением. Данный способ лечения основан на сочетании специфичности специально подобранных антител и эффективности небольших цитотоксических молекул. Линкер, связывающий две биомолекулы, играет важнейшую роль в стабильности всего конъюгата и является ключевым фактором эффективного и избирательного высвобождения цитотоксической молекулы в клетках опухоли. Таким образом, дизайн линкера во многом определяет успешность создания эффективного биоконъюгата для использования в таргетной химиотерапии. Фармакологические свойства, стабильность и эффективность высвобождения могут регулироваться изменением линкерного фрагмента, поэтому разработка и синтез новых производных уже известных линкеров крайне актуальна при создании биоконъюгатов антител с противораковыми соединениями.

Нами были синтезированы реакционноспособные производные, расщепляемые катепсином Б, линкера, основанного на дипептиде валин-цитруллин (Val-Cit). Катепсиновый линкер занимает лидирующую позицию и входит в состав трёх из одиннадцати одобренных к применению препаратов на основе конъюгатов антител. Полученные производные представляют собой азиды, алкины, а также защищенные оксиамины. Азидо- и алкиновые производные позволяют проводить конъюгацию с антителами с помощью реакции азид-алкинового циклоприсоединения. Оксиаминовые производные катепсинового линкера позволяют вводить противоопухолевый препарат в состав антитела за счёт предварительно окисленного сайта гликозилирования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект №20-15-00361).

## 1.11. НОВЫЙ ВЫСОКОАФФИННЫЙ ПЕПТИДНЫЙ ЛИГАНД КАЛИЕВОГО КАНАЛА $K_v1.6$

Гиголаев А.М.<sup>1</sup>, Табакмахер В.М.<sup>1</sup>, Пиньейро-Жуниор Э.Л.<sup>2</sup>,  
Лушпа В.А.<sup>1</sup>, Пенъер С.<sup>2</sup>, Минеев К.С.<sup>1</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1</sup>, Тутгат Я.<sup>2</sup>,  
Василевский А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Лёвенский католический университет, Лёвен, Бельгия  
gigolaevandrey@gmail.com

Потенциал-чувствительные калиевые каналы ( $K_v$ ) - важная группа ионных каналов, которые активируются при деполяризации клеточной мембраны и непосредственно участвуют в ее реполяризации. Они вовлечены в такие клеточные процессы, как передача нервного импульса, пролиферация, дифференциация и апоптоз. Для изучения функции отдельных подтипов ионных каналов и разработки эффективных лекарств без побочных эффектов необходимы высокоселективные лиганды, которые способны различать близкие по структуре изоформы. Каналы  $K_v1.6$  широко представлены в нервной системе, но изучены гораздо хуже, чем другие члены семейства  $K_v1$ . Среди лигандов данной изоформы известны либо высокоаффинные, но не селективные, либо селективные, но низкоаффинные, поэтому актуальна проблема получения соединений, обладающих этими свойствами одновременно.

Ранее в нашей лаборатории проводились работы по получению высокоаффинных лигандов канала  $K_v1.3$  на основе пептида Tk-AMP-X2 из пшеницы *Triticum kiharae*. Был получен ряд производных, самым активным из которых оказался Tk-hefu-10 (с полумаксимальной ингибирующей концентрацией  $ИК_{50} \approx 150$  нМ). Мы построили и проанализировали компьютерные модели взаимодействия Tk-hefu-10 с  $K_v1.3$  и  $K_v1.6$ . На основании этих моделей были предложены аминокислотные замены для увеличения селективности и аффинности пептида к каналу  $K_v1.6$ . Новое производное Tk-hefu-11 было получено в бактериальной системе экспрессии. Его активность исследовалась методом двухэлектродной фиксации потенциала на панели  $K_v$ , экспрессированных в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*. В результате нам удалось получить пептид с наномолярной аффинностью к искомой изоформе  $K_v1.6$  ( $ИК_{50} \approx 15$  нМ) и селективностью, превышающей известные аналоги. Кроме того, был получен образец <sup>15</sup>N-меченого Tk-hefu-11 и исследована его структура в растворе методами ядерного магнитного резонанса. Полученный нами пептидный лиганд калиевого канала  $K_v1.6$  будет использован для изучения функции этой изоформы.

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

## 1.12. ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕТИЧЕСКОЙ РНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ NSUN7 НА СПЕРМАТОГЕНЕЗ МЫШИ

*Гусева Е.А.<sup>1</sup>, Плетнев Ф.И.<sup>1,2</sup>, Сергиев П.В.<sup>1,2</sup>*

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

<sup>2</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва  
eguseva98@mail.ru

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

Наша работа посвящена исследованию каталитической активности и функциональной роли NSUN7.

NSUN7 был отнесен к семейству NSUN на основании гомологии последовательности, однако метилтрансферазная активность не была для него показана экспериментально. В своей работе мы сравнили предсказания структуры NSUN7, выполненные с помощью различных биоинформатических сервисов. В ходе анализа нам удалось выявить NusB подобный домен на N-конце NSUN7, который ранее не был описан у других представителей семейства NSUN.

Помимо этого, мы изучили последовательности консервативных мотивов NSUN7 и сравнили их с мотивами NSUN5, наиболее близкого по последовательности к NSUN7 представителя семейства NSUN, для которого показана метилтрансферазная активность. Также мы рассмотрели консервативность и устройство мотивов NSUN7 в зависимости от строения фиброзной оболочки у данного вида. В ходе анализа мы выявили значительные изменения в S-аденозилметионин-связывающих мотивах, что может указывать на смену или же на изменение механизма связывания кофактора.

Далее мы провели экспериментальную проверку метилтрансферазной активности с помощью методов радиоактивного мечения. Мы использовали два подхода: мечение РНК продукта с помощью C<sup>14</sup> и мечение комплекса белок-РНК с помощью P<sup>32</sup>. Однако в ходе наших экспериментов выявить каталитическую активность не удалось.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №21-64-00006.

### 1.13. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СЕРОТОНИНА И ТРИПТОФАНА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЫВОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С АМИЛОИДНЫМ БЕТА-ПЕПТИДОМ

*Дерюшева Е.И., Литус Е.А., Казаков А.С., Немашкалова Е.Л.,  
Шевелева М.П., Пермяков С.Е.*

Институт биологического приборостроения с опытным производством -  
ФИЦ ПушНЦ биологических исследований РАН, Пущино  
evgenia.deryusheva@gmail.com

Амилоидный бета-пептид (Аβ) - один из ключевых факторов развития болезни Альцгеймера (БА). Дисбаланс между продукцией и выведением Аβ приводит к его накоплению в тканях головного мозга в виде амилоидных бляшек. Перспективным подходом к терапии БА является снижение свободной концентрации Аβ в центральной нервной системе воздействием на "депо" Аβ, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), путем увеличения сродства ЧСА к Аβ за счет изменения концентрации лигандов ЧСА в крови. Природные лиганды ЧСА, триптофан (TRP) и серотонин, (SRO), участвуют в патогенезе БА, но молекулярные механизмы явления остаются малоизученными. В настоящей работе методом поверхностного плазмонного резонанса мы изучили влияние SRO и TRP на равновесные и кинетические параметры взаимодействия ЧСА с мономерной формой Аβ40/Аβ42. Несмотря на близость химических структур TRP и SRO, TRP не оказывает выраженного влияния на сродство ЧСА к Аβ, тогда как SRO способствует взаимодействию ЧСА-Аβ40/Аβ42, снижая величину  $K_D$  в 7/17 раз, соответственно. Различия в действии TRP и SRO можно объяснить различиями в их влиянии на четвертичную структуру ЧСА, обнаруженными методом химических сшивок, а также отличиями в паттернах их связывания с ЧСА, согласно данным молекулярного докинга. Наблюдаемое усиление взаимодействия ЧСА-Аβ может включать в себя прямое взаимодействие SRO с Аβ, что подтверждается исследованиями кинетики реакции фибриллообразования Аβ в присутствии ЧСА и его лигандов, отслеживаемой по флуоресценции тиофлавина Т. Показана выраженная способность SRO ингибировать фибриллообразование Аβ40, превосходящая таковую для TRP. Полученные результаты могут служить основой для разработки средств терапии и профилактики БА.

Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ № 20-74-10072 (Е.А. Литус).

#### 1.14. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПОИСК НОВЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ТРАНСКРИПТОМАХ МОРСКИХ ПОЛИХЕТ

*Дуань Ш.*<sup>1,2</sup>, *Хуань Ю.*<sup>3</sup>, *Пантелеев П.В.*<sup>1,2</sup>, *Овчинникова Т.В.*<sup>1,2</sup>

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

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

<sup>3</sup>Шэньчжэнь ключевая лаборатория морской геномики, BGI Marine, Шэньчжэнь, Китай  
duan.sh@phystech.edu

Антимикробные пептиды (АМП) являются важными факторами врожденного иммунитета и имеют большой потенциал в качестве альтернативы традиционным противомикробным лекарственным средствам благодаря своим свойствам антибиотиков широкого спектра действия и множественным механизмам уничтожения бактерий. Двумя основными проблемами, стоящими в настоящее время перед разработчиками противомикробных агентов нового поколения на основе АМП, являются относительно высокая токсичность АМП в отношении клеток млекопитающих и высокая стоимость их производства. Для решения этих проблем, во-первых, необходимо получить большой объем данных об АМП и получить значительное количество образцов для тестирования, во-вторых, снизить токсичность действующих АМП и сконструировать более эффективные аналоги путем направленного мутагенеза.

В настоящем исследовании был использован высокопроизводительный биоинформатический подход для поиска новых АМП из транскриптомов 12 морских полихет: *Abarenicola pacifica*, *Arenicola marina*, *Bonellia viridis*, *Clymenella torquata*, *Heteromastus filiformis*, *Leitoscoloplos robustus*, *Naineris dendritica*, *Ophelina acuminata*, *Phylo foetida*, *Scalibregma inflatum*, *Scoloplos armiger*, *Thoracophelia mucronata*. Была создана база данных новых АМП, проведены классификация семейств и прогнозирование активности пептидов. Большой объем структурированных данных позволяет выбрать кандидатные АМП для дальнейших исследований, синтезировать лучшие из них и повысить эффективность экспериментов.

В частности, белки-предшественники АМП, которые содержат домен BRICHOS и бета-шпилечный зрелый пептид, обнаружены у морских полихет [1]. BRICHOS-домен встречается также в предшественниках белков млекопитающих и предположительно выполняет роль молекулярного шаперона [2]. Для дальнейшего изучения роли домена BRICHOS в процессе биосинтеза АМП мы разработали процесс пакетного предсказания структурных доменов белков-предшественников и успешно предсказали наличие BRICHOS-домена и новых бета-шпилечных АМП у каждого вида полихет.

*Литература:*

1. Bruno R. et al. "Worms' antimicrobial peptides." *Mar. Drugs*, vol. 17, no. 9, 2019, doi:10.3390/md17090512.
2. Leppert A., Chen G., and Johansson J. "BRICHOS: a chaperone with different activities depending on quaternary structure and cellular location?" *Amyloid*, vol. 26, no. sup1, pp. 152-153, 2019, doi: 10.1080/13506129.2019.1582511.

## 1.15. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АСТАКСАНТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА AstaP

Егоркин Н.А.<sup>1</sup>, Слонимский Ю.Б.<sup>1</sup>, Фридрих Т.<sup>2</sup>, Максимов Е.Г.<sup>3</sup>, Случанко Н.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха - ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Химический институт, Технический институт Берлина, Берлин, Германия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

nikitaegorkin99@gmail.com

Каротиноиды являются гидрофобными соединениями, выполняющими множество различных функций в живых организмах. Каротиноиды являются мощными антиоксидантами, которые могут быть применимы в биомедицинских задачах, однако высокая гидрофобность затрудняет их перенос в водных растворах. Использование природных водорастворимых каротиноид-связывающих белков может решить эту проблему. Белок AstaP, недавно выделенный из одноклеточных зеленых водорослей рода *Scenedesmus* и имеющий небольшую молекулярную массу, особенно привлекателен, но описан лишь поверхностно. Целью данной работы было изучение репертуара связываемых лигандов рекомбинантного AstaP и его способности участвовать в переносе каротиноидов. Методами гель-фильтрации и спектроскопии кругового дихроизма было показано, что AstaP является мономерным бета-складчатым белком. Способность апоформы AstaP связывать каротиноиды была показана *in vitro*. При экспрессии в каротиноид-производящих штаммах *E.coli* AstaP эффективно экстрагировал каротиноиды из мембран, образуя стабильные комплексы с зеаксантином, кантаксантином, астаксантином и, в меньшей степени, с бета-каротином. Холоформа AstaP оказалась способна передавать каротиноиды в липосомы и неродственные каротиноид-связывающие белки цианобактерий. Малая молекулярная масса в сочетании со способностью связывать и переносить широкий спектр каротиноидов делает его универсальным модулем как доставки, так и накопления каротиноидов, что открывает возможности его биотехнологического применения.

Работа поддержана грантом РФФИ-DFG (проект №20-54-12018).

## 1.16. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕЙРОМОДУЛЯТОРА Lypx2 С $\alpha_4\beta_2$ -НИКОТИНОВЫМ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

*Заиграев М.М.<sup>1,2</sup>, Чузунов А.О.<sup>1,2</sup>, Шенкарев З.О.<sup>1,2</sup>, Люкманова Е.Н.<sup>1,2</sup>, Пармонов А.С.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный  
maximzaigraev@yandex.ru

Lypx2 - важный модулятор ЦНС, участвующий в холинергическом контроле тревожности; усиливает десенситизацию  $\alpha_4\beta_2$ -никотинового ацетилхолинового рецептора ( $\alpha_4\beta_2$ -нАХР) и закреплен в мембране при помощи GPI-якоря. Высокая экспрессия Lypx2 отмечается в отделах мозга, отвечающих за контроль уровня тревожности, - миндалине, таламусе и префронтальной коре.

В настоящей работе на основе ранее полученной методом ЯМР пространственной структуры во-дорастворимого домена Lypx2 (код PDB: 6ZSS) была построена модель Lypx2 с GPI-якорем и N-гликозилированием по остатку N45, а также лиганд-рецепторный комплекс  $\{\alpha_4\beta_2$ -нАХР + Lypx2 + GPI-якорь} в мембранном окружении (DOPE:POPC:PSM:Chol = 2:1:5:2), для которых были выполнены расчёты молекулярной динамики (МД) с целью установить структурно-динамические параметры этих систем. Для МД использовали ПО GROMACS; длительность траекторий составила 1000 и 500 нс, соответственно; расчет проводили в силовом поле CHARMM36m.

Отбор стартовой конформации комплекса  $\{Lypx2 + \alpha_4\beta_2$ -нАХР} осуществлялся методом ансамблевого докинга по  $\alpha_4/\alpha_4$ -интерфейсу в ZDOCK с последующим пост-скорингом в PLATINUM, учитывающим число контактов, площадь взаимодействия и гидрофобную комплементарность. Было отобрано 33 решения, из которых по визуальным признакам было выбрано финальное с учётом глубины проникновения Lypx2 в область  $\alpha_4/\alpha_4$ -интерфейса и ориентации С-концевого участка Lypx2 в сторону мембраны (в соответствии с МД GPI-заякоренного Lypx2 в мембране).

На основании выбранного решения докинга и полученной стабильной конформации Lypx2 с GPI-якорем был построен комплекс  $\{Lypx2 + GPI$ -якорь +  $\alpha_4\beta_2$ -нАХР + нейрональная мембрана}; использовались программные пакеты PyMOL, IMPULSE и CHARMM-GUI. МД показала высокую стабильность комплекса, а также наличие важных взаимодействий  $\alpha_4/\alpha_4$ -интерфейса с первой и второй петлями, а также С-концевым участком Lypx2. Более того, были выявлены контакты рецептора с липидными хвостами и углеводными остатками GPI-якоря.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20176).

## 1.17. ВЫЯВЛЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ РОЛИ КОНСЕРВАТИВНЫХ ОСТАТКОВ ПРОЛИНА В РЕЦЕПТОРАХ СЕМЕЙСТВА IR МЕТОДАМИ АТОМИСТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

*Идиятуллина А.Р.<sup>1</sup>, Бершацкий Я.В.<sup>1,2</sup>, Кузнецов А.С.<sup>1,2,3</sup>, Бочаров Э.В.<sup>1,2</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1,2,3</sup>*

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

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

<sup>3</sup>НИУ Высшая школа экономики, Москва

Idiatullina.AR@phystech.edu

Рецептор инсулина (IR) является одной из важнейших рецепторных тирозинкиназ в мембране клеток. Также в минисемейство IR входят рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-1R) и рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR). Каждый из них играет свою роль в регулировании жизнедеятельности клетки: IR отвечает за регуляцию гомеостаза глюкозы, IGF-1R - за рост и развитие организма, а IRR - за регуляцию щелочного баланса. Все три белка обладают похожей структурной организацией - представляют собой ковалентно связанные гомотетрамеры, в составе которых есть две внеклеточные  $\alpha$ -субъединицы и две  $\beta$ -субъединицы, имеющихся как внеклеточную, так и трансмембранную (ТМ) и цитоплазматическую части. Известно, что именно ТМ домен  $\beta$ -субъединиц играет ключевую роль в активации рецепторов и передаче сигнала внутрь клетки. В лаборатории ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН получены экспериментальные данные, указывающие на особенности поведения консервативного остатка пролина в ТМ сегментах, особенно, в случае IRR. Основываясь на ЯМР-данных, полученных в мицеллах, мы построили модели мономеров ТМ сегментов IR, IGF-1R и IRR в явно заданных липидных мембранах и оценили их структурно-динамические параметры. Провели сравнение поведения пептидов в липидных бислоях из дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) и димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ). Показали, что в более тонком бислое ДМФХ излом в области остатка пролина стабилизируется у IR и IRR, а у IGF-1R наблюдался наклон оси спирального фрагмента относительно нормали к мембране. В то же время, в ДПФХ формирование стабильного излома наблюдали только для IRR, а угол наклона других пептидов был меньше. Выявленные структурные особенности ТМ сегментов в разных мембранах говорят в пользу возможности изменения параметров мономеров/димеров при миграции в разные области мембраны клетки или возможности активации каждого из рецепторов в своём специфическом мембранном окружении. Понимание механизма активации этих рецепторов может помочь в разработке новых методов терапии таких заболеваний, как сахарный диабет.

Работа поддержана грантом РФФИ №18-14-00375.

## **1.18. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КИСЛОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА**

***Калиновский А.П., Козлов С.А., Андреев Я.А.***

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

Кислоточувствительные ионные (acid-sensing ion channel, ASIC) и TRP каналы играют важную роль в воспалительных, нейродегенеративных, адаптивных и когнитивных процессах. Для изучения модуляторов их активности при нейродегенеративных процессах необходимы удобные для использования клеточные модели, максимально приближенные по своим свойствам к нормальным нейронам. Мы изучили профиль экспрессии и функциональность ионных каналов ASIC, TRPV1 и TRPA1 в клетках интактной нейробластомы человека SH-SY5Y и культуры, дифференцированной в нейрональный фенотип ретиновой кислотой.

Анализ клеток проводили при помощи определения уровня экспрессии каналов на уровне мРНК и электрофизиологических измерений методом локальной фиксации потенциала. Дифференцированные клетки в ответ на кислотные стимулы демонстрировали значительные ASIC-опосредованные ионные токи, превосходящие токи интактных клеток. По полученным характеристикам наблюдаемых токов (средняя амплитуда пика, константа времени десенситизации, pH полумаксимальной активации и стационарной десенситизации) и ответам на ASIC-селективные низкомолекулярные (амилорид, севанол) и пептидные (мамбалгин 1, APETx2) лиганды был сделан вывод, что в дифференцированных клетках SH-SY5Y преобладают гомомерные ASIC1a-каналы. Ионные токи в ответ на селективные агонисты TRPV1 и TRPA1 были зарегистрированы только на малой доле популяции интактной нейробластомы. Данные электрофизиологии согласуются с распределением уровней мРНК исследуемых каналов до и после дифференцировки.

Таким образом, дифференцированная ретиновой кислотой нейробластома может быть использована для электрофизиологического тестирования модуляторов нативных человеческих ASIC1a-каналов. Это открывает возможности для характеристики фармакологически активных соединений при создании новых нейропротекторных и анальгетических препаратов, действующих на ASIC1a.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-15-00322.

## 1.19. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА И ПРИМЕМБРАННОГО ГИДРОФОБНОГО РЕГИОНА РЕЦЕПТОРОВ TLR2, TLR3 И TLR9 ЧЕЛОВЕКА

*Корнилов Ф.Д.<sup>1,2</sup>, Шабалкина А.В.<sup>1,2</sup>, Лушпа В.А.<sup>1,2</sup>, Гончарук М.В.<sup>1</sup>, Каюшин А.Л.<sup>1</sup>, Волынский П.Е.<sup>1</sup>, Арсеньев А.С.<sup>1</sup>, Гончарук С.А.<sup>1,2</sup>, Минеев К.С.<sup>1,2</sup>*

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

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

Толл-подобные рецепторы (TLR) - паттерн-распознающие рецепторы врожденной иммунной системы. Нарушения в регуляции TLR и каскадных путей, которые активируют TLR, могут приводить к аутоиммунным и воспалительным заболеваниям, а также к раку, атеросклерозу и аллергии. Поэтому TLR являются потенциальными мишенями при создании новых лекарств.

Для детализированного исследования механизмов активации рецепторов необходима структурная информация о данных молекулах. Структуру полноразмерного TLR определить не удаётся, но получается исследовать отдельные функциональные домены TLR: внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный. Данные о структурах трансмембранных доменов отсутствуют для большинства членов семейства TLR человека. Нашей целью было определить структуры трансмембранного региона TLR методами ЯМР-спектроскопии. В данной работе представлены результаты исследования рецепторов TLR2, TLR3 и TLR9.

Анализ аминокислотной последовательности для всех TLR человека показывает, что между трансмембранным (tm) и внутриклеточным доменами TLR находится примембранный гидрофобный регион (jm). Для TLR4 было показано, что данный регион входит в состав трансмембранной  $\alpha$ -спирали, а также обладает функциональной значимостью при олигоизомеризации TLR4. Поэтому в исследуемые пептиды мы также включили примембранный гидрофобный регион.

В данной работе мы определили пространственные структуры пептидов в мембраноподобных средах: TLR2tmjm в бицеллах DMPC/DMPG/DHPC, TLR3tmjm в мицеллах DPC и TLR9tmjm в мицеллах LPPC/LPPG. Для того, чтобы понять, как организованы пептиды в плоском липидном бислое мы провели компьютерные симуляции методами молекулярной динамики полученных структур в бислое POPC.

Таким образом, мы определили архитектуру трансмембранного и примембранного регионов толл-подобных рецепторов человека, что позволит в дальнейшем детализировано исследовать процесс димеризации толл-подобных рецепторов и определить роль в этом процессе трансмембранного и примембранного регионов.

## 1.20. ЕСТЕСТВЕННЫЕ АНТИТЕЛА РАСПОЗНАЮТ УГЛЕВОДНЫЕ ЭПИТОПЫ НА АПОПТОТИЧЕСКИХ ТЕЛЬЦАХ

Липатников А.Д.<sup>1</sup>, Рапопорт Е.М.<sup>1</sup>, Бовин Н.В.<sup>1</sup>, Шилова Н.В.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва  
Alex.9508@yandex.ru

В процессе апоптоза клетка фрагментируется и образуются апоптотические тельца (АпТ), состав поверхности которых принципиально изменяется. В том числе происходят преобразования в составе гликокаликса. Образующиеся нео-эпитопы, в свою очередь, могут служить мишенями естественных антител, выполняющих роль "домашней хозяйки" и запускающих процесс элиминации АпТ. Однако, какие именно гликановые структуры в этом задействованы - до сих пор неизвестно.

С помощью технологии гликоэрея была изучена специфичность антител - IgG и IgM, - связавшихся с поверхностью нативных клеток клеточной линии HT29 и соответствующих апоптотических телец. При сравнении полученных профилей оказалось, что наиболее чувствительным к апоптотическим изменениям являются антитела класса М. Так оказалось, что уровень IgM к антигенам группы крови А (изначально экспрессированным на поверхности нативных HT29) и родственным им антигенам Форссмана (ди- и трисахариду) значительно снижается при апоптозе, что согласуется с литературными данными по изменению гликанового профиля этих клеток, связанного, в том числе, с повышенной активностью фукозидаз [E. Rapoport, J. LePendu, *Glycobiology*. 9(12): 1337-1345 (1999)]. Активностью гликозидаз можно также объяснить увеличение титра антител в элюатах с АпТ к дефукозилированному А-антигену (GalNAc $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ ) и коровым (внутренним) участкам О-цепей гликопротеинов. Профиль специфичности IgM как нативных клеток, так и АпТ, также включал в себя ксеноантиген Galili (три-, тетра- и пентасахариды), персульфатированную мальтозу и некоторые бактериальные О-полисахариды (из *E. coli*, *P. mirabilis* и др.), уровень антител к которым при апоптозе также увеличивался. Наличие таких нетипичных для нормальных человеческих клеток эпитопов связано, по-видимому, с aberrantным гликозилированием опухолей, которые в процессе апоптоза изменяются и превращаются в "апоптотические паттерны", распознаваемые IgM. Являются ли обнаруженные изменения в уровнях антител характерным явлением для всех апоптотических телец или только для АпТ из опухолевых клеток, требует дополнительного исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №22-24-00398.

## 1.21. МОДУЛЯЦИЯ СТРУКТУРЫ И АКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 1 ИОНАМИ Zn<sup>2+</sup>

Лушпа В.А.<sup>1,2</sup>, Гончарук М.В.<sup>2</sup>, Залевский А.О.<sup>2</sup>, Талызина И.А.<sup>2,3</sup>,  
Лугинина А.П.<sup>1</sup>, Вахрамеев Д.Д.<sup>1</sup>, Шевцов М.Б.<sup>1</sup>, Гончарук С.А.<sup>2</sup>,  
Арсеньев А.С.<sup>2</sup>, Борщевский В.И.<sup>1</sup>, Минеев К.С.<sup>1,2</sup>

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

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

<sup>3</sup>Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва  
lushpa@phystech.edu

Толл-подобные рецепторы (TLR) являются ключевыми участниками врожденного иммунного ответа. Объектом исследования представленной работы является TLR1. Данный рецептор в комплексе с TLR2 отвечает за распознавание триациллипептидов стенки бактерий. Несмотря на большое количество исследований и данных об этих белках семейства TLR, информации о работе комплекса TLR1/TLR2, структурно-функциональные основы их работы до сих пор не до конца ясны.

В работе представлены данные о структуре и динамике цитоплазматического домена TLR1 в растворе, анализа металлсвязывающей способности рецептора. В работе показано взаимодействие белка с ионами цинка с нанолярной афинностью, опосредованное взаимодействиями с остатками С667 и С686. Возможные модели комплекса ЦПД TLR1 с Zn<sup>2+</sup> были предсказаны *in silico*. По данным функциональных анализов для гетеродимерного рецептора TLR1/2 было показано влияние концентрации цинка на активность TLR1. При введении мутации С667А нарушается активность рецептора. Анализ позиции С667 в структуре TLR1 и возможных эффектах мутации С667А предполагает, что связывание цинка рецептором TLR1-TIR имеет решающее значение для активации рецептора.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-70024).

## 1.22. ЛЮЦИФЕРАЗНАЯ СПЛИТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ УБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ

Макарова М.О., Белогуров А.А., Кудряева А.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
edemnoeast99@gmail.com

Убиквитин, небольшой (около 8 кДа) глобулярный белок, играет центральную роль в клеточном протеостазе, поскольку служит ключевым сигналом деградации белков и целых органелл как в убиквитин-протеасомной системе, так и при аутофагии, соответственно. Помимо хорошо известных функций, таких как мечение субстратов для протеасомной деградации и сигнал репарации ДНК, полиубиквитиновые цепи также вовлечены в другие важнейшие клеточные процессы, например, участвуют в регуляции клеточного цикла, в работе иммунной системы, деградации белков в митохондриях и обеспечении стабильности мРНК. Малый размер убиквитина и значительная вариативность в топологии убиквитиновых цепей создают значительные экспериментальные трудности при исследовании процессов убиквитинования. В данной работе для изучения образования убиквитиновых цепей *in vivo* нами был использован метод комплементации люциферазного белка NanoLuc. Система состоит из двух небольших (11 аминокислот) пептидов (LcBit и SmBit), каждый из которых слит с мономером убиквитина, и большого (16.5 кДа) фрагмента (LgBit). При образовании убиквитиновой цепи происходит реконструкция белка NanoLuc и разгорание люминесцентного сигнала. Полученные результаты доказывают эффективность метода люциферазной комплементации при анализе взаимодействия убиквитинов в составе единой цепи *in vivo* и открывают перспективы в использовании данного метода для изучения гетерогенных полиубиквитиновых цепей.

Работа была поддержана проектами РНФ № 21-74-10154 и грантом Президента РФ МД-5902.2021.1.4.

### **1.23. MoxSAASoti: ПЕРВЫЙ БИФОТОХРОМНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК, УСТОЙЧИВЫЙ В ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СУПЕРРАЗРЕШАЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ**

***Марынич Н.К., Гавшина А.В., Савицкий А.П.***

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

marynich\_n@mail.ru

GFP (green fluorescent protein)-подобные флуоресцентные белки (ФБ) являются генетически кодируемыми метками для исследования белков в живых клетках методами суперразрешающей микроскопии. Для точного определения положения целевого белка в клетке белок-метка должен быть химически-инертным во избежание побочных химических реакций, приводящих к ошибочным результатам. В частности, в секреторном пути многие ФБ неправильно сворачиваются и не могут флуоресцировать из-за образования ненативных дисульфидных связей.

SAASoti - бифотохромный ФБ, обладающий свойствами необратимой фотоконверсии и обратимого фотопереключения. Ранее в лаборатории была получена мономерная форма mSAASoti, путем введения точечной замены V127T [1].

Для получения стабильной в окислительных условиях формы mSAASoti, путем сочетания методов сайт-направленного и случайного мутагенезов, были введены замены пяти аминокислотных остатков цистеина: C21N, C72G, C106G, C117T, C176A. Новый вариант получил название moxSAASoti ("mox" - monomeric and oxidation resistant). Характеристика moxSAASoti методом гель-фильтрации подтверждает мономерную форму белка. Флуоресцентные параметры ( $\lambda_{ex}$ ,  $\lambda_{em}$ , pKa,  $\epsilon$ ,  $\phi$ ) moxSAASoti близки к mSAASoti, а скорости фототушения и фотоконверсии (зеленый-красный) для нового варианта выше.

*Литература:*

1. Solovyev I. D., Gavshina A. V., Katti A. S., Chizhik A. I., Vinokurov L. M., Lapshin G. D., Ivashina T. V., Khrenova M. G., Kireev I. I., Gregor I., Enderlein J., Savitsky A. P. Monomerization of the photoconvertible fluorescent protein SAASoti by rational mutagenesis of single amino acids // Scientific Reports. 2018, V. 8.

## 1.24. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОХОЖДЕНИЯ ИОНОВ Na<sup>+</sup> ЧЕРЕЗ "ГИДРОФОБНЫЙ ЗАТВОР" В ПОРЕ ИОННОГО КАНАЛА TRPV1

Минаков А.С.<sup>1</sup>, Трофимов Ю.А.<sup>2,4</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>2,3,5</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биорорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

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

<sup>4</sup>НИЯУ МИФИ, Москва

<sup>5</sup>НИУ Высшая школа экономики, Москва

min\_a\_s@mail.ru

TRPV1 - ионный канал семейства TRP, рецептор различных физико-химических сигналов, таких как капсаицин (вещество, содержащееся в стручковом перце), низкие значения pH, температура >42°C. Участвуя в работе различных сенсорных систем организма, в частности ноцицептивных, TRPV1 является мишенью для фармакологических препаратов нового поколения. В качестве терморепцептора TRPV1 является объектом для применения в термогенетике - методе управления работой клеток за счет локального повышения температуры. Детальное понимание механизмов функционирования TRPV1 поможет в дизайне каналов с новыми свойствами, которые в будущем могут быть использованы для лечения различных заболеваний. Пора TRPV1 - это канал нанометрового масштаба, обеспечивающий проводимость ионов и молекул воды через клеточную мембрану. Управление проводимостью поры осуществляется т.н. "гидрофобным затвором" - сужением канала, образованным боковыми цепями аминокислотного остатка изолейцина (Ile679 в нумерации TRPV1 серой крысы). Вблизи Ile679 расположены полярные группы остатка аспарагина (Asn676), ориентация которых, как было показано ранее, влияет на уровень гидратации створа.

В данной работе проанализированы результаты молекулярно-динамического моделирования TRPV1 дикого и мутантного (замена Asn676Ser) типов. Показано, что в канале дикого типа полярные группы Asn676 координируют молекулы воды в гидратной оболочке ионов натрия при их прохождении через гидрофобный затвор. Замена Asn676Ser приводит к исчезновению эффекта координации воды, и, как следствие, к возникновению непроводящего фенотипа канала.

Работа поддержана грантом РФФ №18-14-00375.

## 1.25. ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ K61V НА СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ И ЛИПИДСВЯЗЫВАЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ БЕЛКА ЧЕЧЕВИЦЫ Lc-LTP2

Никитина М.А.<sup>1,2</sup>, Мельникова Д.Н.<sup>1,2</sup>, Овчинникова Т.В.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный  
d\_n\_m\_@mail.ru

Одной из актуальных задач современной медицины является поиск и разработка эффективных систем доставки лекарственных средств. Среди достаточно широкого списка форм носителей в выигрышном свете представляются белки-транспортёры, характеризующиеся низкой токсичностью, высокой загрузкой лекарственного вещества, хорошей биосовместимостью, способностью к контролируемому и пролонгированному высвобождению лекарств. Растительные липид-транспортные белки (LTP) являются новым, не изученным в этом направлении классом белков-транспортёров. Характерной особенностью LTP является наличие в структуре гидрофобной впадины, благодаря которой они могут связывать и переносить широкий спектр гидрофобных лигандов, в том числе некоторые лекарственные вещества.

В рамках данной работы в качестве модельного белка был выбран Lc-LTP2 чечевицы, на примере которого была изучена роль Lys61 в связывании различных гидрофобных лигандов. Lys61 расположен рядом с "верхним" входом в гидрофобную впадину белка. Для этой цели с помощью полноразмерной амплификации базовой экспрессирующей конструкции pET-His8-TrxL-Lc-LTP2 с использованием инвертированной ПЦР и мутагенизирующих праймеров была введена замена Lys61 на валин. На основе полученной плазмиды и штамма *E.coli* BL-21 (DE3) была разработана система для гетерологической экспрессии мутантного аналога K61V. С помощью флуоресцентной спектроскопии была исследована его способность связывать и переносить лиганды, а также проведен молекулярный докинг лигандов для белка дикого типа и его мутантного аналога. В качестве лигандов были использованы насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с разной длиной ацильной цепи (лауриновая, пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и бегеновая), а также лизолипиды LPPG и LPPC.

В результате работы было установлено, что Lys61 является одной из ключевых аминокислот, влияющих на способность Lc-LTP2 связывать жирные кислоты и лизолипиды.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-25-00527).

## 1.26. РЕВИЗИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ КОММЕРЧЕСКИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЛЕКТИНОВ

Никифорова А.В.<sup>1</sup>, Ахметгалиева А.Ф.<sup>2</sup>, Хлопин В.А.<sup>3</sup>, Мальцева Д.В.<sup>4</sup>, Нокель А.Ю.<sup>1,5</sup>, Бовин Н.В.<sup>1</sup>, Шилова Н.В.<sup>1,5</sup>

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

<sup>2</sup>ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань

<sup>3</sup>Институт физиологии КомиНЦ Уро РАН, Сыктывкар

<sup>4</sup>НИУ Высшая школа экономики, Москва

<sup>5</sup>НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.

Кулакова, Москва

nikiforovaalica@gmail.com

Растительные лектины широко используются для сравнительной характеристики гликозилирования белков, клеток и тканей. Несмотря на то, что поставщики указывают в своих каталогах специфичность, об их реальных мишенях в растениях мало известно. Мы проанализировали специфичность 6 коммерчески доступных лектинов - RCA<sub>120</sub> из *R. communis*, РНА-Е и РНА-L из *P. vulgaris*, WGA из *T. vulgaris*, SBA из *G. max*, жакалина из *A. integrifolia*, а также вискумина из *V. album*, с помощью разработанного нами полисахаридного эррея, содержащего 113 пектиновых полисахаридов (ПС), выделенных из различных растений, и около 20 моно- и олигосахаридов - основных компонентов изучаемых полисахаридов, а также компонентов N-цепей гликопротеинов (так как именно их изучают с помощью таких лектинов). Оказалось, что RCA<sub>120</sub>, известный как Galβ-связывающий лектин, взаимодействовал с 23 из 113 ПС, в том числе с ксилоглюканом, галактоманнаном, в составе которых преобладают глюкоза и манноза, соответственно. Вискумин, распознающий как Galβ-и Neu5Acα2-6-терминированные, так и сульфатированные структуры, связывался с десятью полисахаридами, в том числе с галактуронаном с преобладанием уроновых кислот и арабинозы. РНА-L, узнающий несиалилированные N-цепи, распознавал четыре ПС с высоким содержанием уроновых кислот, а также арабиногалактан с высоким содержанием галактозы. Жакалин (каталожная специфичность Galβ1-3GalNAcα) и SBA (α и βGalNAc) связывались с галактоманнаном с высоким содержанием маннозы и полисахаридом с высоким содержанием галактозы, соответственно. Т.е. большинство исследованных коммерческих лектинов способны взаимодействовать с различными растительными ПС, не имеющими структурного сходства с описанными для них в литературе лигандами. Таким образом, полученные с помощью полисахаридного гликоэррея данные свидетельствуют о том, что коммерческие растительные лектины обладают более широкой специфичностью, чем принято считать, поэтому к результатам, полученным с их помощью, следует относиться с осторожностью, особенно при изучении растительных объектов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 20-63-47110.

## 1.27. МОДИФИКАЦИЯ ШАРНИРНОЙ ОБЛАСТИ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В ИЗ *SERRATIA PROTEOMACULANS* ПОДАВЛЯЕТ КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ, НО СПОСОБСТВУЕТ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТА

Петренко Д.Е.<sup>1</sup>, Тимофеев В.И.<sup>1,2,3</sup>, Михайлова А.Г.<sup>2</sup>, Ракитина Т.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>НИЦ Курчатовский институт, Москва

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

<sup>3</sup>Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва  
dmitry.e.petrenko@gmail.com

В исследовании впервые описана кристаллическая структура бактериальной олигопептидазы В из *Serratia proteomaculans* (PSP) - двухдоменного трипсиноподобного фермента из семейства пролилолигопептидаз (POP). Структура была получена для фермента с модифицированной шарнирной областью (PSPmod) в присутствии спермина. Модификация вызывала снижение каталитической активности, которое в значительной степени было связано с заменой функционально важного Glu75. Олигомерный состав, вторичная структура и термодинамические характеристики PSP и PSPmod были идентичны и схожи, соответственно, что указывает на то, что полученные структурные данные применимы для выяснения механизма каталитической активации бактериальной OpB.

PSPmod и её производные: не активный мутант по каталитическому остатку PSPmodS532A и мутант по остатку из междоменного интерфейса PSPmodE125A, обладающий повышенной активностью, были закристаллизованы в переходной конформации, которая характеризуется сближением доменов без сближения остатков каталитической триады. Ни PSP дикого типа, ни её соответствующие мутантные варианты не были закристаллизованы, что указывает на то, что модификация шарнирной области способствовала росту кристаллов.

Влияние модификации шарнирной области и спермина на конформационное состояние PSP в растворе изучали методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР). МУРР показал, что в растворе ферменты дикого типа принимают открытую конформацию, а спермин вызывает конформационный переход в переходное состояние. В то же время, в растворе PSPmod присутствовала фракция молекул в переходном состоянии даже в отсутствие спермина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-74-20154.

## 1.28. ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА РЕЦЕПТОРА RAGE ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЙ

*Плащинская Д.Д.<sup>1,2</sup>, Бершацкий Я.В.<sup>1,2</sup>, Ракитина Т.В.<sup>2</sup>, Охрименко И.С.<sup>1</sup>, Арсеньев А.С.<sup>2</sup>, Бочаров Э.В.<sup>2</sup>*

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

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
plashchinskaia.dd@phystech.edu

Рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE) участвует в передаче сигналов эндогенного стресса, действуя как паттерн-распознающий рецептор. Ключевыми лигандами RAGE являются конечные продукты гликирования (AGE), белки S100, амилоиды и HMGB1. Их взаимодействие с RAGE связано с развитием болезни Альцгеймера, диабета, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний.

RAGE - битопный мембранный белок, который состоит из внеклеточной области, трансмембранного (ТМ) домена и короткого неструктурированного цитоплазматического хвоста.

Димеризация и октамеризация рецептора, по-видимому, являются важнейшими факторами для образования активных сигнальных комплексов, состоящих из рецепторов, лигандов и адаптерных белков [1].

Разработка препаратов направленных на эффективное ингибирование RAGE опосредованных каскадов осложнена не только разнообразием его лигандов, но и недостатком структурной информации о конформационных изменениях рецептора при передаче сигнала через мембрану.

В ходе работы мы получили генетическую конструкцию, кодирующую ТМ домен RAGE с короткими примембранными фрагментами. Для его получения был разработан и оптимизирован протокол получения и очистки ТМ фрагмента RAGE в бесклеточной системе. Мы получили тотально <sup>15</sup>N- и <sup>13</sup>C-изотопно меченые образцы целевого белка в количествах, необходимых для характеристики пространственной структуры и динамики ТМ доменов. Нами были получены гетероядерные спектры ЯМР в органическом растворителе и в мембраноподобной среде, мицеллах додецилфосфохолина.

ЯМР-исследования и биотехнологические работы были поддержаны Российским научным фондом (проект № 21-74-20154 - оптимизация генетических конструкций, и проект № 20-64-46027 - получение изотопно-меченого белка и ЯМР спектроскопия).

*Литература:*

1. Yatime L., Andersen G. R. Structural insights into the oligomerization mode of the human receptor for advanced glycation end-products // FEBS J. 2013.

## 1.29. ПРИМЕНЕНИЕ БИМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ УБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ

***Рыскина А.М., Белогуров А.А., Кудряева А.А.***

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

Убиквитинирование - важный биологический процесс, задействованный почти во всех аспектах жизни клетки и регулирующий множество клеточных функций. Невероятное разнообразие функций убиквитинирования обусловлено способностью убиквитина образовывать цепи различного типа ветвления посредством изопептидных связей между  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-группой любого из семи лизинов (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) убиквитина с C-концевой карбоксильной группой последующего убиквитина. Существуют экспериментальные свидетельства, что характер связи между остатками убиквитина придает уникальные структурные и динамические свойства полиубиквитиновой цепи, позволяя разным цепям специфически взаимодействовать со своим белковым рецептором. Малый размер белка убиквитина (~8,5 кДа), а также сложный механизм образования цепей накладывает ограничение на возможные методы исследования. В данной работе нами была изучена возможность использования метода BiFC (бимолекулярная флуоресцентная комплементация, split-система) на основе белка FAST и его укороченного варианта NanoFAST для исследования образования убиквитиновых связей в живых клетках. Были созданы генетические конструкции, кодирующие фрагменты белков FAST/NanoFAST, слитные с мономерами убиквитина. При внутриклеточной сборке убиквитиновых цепей происходит разгорание флуоресцентного сигнала вследствие реконструкции функционального акцептора флуорофора. Было установлено что split-система на основе FAST дает значительно больший сигнал по сравнению с nanoFAST, а также определен оптимальный размер фрагментов белка FAST для получения максимального сигнала при внутриклеточной детекции полиубиквитиновых цепей. Таким образом можно утверждать, что данный метод является перспективным для изучения образования убиквитиновых цепей различной топологии.

Работа была поддержана проектами РНФ № 21-74-10154 и грантом Президента РФ МД-5902.2021.1.4.

### 1.30. ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ BRICHOS-АССОЦИИРОВАННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ МОРСКИХ ПОЛИХЕТ

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

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

Морские полихеты являются сравнительно малоизученным классом беспозвоночных с точки зрения открытия новых биологически активных пептидов. У беспозвоночных животных защита от патогенов осуществляется только при участии системы врожденного иммунитета, важным составляющим которой являются антимикробные пептиды (АМП). Большинство охарактеризованных АМП полихет объединяет универсальная система биосинтеза на основе так называемого BRICHOS-домена по аналогии с кателин-подобным доменом у позвоночных. BRICHOS-ассоциированные АМП синтезируются в виде белка-предшественника, состоящего из сигнального пептида, BRICHOS-домена и зрелого пептида, образование которого происходит в ходе протеолитического процессинга фурином. BRICHOS-домен был идентифицирован у ряда функционально разнородных белков позвоночных и беспозвоночных, но во всех случаях он принимает участие в биосинтезе на стадии процессинга белка-предшественника с образованием зрелой полипептидной цепи и препятствует её агрегации. Ранее в нашей лаборатории было показано, что BRICHOS-домен принимает участие в биосинтезе не только  $\beta$ -шпилечных АМП, но и  $\alpha$ -спиральных защитных пептидов полихет. В этом исследовании мы обнаружили и получили ряд новых BRICHOS-ассоциированных АМП с различной структурой: 1)  $\beta$ -шпилечные АМП из полихет *Abarenicola pacifica* и *Urechis unicinctus*; 2)  $\alpha$ -спиральные АМП из полихеты *Clymenella torquata*, стабилизированные дисульфидной связью и содержащие C-концевой мотив, так называемый Rana-box; 3) дефенсин-подобный АМП, стабилизированный 4 дисульфидными связями, из полихеты *Arenicola marina*. У всех перечисленных пептидов были исследованы антимикробная активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, гемолитическая активность в отношении свежесыважденных эритроцитов, цитотоксическая активность в отношении линии HaCaT клеток кожи человека, а также предполагаемый механизм действия в отношении бактерий. В результате работы получены селективные аналоги прототипов антибиотика на основе  $\beta$ -шпилечных АМП, показана специфическая активность АМП из *Arenicola marina* в отношении бактерий рода *Bacillus*, а также продемонстрирован широкий спектр активности АМП из полихеты *Clymenella torquata*.

Работа поддержана грантом Министерством образования и науки Российской Федерации (№ 075-15-2021-1049).

### 1.31. РЕКОМБИНАНТНАЯ МЕТАКРИЛАТРЕДУКТАЗА *GEOBACTER SULFURREDUCTENS AM-1*

Таухутдинова С.Р.<sup>1</sup>, Микулинская Г.В.<sup>2</sup>, Архипова О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН - ФИЦ ПушНЦ биологических исследований РАН, Пушкино

<sup>2</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

ms.sabina.7@mail.ru

Ферментативная метакрилатредуктазная активность была обнаружена у трех анаэробных ацетатоксилирующих бактерий: *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Deltaproteobacteria*), *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1<sup>T</sup> (класс *Deltaproteobacteria*), *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809<sup>T</sup> (класс *Deferribacteres*). Метакрилат (2-метилпропеноат) - соединение антропогенного происхождения, в природе практически не встречается, для человека токсичен, присутствует в отходах химических производств. Для *G. sulfurreducens* AM-1 показано, что метакрилатвосстанавливающая система локализована в периплазме и состоит из двух хромопротеидов: 1) собственно метакрилатредуктазы Mrd (50 кДа) желтого цвета из-за присутствия нековалентно связанного ФАД в качестве кофермента, и 2) мультигемового цитохрома с Msc (30 кДа) красного цвета из-за наличия гемов с в качестве протетической группы. Целью работы было получение рекомбинантной метакрилатредуктазы RMrd из клеток аэробно растущей *E. coli* и изучение её свойств.

Кодирующая последовательность mrd была клонирована в модифицированный плазмидный вектор pQE30, лишенный His-taq. Экспрессия гена в штамме *E. coli* M15, содержащем плазмиду pREP4, индуцированная ИПТГ, привела к получению растворимого целевого продукта. Белок RMrd был очищен до электрофоретически гомогенного состояния с применением фракционирования сульфатом аммония и адсорбционной хроматографии на гидроксипатите. Кроме того, был получен электрофоретически чистый препарат Msc. Рекомбинантный фермент обладает ферментативной активностью: как и природный Mrd, восстанавливает метакрилат в присутствии Msc. У рекомбинантного фермента были изучены молекулярные свойства и кинетические характеристики, включая субстратную специфичность.

Таким образом, в представляемой работе показана возможность получения рекомбинантного фермента из анаэробного организма в аэробных условиях. Причем, этот фермент активен и может представлять интерес для биотехнологии очистки окружающей среды от отходов метакрилатных производств.

### 1.32. ИЗУЧЕНИЕ ПЕПТИДА НОВОГО СТРУКТУРНОГО КЛАССА ИЗ ЯДА МОРСКОЙ АНЕМОНЫ, МОДУЛИРУЮЩЕГО РАБОТУ КИСЛОТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИОННОГО КАНАЛА 1a ТИПА

Хасанов Т.А.<sup>1,2</sup>, Осмаков Д.И.<sup>1,3</sup>, Андреев Я.А.<sup>1,3</sup>, Козлов С.А.<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва  
Khasanov17@yandex.ru

Кислоточувствительные ионные каналы (ASIC каналы) относятся к надсемейству амилорид-чувствительных дегенерин/эпителиальных Na<sup>+</sup>-каналов. В организме млекопитающих обнаружено по меньшей мере 6 изоформ, и одна из них, ASIC1a, широко представлена как в центральной, так и в периферической нервной системе. ASIC1a каналы участвуют в различных процессах организма, в том числе и патологических, таких как: ацидоз, ишемия, воспаление. Яды животных являются богатым источником различных лигандов ионных каналов. Так, из яда морской анемоны *Metridium senile* был выделен и изучен новый пептидный модулятор ASIC1a каналов. Пептид, названный MS54, был получен в результате трехстадийного разделения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с последующим электрофизиологическим испытанием, проводившимся после каждой стадии разделения на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих ASIC1a каналы. Была установлена первичная структура пептида, для которой не было найдено гомологов среди других пептидных молекул. Для более масштабных исследований была отработана схема получения рекомбинантного аналога пептида. Исследования механизма действия MS54 показали, что пептид является потенциатором, в наномолярных концентрациях связывающимся с каналом в его закрытом состоянии. Исследования дозозависимости показали, что полумаксимальная эффективная концентрация пептида EC<sub>50</sub> равна 183,9 нМ (коэффициент Хилла n=0,51). Таким образом, был найден новый модулятор ASIC1a каналов, который не только открывает новую группу пептидных лигандов, но и служит перспективным инструментом для изучения этой группы каналов.

## СЕКЦИЯ 2

### СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

#### 2.1. ЭКСПРЕССИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫСОКОКОНСЕРВАТИВНОГО ГЕНА *Dras1*

Сивопляс Е.А.<sup>1,2</sup>, Зимарева Д.А.<sup>1</sup>, Белкина Е.Г.<sup>2</sup>, Лазебный О.Е.<sup>2</sup>,  
Куликов А.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский педагогический государственный университет, Москва

<sup>2</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

sivoplyas-ekater@mail.ru

Высококсервативный ген дрозофил *Dras1* имеет нуклеотидную последовательность, которая мало изменчива у различных таксонов от дрожжей до млекопитающих. Продукт этого гена - белок - важный участник ферментативной реакции, участвующей в делении, который передает сигнал от рецепторов к фосфотрансферазам. Синтез данного белка осуществляется в течение всей жизни у эукариот, а степень экспрессии зависит от регулирующих механизмов. Ошибки в последовательности таких генов при делении клетки, приводят к канцерогенезу.

Нами была проанализирована экспрессионная активность гена *Dras1* на модельных объектах *D.melanogaster* и *D.virilis*, для которых были известны данные полногеномного анализа, которые не дают представлений об особенностях регуляции. Показано увеличение экспрессионной активности гена *Dras1* в личинках стадии L3 и извлеченных из них имагинальных глазных дисках по сравнению со взрослыми особями.

Одними из регуляторов экспрессии генов являются микроРНК, сайты связывания с которыми в 3'-нетранслируемой области были обнаружены для гена *Dras1* с помощью биоинформационного анализа. В дальнейшем были получены три линии дрозофил с гиперэкспрессией нескольких разновидностей микроРНК (miR-312, miR-313 и miR-92a), из которых были выделены имагинальные глазные диски на личиночной стадии L3. Для подтверждения связывания микроРНК с мРНК мы использовали репортерный ген флюоресцирующего белка GFP под промотором Gal4. На конфокальном микроскопе была показана различная степень свечения у контрольной линии по сравнению с экспериментальными, несущими сайты связывания с микроРНК. Белковый анализ проводился методом вестерн-блот с использованием антител для флюоресцирующего белка GFP. Показано, что экспрессионная активность гена *Dras1* различается в зависимости от стадии развития и регулируется с помощью микроРНК.

Данная работа поддержана грантом РФФИ №16-34-00840 мол\_a.

## 2.2. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОВ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *BEAUVERIA BASSIANA*, ВЛИЯЮЩИХ НА ЕГО СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Чемезова А.А.<sup>1,2</sup>, Майкова О.О.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>МАОУ ДО г. Иркутска "Дворец творчества", Иркутск

<sup>2</sup>МБОУ г. Иркутска СОШ №24, Иркутск

<sup>3</sup>Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

chemezova\_2006@mail.ru

Среди природных ресурсов снижения численности насекомых-фитофагов, повреждающих хвойные леса, особого внимания заслуживают энтомопатогенные грибы вида *Beauveria bassiana*. Грибы обитают в телах насекомых, в почве, на растениях. Периодически эти энтомопатогенные грибы вызывают вспышки массовых заболеваний насекомых (пандемии), что приводит к резкому снижению их численности. *Beauveria bassiana* поражает широкий круг чешуекрылых, жесткокрылых, полужесткокрылых, прямокрылых и перепончатокрылых насекомых.

На первом этапе была проведена морфологическая и молекулярно-генетическая идентификация энтомопатогенного гриба. Для проведения морфологического определения вида энтомопатогенного гриба была получена чистая культура. С помощью определителя энтомопатогенных грибов произвели определение как *Beauveria bassiana*. Далее из чистой культуры гриба выделили ДНК, провели ПЦР и секвенирование фрагмента гена *18S* рДНК и *EF-1 $\alpha$*  рДНК. С помощью программы *BioEdit* визуализировали данные и провели поиск в базе данных GenBank используя *Nucleotide BLAST*, в результате чего показали наибольшую гомологию (100%) с видом *Beauveria bassiana*.

Так как *Beauveria bassiana* поражает большой круг вредителей, решили изучить гены, ответственные за специфичность к определенному кругу хозяев. Теоретическое изучение позволило выявить следующие основные гены: *hyd1* (пониженная вирулентность); *hyd2* (снижение приверженности хоста); *Bbhog1* (снижение вирулентности, урожайности конидий, приверженности хозяину, аппрессорий и стрессоустойчивости); *Bbmpk1* (отсутствие аппрессорий, уменьшение повреждения кутикулы, прилипание к хозяину и конидиация).

Вывод. Теоретическое исследование позволило сократить количество основных генов до 4, при этом гены *Bbhog1* и *Bbmpk1* оказались ответственны за несколько признаков, что требует особого внимания при планировании эксперимента и обработке результатов.

## СЕКЦИЯ 3

### СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ, УГЛЕВОДОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

#### 3.1. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СИНТЕЗУ ПРОИЗВОДНЫХ L-ТРИПТОФАНА ПО C2-АТОМУ ИНДОЛЬНОГО ЦИКЛА

Вавилов М.В.<sup>1</sup>, Петушков В.Н.<sup>2</sup>, Царькова А.С.<sup>1</sup>, Осипова З.М.<sup>1</sup>, Родионова Н.С.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биофизики СО РАН - ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск  
vavmat1996@gmail.com

Биолюминесценция характерна для представителей почти всех царств живой природы, в том числе для кольчатых червей. В последние годы активно изучается механизм свечения почвенных энхитреид *Henlea sp.*, впервые обнаруженных в восточной Сибири в начале XX века. В предыдущих работах нами было показано [1], что в реакции биолюминесценции *Henlea sp.* участвует четыре основных компонента: низкомолекулярный люциферин неизвестной структуры, фермент люцифераза, кислород и ионы кальция. Однако недавно в биомассе *Henlea sp.* был обнаружен ряд неактивных структурных аналогов люциферина, которые мы назвали Peaks 300 в соответствии с максимумами УФ-спектров поглощения [2]. Согласно данным ЯМР-спектроскопии, Peaks 300 содержат фрагмент (S)-3-(2-амино-2-карбоксивтирил)-1H-индол-2-карбоновой кислоты. С целью однозначного подтверждения структуры Peaks 300 методом встречного синтеза в рамках данной работы была поставлена задача разработки методов получения C2-замещенных производных триптофана.

В литературе не описаны методы прямой функционализации C-2 положения с получением карбоксил-замещенных производных L-триптофана. Очевидным недостатком распространенного ахирального подхода к синтезу триптофан-2-карбоновой кислоты, включающего в себя катализируемую переходными металлами конденсацию *ortho*-виниланилинов с замещенными алкинами [3], является невозможность получить энантиомерно чистый продукт. Вместе с тем, обширно представлены методы получения триптофан-2-карбальдегида [4]. Мы предположили, что данная молекула может выдержать окисление до карбоновой кислоты. В результате был разработан четырехстадийный синтез целевого производного из трет-бутил-L-триптофана и формальдегида. В дальнейшем полученная кислота может быть использована для разработки методов синтеза соединений Peaks 300.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-04-00348-а.

*Литература:*

1. Петушков В.Н., Родионова Н.С., ДАН, 2018, 481(4), 451-45
2. Dubinnyi M.A. et al., ChemistrySelect 2020, 5, 13155- 13159
3. Tao Shen et al., Chinese journal of chemistry, 2018, 36 (9), 815-818.
4. Gatta F., Misiti D., Journal of Heterocyclic Chemistry, 1987, 24(4), 1183-1187.

### 3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАТЕРАЛЬНОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН ДОФХ/ДОФС ПО ДАННЫМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Веретененко И.И.<sup>1,2</sup>, Трофимов Ю.А.<sup>1,3</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1,2,4</sup>

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

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

<sup>3</sup>НИЯУ МИФИ, Москва

<sup>4</sup>НИУ Высшая школа экономики, Москва

veretenenko.ii@phystech.edu

Физико-химические характеристики биологических мембран во многом определяются их липидным составом. Известно, что фосфолипиды образуют в плоскости мембраны скопления - кластеры, приводящие к гетерогенности свойств бислоя. В данной работе с помощью молекулярно-динамического моделирования исследовали кластеризацию липидов в двухкомпонентных мембранах с различным соотношением диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) и диолеилфосфатидилсерина (ДОФС).

В настоящее время не существует единого подхода к определению параметров кластеризации липидов в бислое. В данной работе предложен метод, основанный на оценке локальной поверхностной плотности бислоя в окрестности полярных головок липидов: липид называли "кластеризованным", если плотность атомов других липидов вокруг центра масс его головки превышала среднюю плотность системы.

Для изучения динамических свойств липидов модельные системы сравнивались по следующим характеристикам: средняя плотность системы, коэффициент диффузии липидов в плоскости монослоя и время жизни кластеризованного состояния. С увеличением доли ДОФС средняя поверхностная плотность системы росла от  $0.287 \pm 0.004$  атомов/Å<sup>2</sup> для однокомпонентного ДОФХ до  $0.305 \pm 0.004$  атомов/Å<sup>2</sup> для ДОФС. Кластеризованные липиды двигались медленнее некластеризованных: соответствующие коэффициенты диффузии уменьшались с увеличением доли ДОФС в диапазоне 17-10 мкм<sup>2</sup>/с и 25-17 мкм<sup>2</sup>/с. Времена жизни кластеризованного состояния, рассчитанные с помощью корреляционной функции, увеличивались с концентрацией ДОФС в диапазоне 1.4-3.9 нс для липидов ДОФХ и 3.3-9.1 нс - для ДОФС.

Различия в свойствах рассмотренных систем могут быть объяснены тем, что, благодаря наличию дополнительных донорной аминокислоты и акцепторной карбоксильной группы, ДОФС может образовывать больше водородных связей различных типов: липид-липид и липид-вода-липид (т.н. "водные мостики"), что с ростом концентрации ДОФС приводит к образованию более плотного и менее динамичного бислоя.

Работа поддержана грантом РФФИ №18-14-00375.

### 3.3. ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСПОРТА ГЛИКОЛИПИДОВ МЕЖДУ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ И БАКТЕРИЯМИ

*Комарова В.А., Хайдуков С.В., Рыжов И.М., Попова И.С., Бовин Н.В., Рапопорт Е.М.*

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

Литературные данные указывают на то, что гликолипиды, высвобождающиеся из клетки, могут встраиваться в другие клетки или бактерии. В результате - по липидному составу мембрана клеток (или бактерий)-акцепторов приобретает некоторые черты мембраны клетки-донора. Такое маскирование под "свое" может привести к тому, что клетки (бактерии)-реципиенты не будут узнаваться эффекторами врожденного и приобретенного иммунитета, а значит в случае переноса гликолипидов на бактерии способствовать распространению инфекции. Механизм переноса гликолипидов с клетки на бактерии изучен недостаточно. Считается, что в этом процессе принимают участие белки плазмы крови или внеклеточные везикулы. Целью данного исследования было изучение переноса гликолипидных молекул с клеток на бактерии в присутствии альбумина, или с помощью микровезикул. Для исследования использовали синтетический аналог природного гликолипида, содержащий А-тетрасахарид ( $\text{GalNAc}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta$ ), под названием FSL-A (functional spacer lipid). Благодаря наличию остатка DOPE (1,2-О-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина) он сохраняет способность природных гликолипидов встраиваться в мембрану клетки. Эксперименты проводились в статических условиях и в потоке. Для этого бактерии просто контактировали с монослоем клеток со встроенным FSL-A (статические условия), или их пропускали через проточные слайды, в которых в виде монослоя находились клетки со встроенным FSL-A. Показано, что 1) перенос FSL-A на бактерии происходил только в потоке, с увеличением скорости потока количество перенесенного в бактерии гликолипида увеличивалось; 2) в присутствии сывороточного альбумина наблюдалось увеличение переноса FSL-A на бактерии. Чтобы понять, происходит ли перенос FSL-A с помощью микровезикул, их выделяли из супернатанта клеток со встроенным FSL-A и инкубировали с бактериями при разных скоростях потока. Перенос FSL-A происходил в виде микровезикул.

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

### 3.4. ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОФОБНЫХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ

*Костюк К.А.<sup>1</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1,2</sup>*

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

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
2601074@gmail.com

Распределение гидрофобных свойств на поверхности липидного бислоя обладает локальной гетерогенностью, формирующей т.н. "мозаичную картину". Мембраны различного состава имеют характерные паттерны такой мозаичности, и их изменение может привести к изменению структуры и функции важных сигнальных белков. Однако молекулярные механизмы этих явлений до конца неизвестны, и их изучение - актуальная проблема, так как трансмембранные белки часто становятся мишенями для таргетной терапии рака и других значимых патологий.

В настоящей работе для определения влияния холестерина (ХС) на гетерогенность гидрофобных свойств мембранной поверхности использовали метод молекулярной динамики (МД). При условии надёжной калибровки МД дополняет экспериментальные методы и позволяет получить важную информацию о процессах, происходящих в молекулярных масштабах. В связи с этим, основными задачами являлись валидация протокола МД на основании имеющихся в литературе экспериментальных данных и анализ гетерогенности гидрофобных свойств поверхности мембран с различным содержанием ХС.

Экспериментальных данных по влиянию ХС на мембраны сравнительно мало, наиболее изучены бислои из дипальмитоилфосфатидилхолина (ДМФХ), поэтому их выбрали для калибровки протокола МД. В дальнейшем методом МД изучали влияние ХС на свойства бислоя из пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (ПОФХ), имитирующего эукариотические мембраны. С целью валидации получаемых результатов проведён сравнительный анализ параметров геометрической упаковки липидов в бислое и параметров порядка ацильных цепей в системах ПОФХ-ХС и ДМФХ-ХС при различной концентрации холестерина. На основании результатов анализа водородных связей, плотности липидов и геометрических параметров систем охарактеризовали вертикальное и латеральное распределения ХС, которые согласуются с экспериментальными данными. На равновесных участках траекторий МД проанализировали гетерогенность гидрофобных свойств поверхности мембран и влияние на неё молекул ХС.

Полученные результаты позволят пролить свет на механизмы модулирования активности трансмембранных белков (в частности, РТК) путём воздействия на их мембранное окружение и на роль холестерина в этом процессе.

Работа поддержана грантом РФФИ №18-14-00375.

### 3.5. СИНТЕЗ ГЛИКОКЛАСТЕРОВ, ВКЛЮЧАЮЩИХ НЕСКОЛЬКО ОСТАТКОВ ТЕТРАСАХАРИДА А (ТИП 2), И НЕОГЛИКОЛИПИДОВ НА ИХ ОСНОВЕ

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

<sup>1</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

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

FSL-конструкциями называют молекулы, состоящие из функциональной части (F), спейсера (S) и липида (L). Такие конструкции могут встраиваться в мембрану живых клеток, не нарушая их жизнедеятельность, и придавать им свойства, заданные функциональной частью (гликаном, пептидом и т.д.). Нами был синтезирован ряд FSL-конструктов, в которых роль функциональной части выполняют гликокластеры, состоящие из олигомера аспарагиновой кислоты и нескольких фрагментов тетрасахарида А (тип 2) (Рис. 1). Далее мы планируем изучить связывание полученных неогликолипидов с анти-А антителами. Также мы предполагаем, что такие неогликолипиды могут способствовать формированию липидных рафтов за счет большого размера и поперечного сечения полярной части.

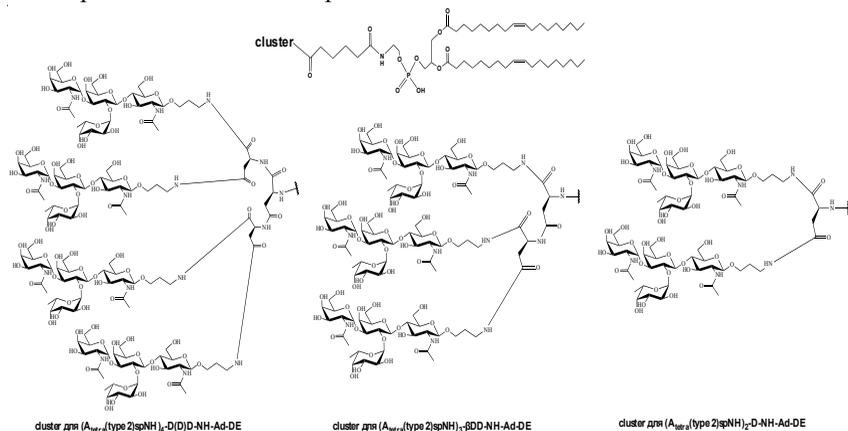


Рис. 1

Для получения кластеров 3-аминопропил гликозид тетрасахарида А (тип 2) конденсировали с соответствующим олигомером аспарагиновой кислоты с защищенной аминогруппой. Далее аминогруппу деблокировали, а полученные гликокластеры вводили в реакцию с активированным эфиром DE-Ad-ONSu, (Ad - остаток адипиновой кислоты, а DE - диолеилфосфатидилэтаноламин). Целевые неогликолипиды выделяли методами гель-фильтрации и колоночной хроматографии на силикагеле.

### 3.6. СИНТЕЗ ГЕПТАСАХАРИДА А (ТИП 3) - СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА ПОДГРУППЫ КРОВИ A<sub>1</sub>

*Савченко М.С., Рыжов И.М., Саблина М.А., Попова И.С., Тыртыш Т.В., Бовин Н.В.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
sms21297@gmail.com

Гептасахарид А (тип 3) **1** (Рис. 1) является антигеном группы крови А системы АВ0 и по некоторым данным обнаруживается только на эритроцитах подгруппы крови А<sub>1</sub>. Для проверки гипотезы о селективной экспрессии на А<sub>1</sub>-эритроцитах этот гликан необходим в индивидуальном виде. Целью нашей работы был химический синтез гептасахарид А (тип 3) **1**.

Целевой гептасахарид состоит из двух последовательных А-трисахаридных блоков, соединенных с остатком N-ацетилглюкозамина. Его синтез осуществляли из соответствующих блоков **2**, **3** и **4** (Рис. 1).

Синтез начинали с гликозилрования А-трисахаридным гликозил-донором **2** А-трисахаридного гликозил-акцептора **3**, а полученный гексасахарид превращали в соответствующий трихлорацетимидат. Ключевой стадией синтеза являлось гликозилрование полученным трихлорацетимидатом гликозил-акцептора **4**. Несмотря на неожиданно низкую β-стереоселективность гликозилрования, требуемый β-аномер был выделен в полностью ацетилированной форме методом ВЭЖХ. Удаление защитных групп привело к целевому аминопропил-гликозиду гептасахарид А (тип 3) **1**.

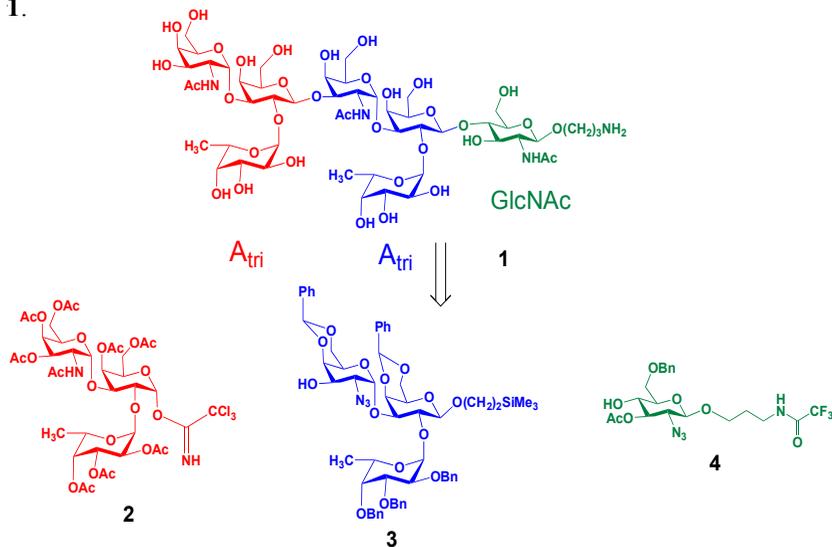


Рис. 1. Целевой гликан **1** и ретросинтетический анализ.

### 3.7. СИНТЕЗ АНАЛОГОВ ЛЮЦИФЕРИНА ВЫСШИХ ГРИБОВ С УВЕЛИЧЕННОЙ СОПРЯЖЕННОЙ СИСТЕМОЙ И ДОНОРНЫМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ

*Сильвестрова А.А.<sup>1</sup>, Андрианова А.А.<sup>2</sup>, Мышкина Н.М.<sup>3</sup>, Осипова З.М.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>НИУ Высшая школа экономики, Москва

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

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и

Ю.А.Овчинникова РАН, Москва

silvestranna200288@gmail.com

Биолюминесценция - это процесс испускания света живыми организмами в результате окисления низкомолекулярного вещества люциферина под действием фермента - люциферазы.

Ранее в нашей лаборатории был изучен механизм свечения высших грибов. Показано, что люциферинотом является 3-гидроксииспидин, максимум люминесценции которого находится в области 538 нм, а модификация исходного субстрата путем увеличения сопряженной системы и введения донорных заместителей приводит к батохромному сдвигу максимума люминесценции. Однако разработанные ранее функциональные аналоги люциферина обладают низкой растворимостью в водных растворах, что ограничивает их применение в биоимиджинге *in vivo*. В связи с этим, в рамках данной работы была решена задача по синтезу новых аналогов люциферина, содержащих увеличенную сопряженную систему и с циклическими вторичными аминами в качестве электронно-донорных заместителей, и изучению их спектральных характеристик.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и ЧНФ в рамках научного проекта № 20-54-26009.

*Литература:*

1. Kaskova Z.M., Dörr F.A., Petushkov V.N., Purtov K.V., Tsarkova A.S., Rodionova N.S., Yampolsky I.V. (2017). Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Science Advances*, 3(4), e1602847.
2. Saito-Moriya R., Nakayama J., Kamiya G., Kitada N., Obata R., Maki S.A. & Aoyama H. (2021). How to Select Firefly Luciferin Analogues for In Vivo Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1848.

### 3.8. МИКРОВЕЗИКУЛЯРНЫЙ ТРАНСПОРТ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЛИКОЛИПИДОВ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ЛИПИДНЫМ ФРАГМЕНТОМ

*Сливка Е.В., Образцова Е.А., Хайдуков С.В., Тузиков А.Б., Бовин Н.В., Рапопорт Е.М.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
slivkaekaterina6@gmail.com

Плазматическая мембрана на 20% состоит из гликофинголипидов (ГСЛ), которые вовлечены в межклеточную адгезию и передачу клеточных сигналов. Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что ГСЛ способны переходить с клетки на клетку. По литературным данным, перенос ГСЛ с клетки на клетку происходит с помощью белков плазмы крови (альбумина, или липопротеинов), или внеклеточных везикул (экзосом и микровезикул). Целью данного исследования было: изучить микровезикулярный транспорт гликолипидов, отличающихся структурой гидрофобного фрагмента.

В нашей работе использовались биотинилированные синтетические конструкторы FSL (Function-Spacer-Lipid), содержащие карбоксиметилглицильный спейсер (CMG) и липидный остаток в трех вариантах: DOPE (1,2-*O*-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин), холестерин (Chol), или церамид (Cer). FSL синтезированы в лаборатории углеводов ИБХ РАН, они сохраняют способность природных липидов встраиваться в мембрану клетки.

Было показано что: 1) выход Cer- и DOPE-конструкторов из клеток происходит быстрее, чем холестеринового; 2) выход всех трех конструкторов, независимо от природы гидрофобного остатка, происходит в виде микровезикул (МВ), наибольшее количество МВ, в которые встроился FSL, наблюдалось в случае холестеринового. Для последнего, кроме того, наблюдалось максимальное время жизни в составе МВ. 3) размер МВ составляет  $127 \pm 25$  нм; 4) встраивание конструкторов в МВ происходит в течение 20-40 мин. 5) МВ локализуются в зоне плазматической мембраны и частично в интерфайсе между ней и гликокаликсом, в виде патчей размером 0,3 мкм.

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

### 3.9. ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МЕМБРАНОТРОПНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ФЕНОЛОВ

Сохранева В.А.<sup>1</sup>, Юсупова Д.А.<sup>1</sup>, Грамматикова Н.Э.<sup>2</sup>, Дерябина Ю.И.<sup>3</sup>, Гроза Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РТУ МИРЭА - Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

<sup>3</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН - Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва  
grozanv@gmail.

Разработка методов получения препаратов на основе замещенных фенолов, обладающих высокой антиоксидантной и антибактериальной активностью, представляет значительный интерес для биомедицины и фармакологии. Для улучшения мембранотропных характеристик и снижения токсичности природных фенольных соединений были получены сложноэфирные производные замещенных фенолов с ненасыщенными жирными кислотами - компонентами липидов.

Целью данной работы была первичная оценка антимикробной активности сложных эфиров олеиновой и линолевой кислот с 2-изопропил-5-метилфенолом (тимолом).

Было проведено исследование по подбору концентраций, ингибирующих рост *Endomyces (Dypodascus) magnusii*, для исходных соединений (жирных кислот и тимола) и полученных сложных эфиров олеиновой и линолевой кислот с тимолом (2-изопропил-5-метилфенолом). Было установлено, что полученные конъюгаты действуют на дрожжи в концентрации, в 100 раз превосходящей концентрацию референсного антигрибкового препарата - клотримазола.

Также были проведены исследования минимальной, подавляющей рост, концентрации диффузионным методом и методом двукратных серийных разведений на тест-культурах *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *B. cereus* ATCC 10702, *C. albicans* ATCC 10231, *A. niger* 37a. Полученные субстанции не показали активности ни к одному из тест-штаммов (МПК больше 5000 мкг/мл). Такие результаты отчасти могут быть связаны с низкой биодоступностью полученных гидрофобных молекул, а также с методикой внесения препаратов в культуру.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0706-2020-0019).

### 3.10. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОНСТРУКТОВ biot-CMG(2)-Ad-DOPE И biot-CMG(2)-Av-Chole МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ С КОНТРАСТИРОВАНИЕМ

Шестопалова М.С.<sup>1,2</sup>, Залыгин А.В.<sup>1,2</sup>, Штыкова Э.В.<sup>3</sup>, Бовин Н.В.<sup>1</sup>, Олейников В.А.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>НИЯУ МИФИ, Москва

<sup>3</sup>ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва

shestopalova.milena@gmail.com

Метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) позволяет исследовать структуру и свойства различных, в том числе и биологических, наноразмерных объектов в их нативной среде. Из экспериментальных кривых МУРР можно получить информацию о размере и форме частиц, а также об их внутренней структуре. Метод контрастирования МУРР, основанный на изменении электронной плотности буфера путём добавления в него глюкозы в разной концентрации, позволяет выделить наиболее электронно-плотные части мицеллы. Контраст определяется разностью электронной плотности частицы ( $\rho$ ) и средней электронной плотности растворителя ( $\rho_s$ ), в котором находится частица  $\Delta\rho = \rho - \rho_s$ .

В настоящее время одними из наиболее перспективных частиц для разработки целевых систем доставки лекарств являются биосовместимые мицеллоподобные структуры, склонные к самосборке. В данной работе сравниваются два конструкта на основе биотина: biot-CMG(2)-Ad-DOPE (биотин-олигопептид-липид) и biot-CMG(2)-Av-Chole (биотин-олигопептид-холестерол). Такие конструкты способны биотинилировать поверхности. В жидкой среде, благодаря амфифильным свойствам молекул, оба конструкта образуют мицеллоподобные частицы.

Экспериментальные данные были получены для обоих конструктов в фосфатном буфере (PBS) и в PBS с содержанием глюкозы в % массовой концентраций от 9 до 33%. По полученным экспериментальным кривым были восстановлены 3D-модели распределения электронной плотности для каждого образца. Диаметр частиц составил 12 нм и 11 нм соответственно. В центре частицы из biot-CMG(2)-Ad-DOPE формируется область, содержащая липидные части конструкта, где электронная плотность ниже, электронной плотности растворителя и, поэтому, выглядящая как полость. Увеличение электронной плотности растворителя добавлением глюкозы, приводит к тому, что "полость" визуальнo увеличивается. Сопоставление изменения электронной плотности растворителя с формой и размером "полости", позволяет оценить распределение электронной плотности по объему частицы. В результате, выявлены наиболее электронно-плотные участки частиц на их поверхности. Оба конструкта формируют сходную структуру, отличающуюся лишь размерами гидрофобного ядра. Варьирование липидной части конструктов позволяет изменять размеры частиц, при сохранении их поверхностных свойств и формы.

## СЕКЦИЯ 4

# ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

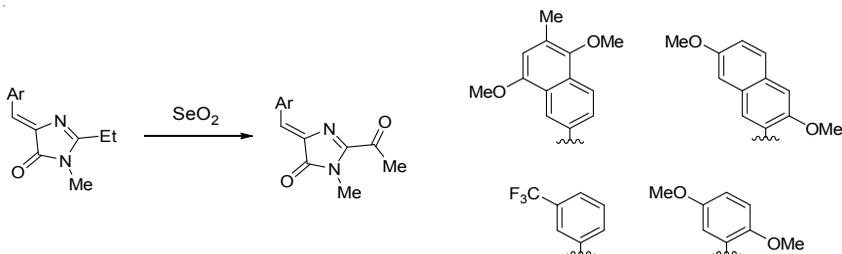
### 4.1. ФЛУОРОГЕННЫЕ КРАСИТЕЛИ НА ОСНОВЕ КЕТОПРОИЗВОДНЫХ ХРОМОФОРА БЕЛКА GFP

Балева Н.С., Баранов М.С.

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

Синтетические производные хромофоров флуоресцентных белков являются перспективной основой для создания флуорогенных красителей - соединений, для которых характерно многократное усиление флуоресцентного сигнала при связывании с целевым объектом. Проведенные нами исследования показывают, что аналоги хромофора GFP с акцепторными заместителями в *para*-положении или донорными группами в *meta*-положении бензилидена часто проявляют флуорогенные свойства. Интенсивность флуоресценции этих соединений сильно варьируется в зависимости от свойств растворителя. Ранее нами был синтезирован ряд подобных бензилиденимидазолонов, содержащих дополнительные кратные связи. Такие вещества характеризовались длинноволновыми максимумами поглощения и испускания. Некоторые из них были успешно применены как флуорогенные красители для окрашивания отдельных клеточных органелл.

В настоящей работе мы использовали другой тип модификации, которая может привести к смещению поглощения и испускания в длинноволновую область, и синтезировали соединения, содержащие кетогруппу.



Изучение оптических свойств полученных соединений показало, что введение кетогруппы в структуру приводит к батохромному смещению максимумов абсорбции и эмиссии на 50-100 нм. Также было установлено, что окисление приводит к снижению квантового выхода флуоресценции. Однако, несмотря на это некоторые кетопроизводные, также как их исходные бензилиденимидазолы, проявляют флуорогенные свойства, и интенсивность флуоресценции сильно зависит от свойств растворителей, что говорит о перспективности их использования в роли флуорогенных красителей для окрашивания живых объектов во флуоресцентной микроскопии.

## 4.2. УСТАНОВЛЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ РАВНОВЕСИЙ ЛИДОКАИНА ПРИ СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРАХ СОСТОЯНИЯ CO<sub>2</sub>

***Белов К.В., Дышин А.А., Киселев М.Г., Крестьянинов М.А., Ходов И.А.***

Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Иваново  
iakh@isc-ras.ru

В создании и модификации лекарственных препаратов все больший интерес представляет использование сверхкритических флюидных технологий. В качестве растворителя, для данных процессов, чаще всего используют сверхкритический диоксид углерода (скCO<sub>2</sub>) из-за мягких параметров критической точки (31°C, 7.3МПа). Кроме того, CO<sub>2</sub> легко удалить методом простой декомпрессии системы [1]. Недавние исследования в среде скCO<sub>2</sub> показали взаимосвязь между преобладающими конформациями молекул лекарственных соединений в растворе с конформационно определяемым полиморфизмом [2]. В связи с этим вопрос определения пространственной структуры лекарственных соединений в сверхкритическом диоксиде углерода является актуальным.

В рамках доклада будет представлен подход к определению пространственной структуры и долей конформеров на примере лидокаина в среде скCO<sub>2</sub> методом спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY) [3]. При проведении экспериментов ЯМР в среде сверхкритического флюида была использована ранее спроектированная и запатентованная ячейка с возможностью контроля температуры и давления в режиме реального времени [4].

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (контракты № 01201260481 и № 0120095082), Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-06008 № 20-43-370011) и Совета по грантам Президента Российской Федерации (проект МК-662.2021.1.3).

Эксперимент по ЯМР-спектроскопии был проведен на уникальной научной установке (<http://www.ckp-rf.ru/usu/503933/>) Института химии растворов им. Г.А. Крестова РАН.

*Литература:*

1. X. Zhang, S. Heinonen, E. Levonen, RSC Adv., 2014, 4, 61137-61152.
2. Oparin, R.D., Kurskaya, M.V., Krestyaninov, M.A., Idrissi, A., Kiselev, M.G., European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 146, art. no. 105273.
3. Khodov, I.A., Dyshin, A.A., Efimov, S.V., Ivlev, D.V., Kiselev, M.G., Journal of Molecular Liquids, 2020, 309, art. no. 113113.
4. Пат. 2020125848 Рос. Федерация: МПК G01N 24/08.

### 4.3. ХИМИЧЕСКОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ НОВОГО АЗОЛОАЗИНИЕВОГО КРАСИТЕЛЯ В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

*Бучельникова В.А.<sup>1</sup>, Шупова Е.В.<sup>1</sup>, Папонов Б.В.<sup>2</sup>, Бучельников А.С.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Севастопольский государственный университет, Севастополь

<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

viktoriya\_salo@mail.ru

Объектом исследования в настоящей работе были конденсированные гетероциклические системы, содержащие узловой кватернизованный атом азота и 4-диметиламиностирильную боковую цепь и обобщенно называемые в литературе солями *azonia*, или азолоазиниевыми солями. Соли азолопиримидиния, содержащие узловой кватернизованный атом азота и 4-диметиламиностирильную боковую цепь в шестичленном фрагменте молекулы, по нашему мнению, интересны как с точки зрения простоты синтеза и большего структурного разнообразия за счет варьирования азольной компоненты азолопиримидиниевого ядра, так и с точки зрения создания дополнительных центров связывания с макромолекулой ДНК за счет гетероатомов и экзозаместителей азольного фрагмента.

Нами синтезирован перхлорат 5-(4-(диметиламино)стирил)-7-метил-[1,3,4]тиадиазоло[3,2-*a*]пиримидин-4-ия - порошок коричневого цвета, дающий в воде раствор фиолетовой окраски. В эксперименте на клетках буккального эпителия человека было показано, что при добавлении в клеточную суспензию цвет раствора изменялся на желтый. По-видимому, изменение окраски суспензии связано с раскрытием пятичленного цикла и получением *N,N*-диметил-4-(2-(6-метил-2-тиоцианато-пиримидин-4-ил)винил)анилина. Это превращение аналогично превращению тетразолиевой соли в формазан в колориметрическом МТТ-тесте, широко применяемом при анализе метаболической активности клеток, с той поправкой, что изменение цвета происходит в противоположном направлении.

Была предложена гипотеза, согласно которой изменение окраски происходит благодаря связыванию молекулы красителя с ядерной или митохондриальной ДНК. Ее подтверждение будет означать, что подход к оценке состояния хроматина клеток буккального эпителия человека, применяемый в медико-биологических исследованиях веществ-кандидатов в лекарственные препараты и основанный на подсчете количества гранул гетерохроматина в ядре клетки, приобретает четкое обоснование: процесс гетерохроматизации является следствием связывания хроматина с молекулой исследуемого вещества.

Работа выполнена при финансовой поддержке Севастопольского государственного университета (грант № 44/06-31).

#### 4.4. ЗАВИСИМОСТЬ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA* ОТ ОЛИГОМЕРНОГО СОСТАВА

Ваничкин Д.А., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
daymon\_way@mail.ru

L-Аспарагиназы активно используются при лечении острого лимфобластного лейкоза, а также при лечении ряда других опухолевых заболеваний. В то же время резерв повышения терапевтической эффективности L-аспарагиназ далеко не исчерпан. Исследования молекулярных деталей действия L-аспарагиназных препаратов помимо фундаментальной значимости, позволит повысить терапевтическую эффективность применяемых в медицинской практике ферментов, и снизить риск развития побочных эффектов. Один из наименее изученных вопросов касается четвертичной структуры L-аспарагиназы в растворе при физиологических условиях. Представление об олигомерной структуре L-аспарагиназы сформировано на основе данных кристаллографических исследований фермента, которые показали участие двух субъединиц в образовании каталитического центра фермента. Это означает, что димер L-аспарагиназы мог бы обладать каталитической активностью.

В представленной работе исследовано влияние олигомерного состава L-аспарагиназы на каталитическую активность фермента. Для этого применен подход, основанный на солюбилизации фермента в системе обращенных мицелл ПАВ. За счет варьирования степени гидратации внутренней полости мицелл, метод позволяет получать требуемые олигомерные формы фермента и изучить независимо их кинетические и структурные параметры. В рамках нашей работы на основе спектральных методов мы разработали метод определения активности различных олигомерных форм фермента в системе обращенных мицелл ПАВ, были определены каталитические параметры для каждой из форм.

В системе обращенных мицелл на основе АОТ в октано регистрировали изменение интенсивности пиков в ИК-спектре в процессе ферментативной реакции гидролиза L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты. Анализируя полученные ИК-спектры определили каталитическую активность для степеней гидратации мицелл от 20 до 40, которые теоретически должны соответствовать функционированию димерной и тетрамерной формы фермента. Также были исследованы с помощью УФ-спектроскопии и Флуоресцентной спектроскопии. Обнаружено, что в мицеллярной системе L-аспарагиназа способна функционировать как в тетрамерной, так и в димерной форме. Активность фермента в мицеллярной системе при оптимальных степенях гидратации сравнима с уровнем активности фермента в водном растворе.

#### 4.5. ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПАВ С ДНК В РАСТВОРЕ

Габрусёнок П.В., Ролич В.И., Бакулев В.М., Касьяненко Н.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург  
p.v.gabrusenok@gmail.com

Обратимая *транс-цис* изомеризация азобензольной группы, индуцированная УФ и видимым излучением изучается достаточно давно [1]. Она может быть использована для создания различных светочувствительных нанобъектов, таких как генные векторы и другие наноструктуры ДНК [2]. В данной работе исследованы поверхностно-активные вещества (ПАВ), молекулы которых способны изменять свою геометрию благодаря наличию в гидрофобных "хвостах" азобензольной группы. Выбор катионных ПАВ ( $C_4$ -Azo- $OC_6$ ТМАВ и  $C_4$ -Azo- $OC_6$ ТЕАВ) был связан с большой разницей в ККМ для *транс*- и *цис*-изомеров. Несмотря на давний интерес к подобным ПАВ, их свойства в *цис*-форме изучены относительно слабо. Поэтому мы сосредоточили внимание на особенностях молекулярного механизма взаимодействия ПАВ с ДНК и особенное внимание уделили *цис*-форме ПАВ. Было показано [3], что ПАВ взаимодействуют с фосфатами и образуют псевдомицеллы на ДНК даже при концентрации ПАВ ниже ККМ.

Рассмотрена разница между мицеллами *цис*- и *транс*-ПАВ в растворах без ДНК. Изучено взаимодействие высокомолекулярной тимусной ДНК ( $M = 11 \times 10^6$  Да) с *транс*- и *цис*-изомерами. Применялись методы спектрофотометрии, люминесцентной спектроскопии, низкоградиентной вискозиметрии, двулучепреломления в потоке и динамического рассеяния света. Определена разница в размерах *цис*- и *транс*-ассоциатов ПАВ, образование которых предшествует образованию мицелл в растворе. Проведено сравнение комплексов *цис*- и *транс*-ПАВ с ДНК. Исследовано влияние ионной силы раствора на образование комплексов ПАВ с ДНК. Было показано, что и *цис*-, и *транс*-изомеры взаимодействуют с фосфатными группами ДНК, и что их молекулы также могут располагаться вдоль малой бороздки ДНК. Наблюдались три принципиально разных типа поведения комплексов ПАВ-ДНК в зависимости от ионных условий в растворе: поджмание ДНК ( $Z < 1$ ), конденсация ДНК ( $Z > 2$ ) и область термодинамической нестабильности раствора ДНК ( $1 < Z < 2$ ) ( $Z$  означает соотношение зарядов ПАВ/ДНК). Таким образом показано, что ионная сила раствора принципиальным образом влияет на взаимодействие ДНК с ПАВ, термодинамическую стабильность раствора, тип и свойства формируемых комплексов. Для низкой ионной силы 0,005 М в области  $Z < 1$  показано, что жесткость и оптическая анизотропия сегмента ДНК не зависит от  $Z$ .

*Литература:*

1. Hartley G. S. The Cis-Form of Azobenzene. Nature, Vol. 140, p. 281, 1937.
2. Santer S. Remote control of soft nano-objects by light using azobenzene containing surfactants. Journal of Physics D: Applied Physics, Vol. 51, Issue 1, 10 January 2018.
3. Kasyanenko N., Unksov I., Bakulev V., Santer S. DNA interaction with head-to-tail associates of cationic surfactants prevents formation of compact particles. Molecules, Vol. 23, Issue 7, July 2018.

#### **4.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИГАНД-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ GPCR РЕЦЕПТОРОВ МЕТОДОМ МИКРОМАСШТАБНОГО ТЕРМОФОРЕЗА**

*Дашевский Д.Е., Лугинина А.П., Хорн П.А., Шаульская В.С.,  
Василенко Л.М., Мишин А.В.*

Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний - Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный  
dashevskij.de@phystech.edu

Рецепторы, сопряженные с G-белком, (GPCR) играют важнейшую роль в зрении, нервной и гуморальной деятельности, иммунных реакциях, обмене веществ, сердечнососудистой системе и во многих других физиологических процессах в организме человека и, как следствие, участвуют в развитии огромного числа заболеваний и являются мишенями для существенной доли современных медицинских препаратов. Для изучения взаимодействия рецепторов с потенциальными лекарственными препаратами применяется измерение константы связывания рецептора и лиганда. Одним из методов, позволяющим проводить подобные измерения, является микромасштабный термофорез (Microscale Thermophoresis, MST). MST основывается на изменении подвижности белка, вызванном связыванием с молекулой-партнёром. Подвижность молекул влияет на скорость термофоретического движения, которая оценивается по флуоресценции раствора. Для этого необходимо прикрепление флуоресцентных меток к одному из партнёров по связыванию [1].

При изучении GPCR возникают проблемы, связанные с изменением или потерей активности и функции белка вне фосфолипидной среды. Для стабилизации мембранных белков разработаны амфифильные бислои, называемые нанодисками [2][3]. В данной работе в белки мембранного каркаса "Membrane Scaffold Protein" (MSP), образующие основу нанодиска, были произведены точечные вставки цистеина для взаимодействия с малеимидными красителями.

Целью данной работы является разработка технологии для быстрого и точного измерения константы связывания GPCR рецептора с его лигандами при помощи метода MST и адаптированных для этого метода нанодисков.

Работа выполнена при поддержке Государственного задания РФ (соглашение №075-00337-20-03, проект FSMG -2020-0003).

*Литература:*

1. S.A.I. Seidel et al., "Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions," *Methods*, vol. 59, no. 3. Academic Press Inc., pp. 301-315, Mar. 01, 2013, doi: 10.1016/j.ymeth.2012.12.005.
2. R.K. Nicholas Dias, Yung Peng, "NANODISCS IN MEMBRANE BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 3, pp. 139-148, 2017, doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
3. I.G. Denisov, Y.V. Grinkova, A.A. Lazarides, and S.G. Sligar, "Directed Self-Assembly of Monodisperse Phospholipid Bilayer Nanodiscs with Controlled Size," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 11, pp. 3477-3487, 2004, doi: 10.1021/ja0393574.

#### 4.7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО БИОСЕНСОРА ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НуPer Для ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ТИОЛ-ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СИСТЕМ В КЛЕТКАХ K562

Журавлев А.Д.<sup>1</sup>, Люблинская О.Г.<sup>2</sup>

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

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

2andrezh@gmail.com

Продуцируемая клетками эукариот перекись водорода исполняет важные сигнальные функции, окисляя тиольные группы регуляторных белков. Восстановление окисленных тиольных остатков производят две функционально схожие ферментативные системы: контролируемая тиоредоксином (Trx) и глутатионом (GSH). К настоящему моменту эти системы были подробно исследованы *in vitro* и *in vivo*, но вопрос о распределении ролей между ними в живых клетках остаётся открытым.

Мы предлагаем использовать генетически-кодированный биосенсор перекиси водорода НуPer (Belousov et al., 2006) в качестве флуоресцентного зонда для количественной характеристики активности тиол-восстанавливающих систем в живых клетках. При взаимодействии с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в сенсорном домене НуPer образуется дисульфидная связь, изменяющая конформацию белка и его флуоресцентные свойства. В большей части исследований НуPer используется для детекции изменения уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетке в условиях окислительных нагрузок. Мы предлагаем рассматривать скорость изменения сигнала сенсора при анализе процесса его восстановления в живых клетках как численную характеристику эффективности их тиол-восстанавливающих систем. Последовательная обработка клеток растворами H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и элиминирующей перекись каталазы позволяет наблюдать кинетику восстановления НуPer в реальном времени с помощью проточной цитометрии.

В настоящей работе, с использованием предложенного метода и палитры ингибиторов Trx- и GSH-зависимых путей, обнаружено, что за восстановление НуPer в цитоплазме клеток K562 отвечает Trx-зависимая система. Однако, в условиях её ингибирования, дублирующие функции выполняет система GSH, восстанавливающая сенсор существенно (на порядок) медленнее Trx-зависимых ферментативных путей. Кроме того, мы сравнили эффективность работы Trx-зависимой системы в цитоплазме клеток K562 в физиологических условиях и в условиях окислительного стресса, вызванного предшественником витамина К менадионом. Выяснилось, что при увеличении окислительной нагрузки тиоредоксиновая система насыщается и скорость восстановления НуPer резко снижается.

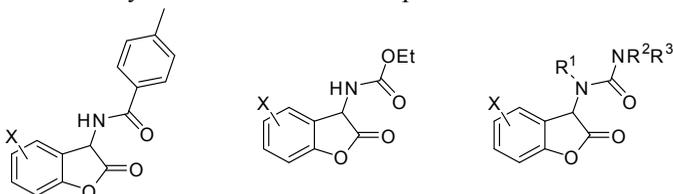
## 4.8. НОВЫЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КУМАРАНОНОВ

Зайцева Э.Р.<sup>1,2</sup>, Смирнов А.Ю.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва  
elvira19999@mail.ru

Хорошо известно, что хемилюминесцентные системы детекции являются одними из самых чувствительных. Использование таких систем в последние годы значительно ускорило прогресс в изучении биологических объектов. Среди различных хемилюминесцентных веществ стоит отметить 2-Аминокумаран-2-ноны, которые способны ярко хемилюминесцировать в сильноосновных средах из-за окисления кислородом. Несмотря на то что эти соединения описаны достаточно давно, ранее они практически не исследовались в качестве селективных люминесцентных меток или сенсоров в биологии. В своей работе мы решили синтезировать библиотеку новых соединений этого класса с различными заместителями в ароматической части молекулы и различными группами при атоме азота, установить взаимосвязь люминесцентных свойств со строением и изучить возможность их применения для изучения биологических процессов.



X = Me, Ad, Ph, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CN, F, Cl, Br, I, OH, OEt, OPh, OBn

R<sup>1</sup> = H, *i*-Pr, Cy

NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> = NHMe, NHEt, NHPr, , NHCy, NHBu, NHBn, NMe<sub>2</sub>, --N<img alt="piperidine ring" data-bbox="645 645 685 676"/>, --N<img alt="piperazine ring" data-bbox="695 645 735 676"/>, --N<img alt="morpholine ring" data-bbox="745 645 785 676"/>

Ранее было показано, что похожие вещества проявляют яркую хемилюминесценцию при действии кислорода только в присутствии очень сильных оснований и только в неводных средах, что ограничивало потенциал их прикладного использования. Созданные же нами вещества способны люминесцировать даже в воде и при действии более слабых оснований. Более того, мы показали, что заметная часть из них проявляет яркую хемилюминесценцию при добавлении небольших количеств перекиси водорода, а некоторые из них способны проявлять видимую невооруженным глазом люминесценцию без добавления каких-либо инициаторов просто в присутствии кислорода воздуха. Подобное поведение говорит о высокой перспективности создания биосовместимых систем обнаружения тех или иных аналитов (в первую очередь различных активных форм кислорода) на основе синтезированных нами веществ.

#### 4.9. НОВЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ АНАЛОГИ ЦИТОКИНИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ

Зенченко А.А., Ословский В.Е., Дреничев М.С.

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

Липофильные производные нуклеозидов рассматриваются в качестве перспективных соединений для получения новых прототипов лекарственных средств (Ertl P. et al. *J. Med. Chem.*, 2006). Такой интерес объясняется сочетанием в их структуре липофильных фрагментов, способных взаимодействовать с гидрофобными областями различных белков-мишеней за счет образования нескольких водородных связей, приводя к их ингибированию. Ежегодно возникает потребность в создании новых противовирусных агентов за счет возникновения новых штаммов вирусов, устойчивых к известным противовирусным препаратам, а также быстрой генетической изменчивости вирусов. Производные нуклеозидов также широко применяются в качестве химиотерапевтических агентов злокачественных новообразований, поскольку являются активными антиметаболитами и ингибируют метаболические пути биосинтеза нуклеоз(т)идов.

Нами была получена серия производных  $N^6$ -замещенных производных аденозина (цитокениновых нуклеозидов), содержащих различные липофильные заместители в структуре как гетероциклического основания, так и углеводного фрагмента. Для синтеза использовались различные методы, включая региоселективное  $N^6$ -алкилирование ацил-защищенного аденозина, аминирование производных инозина, активированных атомами галогенов или бензотриазол-1-ильной группой, а также реакции образования углерод-углеродных связей в условиях металлокомплексного катализа (реакции Соногашира и Сузуки).

Все полученные соединения были протестированы на противовирусную активность в отношении ряда РНК-содержащих энтеровирусов человека (EVA71, Коксаки CVB1, CVA16, эхо ECHO13, ECHO30, полиовирус PV1), а также на проявление ингибиторной активности в отношении фермента репарации ДНК - тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (Tdp1), который представляет собой перспективную мишень для комбинированной терапии онкологических заболеваний. В результате ряд соединений демонстрировали высокую ингибиторную активность на всей панели вирусов в микромолярных концентрациях ( $EC_{50} = 0.7-10.0$  мкМ). Также было отмечено, что наличие в структуре нуклеозида остатка 2',3',5'-три-*O*-бензоил- $\beta$ -D-пентафуранозы является оптимальным условием для проявления ингибиторной активности в отношении Tdp1 в концентрациях  $<5$  мкМ за счет лучшего связывания таких соединений с активным центром фермента посредством гидрофобных взаимодействий (Дреничев М.С. и др. Патент РФ №2748103).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-14-00346 и гранта Президента Российской Федерации МК-1657.2021.1.4.

#### 4.10. МИКРОМАСШТАБНЫЙ ТЕРМОФОРЕЗ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦИТОХРОМОВ P450 С АЗОЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Капанов И.<sup>1</sup>, Карпова М.<sup>3</sup>, Загрядская Ю.<sup>1</sup>, Охрименко И.<sup>1</sup>, Варакса Т.<sup>3</sup>,  
Гилеп А.<sup>2,4</sup>, Струшкевич Н.<sup>3</sup>, Борщевский В.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

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

<sup>4</sup>Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия  
kapranov.ia@phystech.edu

Цитохромы P450 - широко распространенные белки, участвующие в синтезе и метаболизме стероидов, ненасыщенных жирных кислот и фенольных производных, а также задействованные в выведении из клетки чужеродных веществ [1]. Ранее было показано, что соединения азольного ряда, ингибирующие активность цитохромов P450, подавляют рост *Mycobacterium tuberculosis* - возбудителя туберкулеза, одного из самых смертоносных заболеваний [2]. В предыдущих работах мы показали, что CYP124, CYP125 и CYP142 могут связываться и метаболизировать ряд иммуноактивных оксистеролов человека *in vitro* [3], а также участие CYP124 в метаболизме противотуберкулезного соединения, находящегося на стадии клинических испытаний [4]. Таким образом, ингибирование цитохромов P450 является перспективной стратегией для разработки новых противотуберкулезных препаратов.

Существующие методы исследования взаимодействия цитохромов P450 с лигандами имеют ряд ограничений. В настоящей работе мы использовали альтернативный метод - микромасштабный термофорез (MST), который не использовался ранее для изучения цитохромов P450. Полученные кривые MST были использованы для расчета констант диссоциации CYP124 с рядом азольных соединений. Полученные значения констант сравнимы с таковыми, рассчитанными из спектрофотометрического титрования. Таким образом, MST может быть использован для изучения связывания цитохромов семейства P450 с низкомолекулярными лигандами, особенно в тех случаях, когда классические подходы неприменимы.

Данная работа была поддержана совместным исследовательским грантом Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Б20Р-061) и Российского фонда фундаментальных исследований (20-54-00005).

*Литература:*

1. Denisov I.G. [и др.]. Structure and Chemistry of Cytochrome P450 // Chemical Reviews. 2005. № 6 (105). С. 2253-2278.
2. Ortega Ugalde S. [и др.]. Function, essentiality, and expression of cytochrome P450 enzymes and their cognate redox partners in *Mycobacterium tuberculosis*: are they drug targets? // Applied Microbiology and Biotechnology. 2019. Т. 103. № 9. 3597-3614 с.
3. Varaksa T. [и др.]. Metabolic Fate of Human Immunoactive Sterols in *Mycobacterium tuberculosis* // Journal of Molecular Biology. 2021.
4. Bukhdruker S. [и др.]. Hydroxylation of Antitubercular Drug Candidate, SQ109, by *Mycobacterial Cytochrome P450* // International Journal of Molecular Sciences. 2020.

#### 4.11. ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ АДЕНОЗИНА, СОДЕРЖАЩИХ $\alpha$ -ФЕНИЛЭТИЛЬНЫЙ ХИРАЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

Козлова А.А.<sup>1,2</sup>, Дреничев М.С.<sup>2</sup>, Алексеев К.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>МИРЭА - Российский технологический университет, Москва

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва  
ann.kozlova.a@gmail.com

Пуринэргическая сигнальная система представляет собой разновидность внутриклеточной передачи сигнала, где в качестве сигнальной молекулы выступают пуриновые нуклеозиды или основания. У растений передача сигнала осуществляется через взаимодействие с цитокининовыми рецепторами *N*<sup>6</sup>-бензиладенина, который образуется в ходе ферментативного расщепления нуклеозида *N*<sup>6</sup>-бензиладенозина (BAR) [1]. *N*<sup>6</sup>-Замещённые аденозины могут действовать на аденозиновые рецепторы животных клеток, с чем, по-видимому, связана их разнообразная биологическая активность [1, 2]. В предлагаемой работе был предложен метод получения аналогов BAR и оснований, содержащих хиральный фрагмент, для изучения рецептор-специфической регуляции пуринэргической сигнальной системы у животных и растений. Синтез нуклеозидов был осуществлен, исходя из 2',3',5'-три-*O*-изобутироилинозина, активированного в положении 6 остатком бензотриазола [3], нуклеофильное замещение которого на остаток *R*- и *S*- $\alpha$ -метилбензиламина с последующим удалением защитных групп в основных условиях позволило получить *N*<sup>6</sup>-(*R*)- $\alpha$ -метилбензиладенозин и *N*<sup>6</sup>-(*S*)- $\alpha$ -метилбензиладенозин с выходами 69% и 75%. Структура полученных соединений была подтверждена методами ЯМР- и КД-спектроскопии. Была изучена субстратная специфичность нуклеозидфосфорилаз в реакции фосфорилиза полученных хиральных производных с использованием ВЭЖХ-анализа. При добавлении к нуклеозидам фермента пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ) из *E. coli* наблюдалось отщепление остатка рибозо-1-фосфата, при этом равновесие реакции было смещено в сторону нуклеозида. Для смещения равновесия в сторону пуринового основания в реакцию смесь был добавлен другой фермент - щелочная фосфатаза, которая гидролизует рибозо-1-фосфат, поэтому для синтеза хиральных пуриновых оснований из нуклеозидов можно использовать смесь двух ферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-14-00346).

*Литература:*

1. M.S. Drenichev, V.E. Oslovsky, S.N. Mikhailov. *Curr.Top.Med.Chem.* 16 (23), 2562 - 2576 (2016).
2. Z.-G. Gao et al. *Biochem.Pharmacol.*, 65, 1675-1684 (2003).
3. S. Bae, M.K. Lakshman. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 782-789 (2007).

## 4.12. СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ СОСТОЯНИЯ РЕЦЕПТОРА TrkA ЕГО ВНЕКЛЕТОЧНЫМ ПРИМЕМБРАННЫМ РЕГИОНОМ

*Кот Э.Ф.<sup>1,2</sup>, Васильева Е.В.<sup>3</sup>, Шабалкина А.В.<sup>1,2</sup>, Гончарук С.А.<sup>1</sup>, Арсеньев А.С.<sup>1,2</sup>, Минеев К.С.<sup>1,2</sup>*

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

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

<sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва  
kot@phystech.edu

Нейротрофины являются факторами роста и играют ключевую роль в процессе развития нервной системы. Однако за последние годы было показано, что они также принимают активное участие и во многих других жизненных процессах нейронов, таких как дифференциация, миграция, апоптоз и синаптическая пластичность. Изменение уровней экспрессии нейротрофинов может приводить к различным пагубным проявлениям, таким как болевой синдром, возникновение агрессии, депрессии, наркотической зависимости и прочим. Такой широкий спектр фенотипических проявлений обеспечивается не только разнообразием нейротрофинов, но и их рецепторами.

Рецептор TrkA - один из наиболее известных представителей специфических нейротрофиновых рецепторов, связывающий фактор роста нейронов (NGF). Тирозинкиназные рецепторы важны для фармакологии и широко исследуются, однако данных о механизме активации TrkA на сегодняшний день недостаточно для глубокого понимания работы рецептора. В недавнем исследовании было показано, что внеклеточный примембранный регион играет важную роль в активации рецептора TrkA (Vilar et al, JBC 2020). В частности, мутация K410C приводит к активации рецептора без лиганда, а замена всех остатков пролина на глицины в примембранном регионе приводит к заметной инактивации рецептора.

В данной работе методом ЯМР-спектроскопии была исследована связка трансмембранного и примембранного доменов TrkA (GS-D380-K447) дикого типа, а также с активирующей (K410C) и ингибирующей (5P/G) мутациями. Установлено, что примембранный регион не имеет стабильной вторичной структуры и не связывает распространенные бивалентные катионы металлов (кальций, цинк). Дикий тип и мутантная форма 5P/G, в которой 5 остатков пролина заменены на остатки глицина, не имеют существенных различий в параметрах порядка, но отличаются по предрасположенности к образованию вторичной структуры. Последнее указывает на возможное изменение длины примембранного региона, что, в свою очередь, может ингибировать рецептор. Активирующая же мутация K410C приводит к возникновению новой димерной формы трансмембранного домена TrkA, которая с большой вероятностью соответствует активному состоянию рецептора и требует тщательного дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00241. 60

#### 4.13. БЫСТРЫЙ SDS-PAGE

***Кошкина М.К.<sup>1</sup>, Атрошенко Д.Л.<sup>1,2</sup>, Тишков В.И.<sup>1,2,3</sup>***

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

<sup>2</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

<sup>3</sup>ООО "Инновации и высокие технологии МГУ", Москва  
maria.koshkina@chemistry.msu.ru

Электрофорез - это перемещение частиц под действием электрического поля. Электрофорез нашел широкое применение в биохимии для разделения белков и нуклеиновых кислот. Сейчас самым популярным методом электрофореза белков является SDS-PAGE - электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Цитируемость оригинальных статей [1] и [2] превышает 5000 и 250000 цитирований соответственно, что демонстрирует актуальность метода.

Обычно SDS-PAGE длится 1,5-2 часа, однако несколько компаний предлагают "быстрые" гели. Наиболее удобными из них являются гели TGX™ компании BIO-RAD, поскольку они могут быть использованы со стандартными Tris-глициновыми электродными буферами. Они имеют высокую стоимость и недоступны для большинства биохимических лабораторий.

В данной работе была разработана система для проведения быстрого SDS PAGE. Время проведения электрофореза удалось сократить до 20-30 минут. Используемые реактивы дешевы и доступны, а методика проста в исполнении. Также преимуществом разработанной системы является ее совместимость с наиболее часто используемыми Tris-глициновыми электродными буферными системами. В попытке объяснить полученный результат было предложено теоретическое описание системы. Полученные формулы были подтверждены экспериментально. Преимуществом предложенной в работе теоретической модели является ее универсальность и возможность применения на других электрофоретических системах.

*Литература:*

1. Ornstein L. Disc electrophoresis. I. Background and theory // Annals of New York Academy of Sciences. 1964. № 121 (2). с. 321-349.
2. Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. № 227. с. 680-685.

#### 4.14. ДЕРЕПЛИКАЦИЯ СОЕДИНЕНИЙ-АНТИБИОТИКОВ В АКТИВНЫХ ЭКСТРАКТАХ ШТАММА *STREPTOMYCES SP.* VKM Ac-502 НА ОСНОВЕ ТЕСТИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Маренкова Е.А.<sup>1,2</sup>, Белозерова О.А.<sup>1</sup>, Стародумова И.П.<sup>1</sup>, Куджаев А.М.<sup>1</sup>, Гуля Е.Б.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>МИРЭА - Российский технологический университет, Москва  
marenkova.lizzz@gmail.com

Для борьбы с распространением устойчивых к антибиотикам бактерий требуется поиск новых соединений с антимикробной активностью. Наряду с химическим синтезом антибиотиков природная среда, в частности микроорганизмы, остаются важнейшим источником новых соединений. Однако обнаружение новых антибиотиков путем скрининга бактериальных штаммов, особенно актиномицетов, становится все более трудоемким процессом, поскольку за десятилетия поиска значительное количество производимых ими активных метаболитов установлено и вместо идентификации новых соединений происходит повторное обнаружение известных. Ускорить процесс дерепликации - идентификации известных соединений в экстрактах штаммов - можно путем комбинации биологического тестирования и современных аналитических методов, а именно высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения.

В настоящей работе проведена дерепликация активных метаболитов штамма-продуцента *Streptomyces sp.* VKM Ac-502 из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Штамм культивировали на жидких средах разного состава, активность культуральных жидкостей (КЖ) тестировали методом серийных разбавлений с использованием штаммов *E. coli*. При выращивании на среде LB продуцент был более активен против штамма dtolC KanR, на среде 5.5m (с добавлением крахмала) - против штамма dlptD ChlR. Фракционирование КЖ проводили методом твердофазной экстракции: на картридж с полимерным сорбентом наносили большой объем КЖ, а затем смывали раствором с градиентным повышением содержания ацетонитрила в воде, отбирая фракции фиксированного объема. Фракции, показавшие активность при тестировании, анализировали с использованием аналитической системы, которая состояла из хроматографа Ultimate 3000 RSLCnano и масс-спектрометра Orbitrap Fusion Lumos. Спектральные данные MC<sup>1</sup> и MC<sup>1</sup>-MC<sup>2</sup>, полученные в режиме регистрации положительных ионов, обрабатывали с использованием программы Compound Discoverer и сопоставляли с базами данных химических соединений.

В КЖ данного штамма, среди нескольких обнаруженных активных метаболитов, мажорными компонентами оказались известные соединения: при выращивании на первой среде - антибиотик цистозин, на второй среде - альбофунгин.

#### 4.15. КЛАССИФИКАЦИЯ ТОКСИНОВ ИЗ ЖИВОТНЫХ ЯДОВ ПОСРЕДСТВОМ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И МЕТОДА ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ

Можзаева В.А.<sup>1,2</sup>, Кудрявцев Д.С.<sup>1</sup>, Прохоров К.А.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва  
Veramozhaev@yandex.ru

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света или рамановская спектроскопия - многообещающий метод изучения белков. Его преимуществами являются лёгкость пробоподготовки, чистота и экономичность метода (необходимо ~µг сухого образца). Спектры КР отражают аминокислотный состав белка, а также содержат информацию о связях внутри молекулы и, следовательно, о вторичной структуре белка. Упомянутые преимущества и информативность делают спектроскопию КР полезной техникой для быстрого анализа труднодоступных белков (пептидов).

Спектр белка сложен для прямого анализа, поскольку он отражает суперпозицию огромного количества молекулярных колебаний. Поэтому, для быстрого и эффективного анализа спектров КР необходимо применение вычислительных методов для их обработки и извлечения информации. Метод главных компонент (МГК) упрощает анализ данных за счёт уменьшения их размерности. Таким образом, в результате использования МГК становится возможным выявить ключевые различия в спектрах белков.

Существует ряд белковых (пептидных) токсинов, полученных от разных животных, которые являются лигандами никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, которые представляют интерес, в том числе, с медицинской точки зрения. Эти токсины очень разнообразны и особенности их строения (в частности, характер дисульфидных связей) могут быть выявлены из их спектров КР.

Объектами данной работы были токсины из яда змей (трехпетельные белки, а также пептид аземииопсин) и α-конотоксины, полученные из моллюсков. Спектры КР сухих образцов этих токсинов были проанализированы МГК и методами кластеризации. В результате, образцы удалось разделить на группы в соответствии с их структурными особенностями, которые коррелируют с их биологическим происхождением. Эти результаты были подтверждены методами биоинформатики и экспериментальными данными.

Таким образом, мы впервые показали, что спектроскопию КР в сочетании с МГК можно использовать для разделения функционально схожих белковых и пептидных токсинов на группы в соответствии с их структурными особенностями.

#### 4.16. СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ АЛЬФА-СПИРАЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ В СМЕСЯХ ТРИФТОРЭТАНОЛА И ВОДЫ И ИХ РЕФОЛДИНГ В ЛИПИДНЫХ БИЦЕЛЛАХ

Мотов В.В.<sup>1,2</sup>, Кот Э.Ф.<sup>1,2</sup>, Шабалкина А.В.<sup>1,2</sup>, Гончарук С.А.<sup>2</sup>,  
Арсеньев А.С.<sup>1,2</sup>, Минеев К.С.<sup>1,2</sup>

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

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

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

Целью данной работы являлась разработка методик рефолдинга альфа-спиральных мембранных белков из смесей трифторэтанол (ТФЭ) и воды в липидные бицеллы.

В ходе работы с использованием методов ЯМР-спектроскопии и динамического рассеяния света было изучено поведение двух распространенных составов бицелл - DMPC/CHAPS с эффективным соотношением липид/детергент  $q^*=1$  и DMPC/DHPC с  $q^*=0.5$ , а также трансмембранного домена (ТМД) TrkA в присутствии DMPC/CHAPS, при различной полярности растворителя. Установлено, при каких соотношениях растворителей образуются липидные и липид-детергентные агрегаты, а также при какой доле ТФЭ трансмембранный домен TrkA встраивается в липидные частицы. На основании полученных результатов были предложены методики рефолдинга альфа-спиральных мембранных белков, которые были протестированы на вольт-сенсорном домене (ВСД) KvAP и ТМД TLR-9.

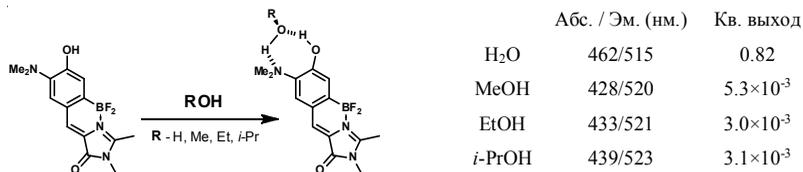
#### 4.17. GFP ХРОМОФОР С ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ МЕТА-ДИМЕТИЛАМИННОЙ ГРУППОЙ КАК ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ СЕНСОР ПРИСУТСТВИЯ ВОДЫ

Мяснянко И.Н., Соколов А.И., Баранов М.С.

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

Обнаружение и количественное определение воды имеет важное значение в органическом синтезе, так как она является наиболее распространенной примесью в органических растворителях. Потребность в безводных растворителях в химических реакциях является важной так как некоторые химические вещества могут реагировать с водой из-за чего во время синтеза могут образовываться побочные продукты. Использование флуоресцентных зондов было ранее показано в качестве эффективного аналитического подхода для обнаружения воды в органических растворителях с более высокой чувствительностью по сравнению с обычными методами, такими как титрование по Карлу-Фишеру [1, 2].

В настоящей работе создан новый флуоресцентный сенсор присутствия воды, основанный на конформационно-зафиксированном хромофоре GFP содержащем дополнительно диметиламинный заместитель в бензильдене фрагменте. Этот сенсор показывает 200-кратное увеличение интенсивности флуоресценции в воде, по сравнению с растворами в различных спиртах.



Нами показано, что предпосылкой данного эффекта является образование межмолекулярной водородной связи между гидроксигруппой растворителя и двумя заместителями в молекуле хромофора (гидроксигруппой и диметиламиногруппой). Мы показали, что заметное увеличение интенсивности флуоресценции происходит не только в чисто водной среде, но и даже в присутствии небольших количеств воды в других органических растворителях.

*Литература:*

1. P. Kumar, R. Kaushik, A. Ghosh and D.A. Jose. Detection of moisture by fluorescent off-on sensor in organic solvents and raw food products // *Anal. Chem.* 2016. Т. 88. С. 11314-11318.
2. H.S. Jung, P. Verwilt, W.Y. Kim, J.S. Kim. Fluorescent and colorimetric sensors for the detection of humidity or water content // *Chem. Soc. Rev.* 2016. Т. 45. С. 1242-1256.

#### 4.18. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ГЕНЕРИРОВАНИЯ РАДИКАЛОВ ПРИ УЧАСТИИ ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛИНА

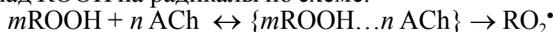
Потапова Н.В., Касаикина О.Т.

ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

pot.natalia2010@yandex.ru

Производные холина, включающие четвертичный аммониевый катион ( $R_4N^+$ ), играют важную роль в живых организмах, животных и растениях. Эти соединения можно разделить на несколько групп: содержащие четвертичный аммониевый катион (холин, ацетилхолин и L-карнитин), и цвиттерионы, в которых  $R_4N^+$  связан цвиттерионной связью с фосфатной группой (глиатилин, цитиколин и фосфатидилхолин).

Ранее нами [1] было показано, что подобно катионным поверхностно-активным веществам (кПАВ) гидрофильный ацетилхолин (ACh), не обладающий поверхностной активностью, совместно с амфифильными гидропероксидами (ROOH) может быть диспергирован в углеводородной среде с образованием микроагрегатов ACh-ROOH, в которых облегчается распад ROOH на радикалы по схеме:



Цель данной работы - сопоставить коллоидно-химические свойства производных холина в реакциях с ROOH в органической среде и при хемосорбции на порошке микрокристаллической целлюлозы. Оказалось, что L-карнитин (LCr) и холин (Ch), как и ACh, образуют смешанные агрегаты с ROOH, в которых наблюдается ускоренный распад ROOH на радикалы. Было показано, что скорости инициирования радикалов в системах гидропероксид третбутила (ГПТБ)-ACh и ГПТБ-LCr в интервале температур 25-50°C близки по величине и энергия активации составляет ~20 кДж/моль, тогда как энергия активации термо-распада ГПТБ составляет 138 кДж/моль. Фосфатидилхолин (PC), является поверхностно-активным веществом, в органических растворителях образует микроагрегаты ~6 нм и не влияет на распад ROOH.

Нами было выдвинуто предположение, что зарождение и развитие атеросклероза может быть связано с окислительной полимеризацией ненасыщенных липидов и липопротеинов на адсорбционных слоях ACh в условиях окислительного стресса, когда в крови повышается содержание пероксидов и других активных форм кислорода. Получена первая "модель" развития атеросклероза путем конденсации-сшивки ненасыщенных липидов яичного фосфатидилхолина на адсорбционном слое ACh в присутствии гидропероксида кумила.

*Литература:*

1. Н.В.Потапова, О.Т.Касаикина, М.П.Березин, Кинетика и катализ, 2020, 61(5), 700.

## СЕКЦИЯ 5

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЗНАВАНИЯ БИМОЛЕКУЛ И ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В КЛЕТКЕ

#### 5.1. РЕЦЕПТОРЫ СМЕРТИ DR4 И DR5 ПОДВЕРГАЮТСЯ СПОНТАННОЙ И ЛИГАНД ЗАВИСИМОЙ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ НЕЗАВИСИМО ОТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ЦИТОКИНУ TRAIL

*Артыков А.А.<sup>1</sup>, Яголович А.В.<sup>1,2</sup>, Долгих Д.А.<sup>1,2</sup>, Гаспарян М.Э.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
art.al.artikov@gmail.com

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) является перспективным противоопухолевым агентом и активирует апоптоз трансформированных клеток через рецепторы смерти (DR) 4 и 5. Однако ряд опухолевых линий клеток нечувствительны к TRAIL. Интернализация и последующий внутриклеточный транспорт рецепторов смерти могут являться ключевыми факторами, определяющими чувствительность клеток к TRAIL. При стимуляции лигандом рецепторы смерти быстро интернализуются через клатрин-зависимые и -независимые механизмы. Однако существуют противоречивые данные о роли эндоцитоза рецепторов смерти в передаче сигнала апоптоза TRAIL.

Был проведен сравнительный анализ кинетики TRAIL-опосредованной интернализации и последующей рециркуляции DR4 и DR5 в устойчивых (HT-29 и A549) и чувствительных (HCT116 и Jurkat) линиях опухолевых клеток. TRAIL стимулировал интернализацию обоих рецепторов концентрационно-зависимым образом со сходной кинетикой в чувствительных и устойчивых клеточных линиях, не влияя на стационарную экспрессию DR4 и DR5 в клеточных лизатах. Используя рецептор-селективный вариант TRAIL DR5-B, мы показали, что рецептор DR5 интернализуется независимо от рецептора DR4. После удаления TRAIL из культуральной среды рецепторы медленно возвращались к плазматической мембране. В течение 4 ч в устойчивых или 6 ч в чувствительных клетках поверхностная экспрессия рецепторов полностью восстанавливалась. Восстановление рецепторов происходило как из вновь синтезированных молекул, так и из транс отдела аппарата Гольджи, поскольку ингибитор синтеза белка циклогексимид и ингибитор внутриклеточного транспорта брэфелдин А ингибировали данный процесс. Эти агенты также подавляли поверхностную экспрессию рецепторов DR4 и DR5 в зависимости от времени и концентрации, что указывает на то, что рецепторы смерти TRAIL подвергаются конститутивному эндоцитозу. Ингибирование эндоцитоза рецепторов приводило к сенсibilизации устойчивых клеток к TRAIL и к увеличению цитотоксической активности лиганда против чувствительных клеток. Наши результаты подтверждают универсальный характер TRAIL-индуцированного эндоцитоза рецепторов смерти. Следовательно, чувствительность клеток к TRAIL может быть связана с постэндоцитарными событиями.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-14-00224.

## 5.2. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА (IR) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУТАНТНЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА

*Гавриленкова А.А.<sup>1,2</sup>, Деев И.Е.<sup>2,3</sup>, Ганцова Е.А.<sup>2</sup>, Петренко А.Г.<sup>2</sup>,  
Бочаров Э.В.<sup>2</sup>, Серова О.В.<sup>2,3</sup>*

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

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

<sup>3</sup>НГУ "Сириус", Сочи  
alycat1008@gmail.com

Рецептор инсулина, принадлежит семейству рецепторных тирозинкиназ (RTKs), которые играют ключевую роль в развитии и дифференцировке клеток. RTKs состоят из внеклеточной части, которая отвечает за связь с лигандом, трансмембранного домена (ТМ), и внутриклеточной части, участвующей в фосфорилировании субстратов. Предполагается, что в неактивном состоянии ТМ-домены рецептора инсулина находятся в конформации, препятствующей взаимодействию цитоплазматических частей молекулы. При связывании лиганда, конформация рецептора меняется, в результате внутриклеточные тирозинкиназные домены сближаются и фосфорилируют друг друга, вызывая клеточный ответ.

Нами были получены конструкции, кодирующие IR с двойными аминокислотными заменами: I951E-F952R; F956E-S957R; I960E-G961R. Клетки НЕК293, экспрессирующие мутантные формы IR, обрабатывали инсулином, клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота с антителами к фосфорилированной и общей форме рецептора. Мутации F956E-S957R; I960E-G961R не влияли на активацию инсулинового рецептора. А замена I951E-F952R приводила к автофосфорилированию рецептора даже при отсутствии лиганда, в отличие от рецептора дикого типа. Предполагается, что двойная замена I951E-F952R приводит к стабилизации трансмембранного домена в активной конформации за счет образования солевых мостиков между глутаминовой кислотой и аргинином. Далее мы провели анализ влияния одиночных замен I951E и F952R на автофосфорилирование рецептора. Одиночные мутации I951E и F952R приводили к активации рецептора в отсутствие лиганда, но в отличие от двойной замены уровень фосфорилирования мутантных рецепторов был значительно ниже.

Исходя из полученных данных, мы можем сделать вывод о том, что трансмембранный домен играет важную роль в активации IR, и даже точечные замены в его аминокислотной последовательности, могут приводить к изменению характера активации рецептора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) гранты № №19-04-01042, 19-34-51034.

### 5.3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ УЗНАВАНИЯ НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА SARS-CoV-2 БЕЛКАМИ 14-3-3 ЧЕЛОВЕКА

Сысоев А.А.<sup>1</sup>, Тугаева К.В.<sup>1</sup>, Хокинс Д.Э.<sup>2</sup>, Смит Дж.Л.<sup>2</sup>, Бэйфилд О.В.<sup>2</sup>, Кер Д.С.<sup>2</sup>, Клычников О.И.<sup>3</sup>, Антсон А.А.<sup>2</sup>, Случанко Н.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха - ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Йоркский университет, Йорк, Великобритания

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

sysoev-bio@yandex.ru

За почти два года распространения SARS-CoV-2 в мире не было одобрено ни одного средства для лечения COVID-19, что делает актуальным поиск новых терапевтических мишеней. Считается, что естественные изменения нуклеокапсидного (N) белка ключевым образом обусловили повышенную патогенность SARS-CoV-2 по сравнению с другими коронавирусами человека. Для гомолога N белка SARS-CoV-1 ранее было показано взаимодействие с компонентами инфицированной клетки: фосфорилирование N внутриклеточными протеинкиназами и узнавание белками 14-3-3 регулировало перемещение N между ядром и цитоплазмой. Белки семейства 14-3-3 - димерные белки-регуляторы с характерной способностью связывать фосфорилированные пептиды. 14-3-3 входят в топ-1% экспрессируемых белков человека во многих тканях, в частности, подверженных инфекции SARS-CoV-2. В данной работе был исследован молекулярный механизм взаимодействия между SARS-CoV-2 N и 14-3-3. Для этого был получен рекомбинантный N белок и его полифосфорилированная форма (pN) в системе ко-экспрессии с протеинкиназой A в *E.coli*. В составе pN было выявлено более 20 сайтов фосфорилирования по Ser/Thr, в том числе обнаруживаемые *in vivo*. Мы показали, что только pN взаимодействует с 14-3-3, при этом взаимодействие наблюдается со всеми семью изоформами

14-3-3 человека с характерной иерархией прочности связывания. Параметры комплекса указывали на взаимодействие димера 14-3-3 с димером pN и на присутствие одного 14-3-3-связывающего сайта в каждой субъединице pN. Эксперименты с серией укороченных вариантов pN указывают на роль сайта S197 в связывании с белками 14-3-3. S197 находится в консервативном функционально значимом SR-богатом регионе N, что предполагает универсальность взаимодействия 14-3-3 с N белками многих зоонозных коронавирусов. В то же время, вариант pN S197L, несущий мутацию, описанную в нескольких человеческих популяциях, также взаимодействует с 14-3-3, что указывает на роль дополнительных 14-3-3-связывающих участков.

Работа поддержана грантом РФФ №19-74-10031.

## СЕКЦИЯ 6

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА

#### 6.1. ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ АДАПТИВНЫХ НК-КЛЕТОК CD57<sup>-</sup>

Алексеева Н.А.<sup>1,2</sup>, Паламарчук А.И.<sup>1,2</sup>, Стрельцова М.А.<sup>1</sup>, Коваленко Е.И.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
nadalex@inbox.ru

Цитотоксичность НК-клеток в отношении опухолевых и зараженных вирусом клеток делает возможным их применение в иммунотерапии. Однако, НК-клетки отличаются значительной фенотипической и функциональной неоднородностью. В частности, НК-клетки, экспрессирующие ингибирующие рецепторы KIR, приобретают дополнительную функциональную активность. С цитомегаловирусной инфекцией (HCMV) ассоциировано формирование популяции адаптивных клеток CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>, их активно пролиферирующие предшественники - CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>.

Данная работа выполнялась с целью исследовать взаимосвязь между пролиферативной активностью CD57<sup>+</sup>НК-клеток и экспрессией в них рецепторов NKG2C и KIR при экспансии *in vitro*. НК-клетки были получены методом магнитной сепарации из мононуклеаров периферической крови здоровых добровольцев, у которых методом иммуоферментного анализа был определен серологический статус HCMV. Анализ фенотипа клеток проводили методом цитофлуориметрии. С помощью клеточного сортировщика выполняли сортировку по 1, 100 и 25 000 клеток в 96-луночные планшеты субпопуляций НК-клеток, различающихся по наличию на их поверхности рецепторов NKG2C и KIR2DL2/DL3. Клетки подвергали стимуляции IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21. В гетерогенных культурах НК-клеток NKG2C<sup>+</sup>/KIR2DL2/DL3<sup>+</sup>, полученных из 25 000 клеток, не наблюдалось значимых различий по уровню экспансии через 7 дней. При этом, большая частота возникновения клональных культур наблюдалась в субпопуляциях НК-клеток KIR2DL2/DL3<sup>-</sup>, а больший размер клонов - в KIR2DL2/DL3<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>. Большая частота возникновения клонов KIR2DL2/DL3<sup>-</sup> могла быть следствием большей чувствительности к IL-2 клеток CD56<sup>bright</sup>, которых в этих субпопуляциях больше, чем в субпопуляциях KIR2DL2/DL3<sup>+</sup>. Чтобы оценить пролиферативную активность субпопуляций CD56<sup>bright</sup> NKG2C<sup>+</sup>/KIR2DL2/DL3<sup>+</sup>, были получены культуры этих субпопуляций из 100 НК-клеток. Среди этих культур на первых этапах лучше пролиферировали субпопуляции KIR2DL2/DL3<sup>-</sup>, затем - KIR<sup>+</sup>. Таким образом, данные свидетельствуют о том, что клетки CD56<sup>bright</sup> сначала вносят ощутимый вклад в экспансию культур KIR2DL2/DL3<sup>-</sup>, но в дальнейшем клетки KIR2DL2/DL3<sup>+</sup> пролиферируют более активно за счет увеличения вклада отдельных крупных клонов. Расширение знаний о потенциальных предшественниках адаптивных НК-клеток важно для применения НК-клеток в иммунотерапии рака.

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

## 6.2. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВЫРАЩИВАНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НА МОДЕЛИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

*Булахов А.Г.<sup>1,2</sup>, Брюшкова А.А.<sup>2,3,4</sup>, Чудаков Д.М.<sup>1,2,3</sup>*

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

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

<sup>3</sup>НИИ трансляционной медицины - РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
andrej.bulakhov@gmail.com

В парадигме современной медицины недостаточная активность регуляторных Т-клеток (Tregs) все чаще упоминается как среди причин возникновения аутоиммунных заболеваний, так и в контексте онкоиммунологии. Это позволяет рассматривать иммунотерапию таких заболеваний антиген-специфичными Tregs в качестве одного из возможных путей лечения ряда пациентов. Но для внедрения такого подхода в клиническую практику необходима методология эффективного выращивания антиген-специфичных Tregs из крови пациента.

В качестве модельного антигена нами был выбран синтетический пул пептидов белка рр65 цитомегаловируса человека PepTivator (Miltenyi Biotec). Для поиска условий, позволяющих обогатиться суммарной фракцией Tregs в процессе культивирования, использовали РВМС здоровых доноров с серологически подтвержденным CMV, которые окрашивали CFSE и культивировали в различных условиях (с IL-2, IL-21, PepTivator, PepTivator + IL-2, PepTivator + IL-21, ОКТ3 в различных концентрациях) в течение 7 дней, после чего оценивали относительный уровень экспрессии FoxP3 (нормированного на экспрессию генов домашнего хозяйства TBP, HPRT, Abl) методом ПЦР в реальном времени. В качестве контроля использовали РВМС того же донора после магнитной сепарации CD25<sup>high</sup> Т-клеток. Было показано, что экспрессия FoxP3 была максимальной в присутствии низких (500 U) концентраций IL-2.

Во второй части работы с помощью клеточного сортера BD FACS Aria III из РВМС тех же доноров выделяли клетки с известным для Tregs фенотипом CD4<sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup></sup>, окрашивали CFSE, объединяли с остальными клетками крови и культивировали 7 дней в присутствии PepTivator + IL-2. Затем проводили цитофлуориметрический анализ популяций CFSE<sup>high</sup> и CFSE<sup>low</sup> по поверхностным маркерам CD3/CD4/CD8, с последующей сортировкой клеток для анализа Т-клеточных рецепторов. Репертуар TCR был отсекавенирован для CD4<sup>CFSE<sup>high</sup></sup> и CD4<sup>CFSE<sup>low</sup></sup> субпопуляций. Данные обрабатывали в MIXCR, VDJtools, а для поиска антиген-специфичных кластеров TCR применяли алгоритм ALICE.

### 6.3. РЕАКЦИИ ЯДЕР БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА НА ВВЕДЕНИЕ АНТИГЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

*Дятлова А.С., Нестерко Е.Э.*

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург  
anst.diatlova@gmail.com

Рецепция цитокинов на периферии афферентными окончаниями нервов и последующая передача информации в форме электрического сигнала представляет собой принципиально новый путь взаимодействия нервной и иммунной систем. Электростимуляция волокон блуждающего нерва повышает выживаемость мышей при септическом шоке на 80% в эксперименте и в настоящее время применяется в клинике для снятия симптомов аутоиммунных заболеваний [1]. Однако механизм этого эффекта до сих пор остается предметом дискуссий. Цель исследования - определить реакции ядер блуждающего нерва, расположенных в продолговатом мозге, на введение Т-независимого (липополисахарид, ЛПС) и Т-зависимого (стафилококкового энтеротоксина В, СЭБ) антигенов, используя маркер активации нейронов cFos.

15 самцов крыс линии Wistar массой 200-250 г были разделены на экспериментальные группы: контроль (введение PBS, n=5), ЛПС (введение ЛПС в дозе 500 мкг/кг, n=5), СЭБ (введение СЭБ в дозе 500 мкг/кг, n=5). Антигены и PBS вводили интраперитонеально; животных выводили из эксперимента через 2 часа после инъекции. После транскардиальной перфузии и фиксации продолговатого мозга изготавливали замороженные срезы для проведения иммуногистохимии с использованием антител к белку cFos, и морфометрии. Оценивали суммарное количество cFos-позитивных нейронов в ядрах NTS и DMX блуждающего нерва на 65-73 уровнях мозга в соответствии с атласом мозга крысы. Статистическую обработку проводили в ПО GraphPad Prism.

В ядре DMX наблюдались единичные cFos-позитивные нейроны как в контроле, так и в группах с введением антигенов. В ядре NTS в контроле наблюдалось  $199 \pm 81$  cFos-позитивных нейронов, в то время как при введении ЛПС количество cFos-позитивных возрастало в 3 раза ( $601 \pm 121$ ), а при введении СЭБ возрастало в 2 раза, но статистически не отличалось от контроля ( $410 \pm 211$ ).

Таким образом, введение ЛПС в дозе 500 мкг/кг вызывает активацию ядра NTS блуждающего нерва, куда, согласно литературным данным, приходит большая часть афферентной висцеросенсорной информации от органов грудной и брюшной полостей. Введение СЭБ в дозе 500 мкг/кг также вызывает активацию ядра NTS, однако паттерн активации отличается от введения ЛПС, что, вероятно, связано с более медленной реакцией мозга на введение Т-зависимого антигена.

*Литература:*

1. Корнева Е.А. Пути взаимодействия нервной и иммунной систем: история и современность, клиническое применение. Медицинская иммунология. 2020;22(3):405-418.

#### 6.4. ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ, ИНДУЦИРУЕМОГО У МЫШЕЙ

Мурова Д.Е., Сервули Е.А., Болховитина Е.Л., Федорина А.С., Сапожников А.М., Шевченко М.А.

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

Астма - хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, поэтому модели этого заболевания подразумевают длительное воздействие аллергена на подопытный организм. Данные модели позволяют воссоздать характеристики заболевания, наблюдаемые у пациентов, такие как эозинофилия легких, однако, не подходят для того, чтобы исследовать механизмы, запускающие эозинофил-опосредованный ответ в дыхательных путях. Как и в большинстве экспериментальных моделей, несмотря на одинаковые воздействия, астма не наступает у всех подопытных животных одновременно. Усреднение показателей, получаемых на ранних этапах развития воспаления, может привести к потере значимой информации.

Целью данного исследования было выявить закономерности изменений на клеточном и гуморальном уровне, наблюдаемых у мышей на раннем этапе развития аллергического воспаления дыхательных путей.

Мышам C57BL/6 вводили орофарингеально экстракт гриба *Aspergillus fumigatus* в дозе 7,5 мкг/мышь/введение. С помощью световой микроскопии проводили оценку клеточного состава крови, костного мозга и бронхоальвеолярных смывов. Уровни иммуноглобулинов определяли методом иммуноферментного анализа, уровни цитокинов - проточной цитометрией.

В результате, выделили группы мышей с высоким (40% и более) и низким (менее 20%) уровнем эозинофилов в бронхоальвеолярных смывах. У мышей с высоким уровнем эозинофилии также были повышены уровни специфических к антигенам *A. fumigatus* IgG сыворотки и IgA бронхоальвеолярного смыва. При этом, общий IgE был повышен во всех группах мышей. Интересно, но ни в одной из групп не было обнаружено повышенной секреции цитокинов, характерных для Th2-опосредованного иммунного ответа (IL-4, IL-5, IL-13) в бронхоальвеолярных смывах мышей, однако наблюдали секрецию IL-12p40 - стимулятора T-клеточного ответа. Причем, в группе мышей с повышенной эозинофилией уровень IL-12p40 был достоверно выше по сравнению с мышами с низкой эозинофилией.

По мере увеличения контактов с аллергеном, в дыхательных путях постепенно происходят активация T-клеточного ответа и увеличение количества эозинофилов. В крови увеличивается IgE с низкой специфичностью к модельному аллергену.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект 20-75-00111.

## 6.5. ПОИСК ПОДХОДА К ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА БТШ70-БАРСТАР В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ

Овсяникова О.В.<sup>1</sup>, Алексеева Л.Г.<sup>2</sup>, Шульга А.А.<sup>2</sup>, Деев С.М.<sup>2</sup>, Сапожников А.М.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва

Olgaovsyanicikova@yandex.ru

Ранее мы продемонстрировали, что адресная доставка БТШ70 с помощью двухмодульной надмолекулярной конструкции к поверхности опухолевых клеток-мишеней усиливает противоопухолевую реакцию НК-клеток. В продолжение этого проекта мы планировали сравнить эффективность данного подхода для двух вариантов структуры второго модуля: с С- и N-терминальной ориентацией в окружающую среду. Поскольку упомянутые выше результаты были получены с помощью модуля барстар-БТШ70, в котором С-концевой домен направлен в окружающую среду, было решено получить модуль со свободным N-концевым доменом. Для этого нужно было получить генетическую конструкцию, кодирующей целевой химерный рекомбинантный белок второго модуля БТШ70-барстар, однако нам не удалось экспрессировать данную генно-инженерную конструкцию в бактериальной культуре, поскольку мы столкнулись с токсическим эффектом этой конструкции для бактерий на этапе трансформации.

Мы попытались снизить токсичность получаемого белка с помощью использования укороченных аналогов БТШ70 размером 60 кДа и 45 кДа, где были удалены с С-конца фрагменты размером 10 и 25 кДа соответственно. Однако и эти продукты оказались токсичными для бактерий.

В связи с указанной проблемой мы использовали для наработки рекомбинантного белка синтетическую генно-инженерную конструкцию, адаптированную для экспрессии в бактериях. За основу была использована последовательность БТШ70 с мутированными сайтами гликозилирования, что позволяет получать в бактериальной системе БТШ70 в растворимой форме и с высоким выходом [1]. После этого была произведена замена кодонов в нуклеотидной последовательности конструкции на более распространённые для бактерий без изменений аминокислотной последовательности. Полученные фрагменты были собраны на базе плазмидного вектора рEXPR\_001 для прокариотической экспрессии в *E. coli*. Бактерии культивировали ночь при 25°C в аутоиндукционной среде ZYM 50-52. Далее очищали с помощью металл-хелатной хроматографии, что дало целевой продукт с выходом 140 мг белка с 200 мл культуральной среды.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 19-75-10120.

*Литература:*

1. Gurskiy YG, Garbuz DG, Soshnikova NV, Krasnov AN, Deikin A, Lazarev VF, Sverchinsky D, Margulis BA, Zatsepina OG, Karpov VL, Belzhelarskaya SN, Feoktistova E, Georgieva SG, Evgen'ev MB. The development of modified human Hsp70 (HSPA1A) and its production in the milk of transgenic mice. *Cell Stress Chaperones*. 2016 Nov;21(6):1055-1064. doi: 10.1007/s12192-016-0729-x.

## 6.6. ПЕРЕКЛОНИРОВАНИЕ ПЛАЗМИДЫ pMSCV-F-del Casp9.IRES.GFP В pMSCV-F-del Casp9.IRES.BFP С ЦЕЛЬЮ ПРОВЕДЕНИЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ТРАНСДУКЦИИ ДВУХ ГЕНОВ В НК-КЛЕТКИ

Паламарчук А.И.<sup>1,2</sup>, Стрельцова М.А.<sup>2</sup>, Коваленко Е.И.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва

palanastasia@yandex.ru

Различные генетические модификации НК-клеток всё чаще применяются в иммунотерапии. Например, введение каталитической субъединицы теломеразы *hTERT* (human telomerase reverse transcriptase) может компенсировать недостаток эндогенной теломеразы и способствовать более долгому выживанию НК-клеток. Встраивание гена индуцируемой каспазы 9 *iCasp9* в НК-клетки, в свою очередь, позволяет быстро запустить апоптоз *iCasp9*-НК-клеток при добавлении димеризатора CID (chemical inductor of dimerization) и предотвратить возможные побочные эффекты, связанные с повреждением генома в результате ретровирусной трансдукции и повышенной активностью *hTERT*-НК-клеток при использовании в иммунотерапии.

В этой работе производилась замена репортерного белка GFP в плазмиде pMSCV-F-del Casp9.IRES.GFP на BFP с помощью плазмиды pTagBFP-N с целью последующей трансдукции генетических конструкций GFP-P2A-hTERT и pMSCV-F-del Casp9.IRES.BFP в составе отдельных RD114-псевдотипированных ретровирусных частиц в активированные НК-клетки. Проверка работоспособности новой генетической конструкции проводилась на клетках линии Raji. Титр вируса с геном *iCasp9*-BFP составлял  $10021 \pm 1116 \text{ SEM TU}$  (transduction units), что меньше титра для *iCasp9*-GFP, который составлял  $48588 \pm 8564 \text{ SEM TU}$ . *iCasp9*-BFP-клетки инкубировали с CID для индукции апоптоза, определяемого окрашиванием флуоресцентномеченым Annexin V и Sytox-AAD. Показано, что эффективность индукции апоптоза *iCasp9*-Raji клеток BFP<sup>+</sup> соизмерима с таковой для *iCasp9*-Raji клеток GFP<sup>+</sup>. Доля живых клеток в обоих случаях снижалась на 70% после инкубации с CID (10 нМ, 20 нМ, 100 и 200 нМ) в течение 24 ч. Для *iCasp9*-НК-клеток BFP<sup>+</sup>, инкубированных в тех же условиях, выявлено, что доля живых клеток постепенно снижается с ростом концентрации димеризатора с 65% до 38%, тогда как для *iCasp9*-Raji клеток BFP<sup>+</sup> отмечено резкое снижение доли живых клеток уже при концентрации 10 нМ CID. Так, функциональная активность исходной генетической конструкции не была утрачена после замены репортерного белка.

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

## 6.7. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО ГЕМИНОМ ПОЛИСПЕЦИФИЧНОГО СЫВОРОТОЧНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ФАГОЦИТОЗ НЕЙТРОФИЛОВ

Раззорова Е.А.<sup>1</sup>, Горшкова Е.Н.<sup>1</sup>, Василенко Е.А.<sup>1</sup>, Василев Ч.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup>Институт микробиологии им. Стефана Ангелова, София, Болгария  
elizavetarazzorenova1966@yandex.ru

Сывороточный иммуноглобулин А (IgA) играет неоднозначную роль в ходе протекания иммунных реакций, опосредуя как про-, так и противовоспалительные функции. Так, ингибирующая сигнализация через рецептор IgA (FcαRI) играет роль в гомеостатических реакциях организма, тогда как комплексы IgA с антигенами мощно активируют иммунные клетки, инициируя воспалительный ответ. Таким образом, особенности взаимодействия IgA с антигенами и с FcαRI в конкретном иммунном контексте определяют патофизиологические или терапевтические роли иммуноглобулина. Ранее нами было установлено, что обработка IgA некоторыми соединениями, например, гемином, ограничено расширяет спектр распознаваемых им антигенов. Теперь мы решили изучить влияние такой модификации на функции IgA. Таким образом, целью работы явилось изучение влияния обработки гемином IgA на опосредованную взаимодействием с IgA выживаемость нейтрофилов и их фагоцитарную активность.

В работе были использованы сывороточный IgA человека (IgA, CSL Behring AG, Берн, Швейцария) и раствор гемина (предоставлен лабораторией иммунопатологии и иммунотерапии Centre de Recherche des Cordeliers, Париж, Франция). Растворенный в PBS (pH 7,4) IgA (0,1 мг/мл) обрабатывали гемином в соотношении 1:10 и 1:20 (30 мин, 4°C) и инкубировали (25 ч, 37°C) с суспензией нейтрофилов ( $1 \cdot 10^6$  кл/мл), выделенных из периферической крови здоровых добровольцев. Цитофлуориметрическую оценку жизнеспособности клеток производили на 1,2,3,4, 20 и 25 час. Для оценки фагоцитарной активности обработанный гемином IgA инкубировали (30 мин, 37°C) с инактивированными нагреванием FITC-мечеными клетками *E. coli* BL 21 ( $1 \cdot 10^8$  кл/мл), а затем с нейтрофилами (1 ч, 37°C). Цитофлуориметрическую оценку осуществляли каждые 10 мин в течение 1 часа. Полученные данные статистически обрабатывали с использованием критерия Манна-Уитни. Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

В ходе работы были получены результаты, указывающие на то, что модификация гемином сывороточного иммуноглобулина А не оказывает статистически значимого эффекта на выживаемость нейтрофилов или их фагоцитоз клеток *E. coli*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-54-18018 Болг\_а.

## 6.8. ВЛИЯНИЕ рН-МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКОГО СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А ЧЕЛОВЕКА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

Чурина Т.С.<sup>1</sup>, Горшкова Е.Н.<sup>1</sup>, Василенко Е.А.<sup>1</sup>, Василев Ч.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup>Институт микробиологии им. Стефана Ангелова, София, Болгария  
tchurina.ttn@yandex.ru

Среди множества функций секреторного иммуноглобулина А (sIgA) человека на поверхности слизистых, основной является его участие в процессах "иммунного исключения". Ранее нами была показана возможность расширения спектра связываемых sIgA антигенов или приобретения им полиспецифических свойств в результате его кратковременного пребывания в условиях кислой среды (рН 2,6 и рН 4,0). Известно, однако, что нейтрофилы, как основные клетки миелоидного ряда, экспрессирующие рецепторы для IgA, в условиях воспаления способны мигрировать сквозь эпителиальный слой на поверхности слизистых оболочек. Помимо защитной роли, избыточная реализация их IgA-зависимых эффекторных функций может вносить существенный вклад в развитие неконтролируемых воспалительных процессов и повреждение тканей. В связи с этим целью настоящей работы стала оценка способности полиспецифического sIgA усиливать эффекторную активность нейтрофилов после их взаимодействия.

В эксперименте был использован очищенный sIgA (I2636, Sigma-Aldrich, Израиль), выделенный из молока здоровых доноров и предварительно обработанный буферными растворами с рН 2,6 и рН 4,0. Исследование воздействия рН-модифицированного sIgA на реализацию эффекторного потенциала нейтрофилами периферической крови человека проводили с помощью проточной цитометрии. Уровень их фагоцитарной активности оценивали с помощью FITC-меченных и опсонизированных полиспецифическим sIgA клеток *Escherichia coli*, образование активных форм кислорода (АФК) - с помощью АФК-зависимого окисления дигидрородамина 123 (Sigma-Aldrich, США). Выживаемость нейтрофилов в присутствии полиспецифического sIgA определяли с использованием флуоресцентных красителей (Annexin V-FITC (BD Biosciences, США) и пропидиум йодид (Life Technologies, США)), специфически окрашивающих клетки на определенных этапах клеточной гибели.

В результате работы было показано отсутствие значимых различий как между уровнем эффекторной активности нейтрофилов, так и продолжительностью их жизни в присутствии полиспецифического sIgA в сравнении с нативным иммуноглобулином.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-54-18018 Болг\_а.

## СЕКЦИЯ 7

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

### 7.1. АКТИВАЦИЯ Nrf2-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ НИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С N-ЭТИЛТИОМОЧЕВИНОЙ

*Амозова В.И.<sup>1</sup>, Ступина Т.С.<sup>1</sup>, Терентьев А.А.<sup>1,2,3</sup>, Санина Н.А.<sup>1,2,3</sup>, Балакина А.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

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

<sup>3</sup>Московский государственный областной университет, Мытищи  
amozovavi@gmail.com

Поиск соединений, влияющих на различные биохимические процессы в опухолевых клетках, является актуальной задачей. Подобным соединением является нитрозильный комплекс железа с N-этилтиомочевинной, который обладает окислительно-восстановительным потенциалом за счет ионов железа, входящих в его состав, и NO-донорной активностью.

Целью исследования является изучение действия нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной на активацию процессов, связанных с ответом антиоксидантной системы и гибелью опухолевых клеток.

Исследование проводилось на опухолевых клетках различных линий. С помощью окрашивания клеток флуоресцентным красителем DAF-FM DA был определен уровень внутриклеточного оксида азота (NO) в норме и после воздействия на клетки исследуемого соединения. Показано значительное повышение уровня внутриклеточного NO в опухолевых клетках всех исследуемых культур в первые 5 минут воздействия комплекса. Значительное увеличение концентрации внутриклеточного NO может являться причиной возникновения окислительного стресса, приводящего к гибели клетки. Для изучения влияния комплекса на изменение уровня активных форм кислорода (АФК) был использован флуоресцентный краситель DCFH DA. Показано, что увеличение количества АФК в клетках происходило постепенно и достигло максимума на всех культурах через 30 минут воздействия соединения.

Nrf2 - фактор транскрипции, отвечающий за активацию ряда генов антиоксидантной системы и определяющий защитную реакцию клеток на индуцированный окислительный стресс. Методом флуоресцентной микроскопии было показано увеличение количества Nrf2 и его транслокация в ядро клетки. Активация Nrf2 была подтверждена с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, показавшей увеличение экспрессии его генов-мишеней *SOD2*, *TXN* и *HMOX1*. На всех клеточных линиях отмечается значительное увеличение экспрессии гена HMOX1 белка гемоксигеназы-1, активация которого происходит в ответ на повышение уровня NO.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (№ АААА-А19-119071890015-5, № АААА-А19-119071890015-6).

## 7.2. ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФАКТОРОВ, ОПОСРЕДУЮЩИХ АНТИФИБРОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Бутузова Д.А.<sup>1</sup>, Кулебякина М.А.<sup>1</sup>, Басалова Н.А.<sup>1,2</sup>, Клычников О.И.<sup>3</sup>, Арбатский М.С.<sup>1</sup>, Ефименко А.Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва

<sup>2</sup>Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва  
butuzova\_dasha@mail.ru

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) - ключевые регуляторы процессов заживления тканей после повреждения, причем многие их эффекты реализуются посредством секретируемых факторов белковой природы. В нашей лаборатории было показано, что фракция секретома МСК, содержащая внеклеточные везикулы (ВВ), а также фракция, обогащенная растворимыми белковыми факторами (РФ), препятствуют дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro* (Basalova N. et al., Cells, 2020). Примечательно, что образцы кондиционированной среды (КС) МСК, не разделенные на фракции, в данной модели не обладают таким действием. Целью настоящей работы было сравнить белковый состав фракций секретома МСК и выявить белки, потенциально опосредующие их антифибротическое действие. Для этого были подготовлены образцы КС иммортализованных МСК жировой ткани человека (hTERT-ASC, ASC52telo, ATCC), из части которых затем методом ультрафильтрации выделяли фракции ВВ и РФ. Триптические пептиды получали аналогично методу, описанному в работе (Nowacki F.C. et al., J Extracell Vesicles, 2015), хроматографически разделяли и анализировали на масс-спектрометре Q Exactive HF-X. Анализ первичных данных проводили с использованием программного обеспечения MaxQuant. Достоверность результатов подтверждали методом вестерн-блоттинга.

На основании полученных результатов идентифицировано восемь белков, потенциально опосредующих антифибротический эффект фракций ВВ и РФ (в их числе TIMP-1, RIP, ингибитор С1 и Gal-3BP). Кроме того, мы выявили ряд белков, которыми обеднены фракции ВВ и РФ по сравнению с КС (например, IGFBP-6, TIMP-2, HDGF). Предположительно, эти белки препятствуют антифибротическому действию КС. В дальнейшей работе мы планируем проверить вклад выявленных белков в реализацию антифибротического эффекта МСК.

Работа проводилась при поддержке Российского научного фонда (#19-75-30007, работы с культурами клеток, получение образцов секретома) и Российского фонда фундаментальных исследований (#19-29-04172, протеомный анализ).

### 7.3. ПРОДУКЦИЯ СУЛЬФИДА ВОДОРОДА ПРИ ГОЛОДАНИИ ПО ИСТОЧНИКУ УГЛЕРОДА И ЭНЕРГИИ У БАКТЕРИЙ

Габова А.О.<sup>1</sup>, Тюленев А.В.<sup>2</sup>, Смирнова Г.В.<sup>2</sup>, Октябрьский О.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь

<sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН - филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь  
ms.anya.05@mail.ru

В последнее время все большее внимание уделяется изучению роли низкомолекулярных серосодержащих соединений в метаболизме бактериальных клеток. Особый интерес представляет сульфид водорода ( $H_2S$ ), эндогенно продуцируемый клетками. Идут активные дискуссии о его роли при различных стрессах у бактерий. Ранее было обнаружено, что у бактерий *Escherichia coli* скачки редокс-потенциала (Eh) и резкие выбросы эндогенного  $H_2S$  могут выступать маркерами стресса при остановке роста и действии некоторых антибиотиков. Такой феномен может рассматриваться как часть защитного механизма клетки от окислительного стресса, вызванного повышением пула внутриклеточного цистеина, возникающего при резкой остановке роста.

Исследовали ответ грамотрицательных (*Escherichia coli* BW25113) и грамположительных (*Bacillus subtilis* 428) бактерий на голодание по источнику углерода и энергии. Бактерии культивировали в аэробных условиях на среде M9 с 0,025% глюкозы. Концентрацию экстраклеточного сульфид-иона ( $pS^{2-}$ ) непрерывно регистрировали с помощью сульфид-специфичного халькогенидного электрода, что позволяло определять его уровень в реальном времени непосредственно в колбах с растущими культурами бактерий.

При исчерпании в среде источника углерода и энергии (глюкоза) бактерии резко прекращали рост. В культурах *E. coli* и *B. subtilis* в момент остановки роста наблюдалось резкое падение потенциала сульфид-специфичного электрода, что указывало на повышение продукции эндогенного сульфида клетками. У *E. coli* обратимый скачок  $pS^{2-}$  составлял  $27,0 \pm 1,7$  мВ ( $38,2 \pm 9,14$  нМоль) и продолжался в течение 12 минут. У *B. subtilis* в тех же условиях было отмечено необратимое падение потенциала электрода на  $72,8 \pm 6,2$  мВ ( $510,6 \pm 11,7$  нМоль). Генерация сульфида клетками сохранялась на протяжении всего эксперимента.

Ранее было показано, что клетки *E. coli* при стресс-индуцируемой остановке роста избавляются от избытка цистеина за счет его депонирования в глутатион (GSH), экспорта в среду и десульфуризации, приводящей к образованию сульфида. Наблюдаемая нами продукция сульфида у *B. subtilis* при стрессе голода может быть также связана с регуляцией гомеостаза цистеина. Примечательно, что продукция сульфида у *E. coli* значительно ниже, чем у бактерий *B. subtilis*, не синтезирующих глутатион.

Работа поддержана грантами РФФИ № 19-04-00888 и грантом Президента РФ для молодых ученых МК-420.2020.4.

#### 7.4. ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ МИШЕНЕЙ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В КОНТРОЛЬ КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОГО БАЛАНСА В ПОЧКЕ МЫШИ, С ПРИМЕНЕНИЕМ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА

Ганцова Е.А.<sup>1,2</sup>, Серова О.В.<sup>1,2</sup>, Деев И.Е.<sup>1,2</sup>, Петренко А.Г.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>НГУ Сириус, Сочи

gantsova@mail.ru

В организме человека строго поддерживается физиологический уровень рН, однако для различных органов и систем его уровень значительно варьируется. О существовании в организмах эндогенных рН-сенсоров - молекул, изменяющих свои свойства и активность под действием кислот/оснований, стало известно не так давно, поэтому активные исследования в этой области продолжаются в настоящее время. Одной из таких молекул является рецепторная тирозинкиназа IRR - рецептор, подобный рецептору инсулина. Показана способность к автофосфорилированию данной рецепторной тирозинкиназы при защелачивании внеклеточной среды рН>7,9. У мышей с нокаутом по гену *insrr*, кодирующему IRR, нарушена секреция бикарбоната, его реабсорбция в почке и вывод с мочой, что свидетельствует о важной роли рецепторной тирозинкиназы IRR в регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме. Целью работы является поиск белков, участвующих в регуляции почками кислотно-щелочного баланса. Моделью для изучения регуляции является почка мыши, использованы две линии мышей - дикий тип и нокаутные по гену *insrr* животные. Было проведено глубокое секвенирование транскриптома для четырех экспериментальных групп - дикий тип и нокаутные животные в нормальных условиях, дикий тип и нокаутные животные в условиях экспериментального алкалоза (в воду для питья животных добавляли 250 мМ NaHCO<sub>3</sub>). При анализе данных NGS-секвенирования обнаружили изменение экспрессии ряда генов в почке. Методом ПЦР в реальном времени был проведен анализ экспрессии генов *slc51b*, *slc26a4*, *rps7*, *slc5a2*, *aqp6*, *plcd1*, *gapdh*, *rny3*, *lypd2*, *kcnk5*, *slc6a6*. Достоверное изменение экспрессии показали следующие гены - *slc26a4*, *rps7*, *slc5a2*, *aqp6*, *plcd1*, *gapdh*, *rny3*, *lypd2*, *kcnk5*, *slc6a6*. Из них в нормальных условиях увеличили свою экспрессию в нокаутных животных по сравнению с мышцами дикого типа - *aqp6*, *rny3*, *lypd2*, *kcnk5*, *slc6a6*; уменьшили экспрессию в нокауте - *slc26a4*, *rps7*, *slc5a2*, *plcd1*, *gapdh*. Многие из этих генов являются интересными кандидатами для описания регуляции кислотно-основного равновесия в почке. Из них *aqp6*, *kcnk5*(TASK2), *slc6a6*(TAUT), *slc26a4*(pendrin), *slc5a2*(SGLT2) являются ионными переносчиками и напрямую могут влиять на изменение кислотно-основного баланса в почке.

Работа выполнена в рамках грантов РФФИ 19-34-90177, 19-04-01042, 19-34-51034.

## 7.5. ПОИСК МУТАЦИЙ В ГЕНЕ БЕЛКА Kaiso, ВЛИЯЮЩИХ НА ТУМОРОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК

Демкина А.О.<sup>1</sup>, Капун Д.С.<sup>2,3</sup>, Мазур А.М.<sup>2</sup>, Филонова Г.Е.<sup>2</sup>,  
Женило С.В.<sup>2,3</sup>

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

<sup>2</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

<sup>3</sup>Институт биологии гена РАН, Москва

alinademkina98@gmail.ru

Белок Kaiso относится к семейству ВТВ/POZ метил-ДНК связывающих белков и является транскрипционным регулятором множества клеточных процессов. В том числе показана его роль в прогрессировании раковых заболеваний (включая рак толстой кишки, груди, яичников), что делает его потенциальной мишенью для онкотерапии. В связи с этим необходимо более глубокое понимание функциональной значимости Kaiso в клетках млекопитающих. Наша работа посвящена поиску мутаций в гене *kaiso*, которые влияют на опухолевый потенциал раковых клеток.

Kaiso может сумоилироваться по 42 лизину в ВТВ-домене, что оказывает влияние на его свойства и функции. Помимо этого, в состав белка Kaiso входят 6 SIMов (SUMO interacting motifs), которые отвечают за нековалентное связывание с SUMO. Один расположен в ВТВ-домене, четыре SIMа - в неструктурированном участке между ВТВ-доменом и цинковыми пальцами и один - в первом цинковом пальце. Все это говорит о возможной роли Kaiso в качестве E3-сумолигазы. Факторы, вовлеченные в поддержание уровня сумоилирования белков, участвуют в регулировании онкогенных сетей и в прогрессировании рака. Поэтому мы решили исследовать роль мутаций в гене *kaiso*, влияющих на взаимодействие с SUMO и E2-сумолигазами, в развитии опухолей. С помощью ко-иммунопреципитации мы показали, что Kaiso входит в один комплекс с E2-сумолигазой UBC9, причем для взаимодействия необходим ВТВ/POZ-домен Kaiso. Было найдено, что двойная мутация V62A F72A в ВТВ/POZ-домене приводит к нарушению взаимодействия с UBC9. Мутация во втором и третьем SIMах Kaiso также приводит к потере связывания с UBC9. Мы внесли эти мутации в раковые клетки почки человека и наблюдали за нарушением развития опухоли у иммунодефицитных мышей. При нарушении взаимодействия Kaiso с UBC9 наблюдается снижение опухолевого потенциала клеток, в то время как нокаут по гену *kaiso* не оказал влияния на рост опухоли по сравнению с клетками дикого типа.

В дальнейшем результаты данной работы могут использоваться для поиска малых молекул, таргетно воздействующих на Kaiso, в целях разработки лекарств с антитуморогенным потенциалом.

Работа поддержана РФФИ (грант №19-74-30026).

## 7.6. ИЗМЕРЕНИЕ ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *Noxa10* И *Noxa11* В МАТКЕ МЫШИ ПОСЛЕ РОДОВ

*Зенов М.А.<sup>1</sup>, Смирнова А.С.<sup>2</sup>, Попов В.С.<sup>3</sup>, Макаревич П.И.<sup>3</sup>, Кулебякина М.А.<sup>3</sup>*

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

<sup>2</sup>РНИМУ имени Н.И. Пирогова, Москва

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва

Martin.zenov@yandex.ru

Гены семейства *Nox* - универсальные регуляторы процессов формирования тела у многоклеточных животных. В последнее время появляются данные о том, что эти гены важны не только для формирования частей тела в эмбриогенезе, но и для успешной регенерации ряда тканей и органов во взрослом организме. Показано, что экспрессия генов *Nox* повышается в месте повреждения и необходима для успешного восстановления структуры поврежденной ткани. Для регенерации эндометрия, предположительно, важны гены *Noxa10* и *Noxa11*, специфические для этой ткани (Kulebyakina and Makarevich, *Front Cel Dev Biol*, 2020). Однако роль генов *Noxa10* и *Noxa11* в регенерации эндометрия на данный момент не изучена. В частности, на настоящий момент неизвестно, возрастает ли экспрессия генов *Noxa10* и *Noxa11* в эндометрии при повреждении. Ответ на данный вопрос являлся целью настоящей работы.

В работе мы оценивали экспрессию генов *Noxa10* и *Noxa11* в матке мыши в модели родового повреждения эндометрия. Для этого у самок мышей линии C57/B16 запускали датированную беременность и забирали образцы маток спустя 4 часа, 8 часов и 16 часов после родов. Экспрессию *Noxa10* и *Noxa11* в полученных образцах измеряли методами ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга.

Согласно результатам ПЦР и вестерн-блоттинга, в матках мышей после родов возрастает экспрессия как *Noxa10*, так и *Noxa11*. Динамика экспрессии этих генов различается, что говорит о разном вкладе генов *Noxa10* и *Noxa11* в процессы восстановления матки после родов. Таким образом, нами получены данные, свидетельствующие о важной роли генов *Noxa10* и *Noxa11* в послеродовом заживлении тканей матки.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

## 7.7. РОЛЬ БЕЛКОВ Treacle И TOPBP1 В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ рДНК ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Минина Е.П.<sup>1,2</sup>, Величко А.К.<sup>2</sup>, Разин С.В.<sup>2,3</sup>, Кантидзе О.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва

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

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва

[lisa.minina@gmail.com](mailto:lisa.minina@gmail.com)

Окислительный стресс, при котором клетка подвергается воздействию активных форм кислорода, вызывает множество повреждений в клетке, в том числе в геномной ДНК. В условиях окислительного стресса в ДНК могут образовываться одно- и двуцепочечные разрывы, окисление азотистых оснований и др. Устранение этих повреждений ДНК требует участия различных клеточных систем репарации.

Одной из самых уязвимых областей геномной ДНК являются кластеры генов рибосомной ДНК (рДНК), кодирующие транскрипт-предшественник рибосомных РНК (рРНК). Поскольку клетка постоянно нуждается в новых рРНК для поддержания пула функциональных рибосом, рДНК является одной из самых транскрипционно активных областей генома и почти не защищена гистонами, что отчасти объясняет ее уязвимость к различным токсическим факторам. За последнее время появляется все больше работ, которые демонстрируют уникальные особенности ответа на повреждения ДНК в рибосомных генах. В частности, было показано, что ядрышковый фосфопроtein Treacle является необходимым фактором индукции ответа на повреждения рДНК.

Мы показали, что под действием перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) репарационный белок TOPBP1 транслоцируется в ядрышко и связывается с рибосомными генами. Такое поведение белка TOPBP1 целиком опосредуется ядрышковым белком Treacle, с которым, по нашим данным, TOPBP1 способен взаимодействовать напрямую. Также мы продемонстрировали, что Treacle-опосредованное таргетирование TOPBP1 к рибосомным генам регулируется активностью нескольких киназ семейства PI3K: ATM, ATR и DNA-PK. Активность каждой из этих киназ вносит вклад в обеспечение взаимодействия между Treacle и TOPBP1 в условиях окислительного стресса. Более того, мы обнаружили, что Treacle-зависимое привлечение TOPBP1 в ядрышко обеспечивает подавление транскрипции рДНК в условиях окислительного стресса. Таким образом, мы предполагаем, что окислительный стресс приводит к появлению двуцепочечных разрывов в рДНК, в ответ на которые активируется сигнальный путь ATM-ATR-Treacle-TOPBP1, который, в свою очередь, вызывает сайленсинг ядрышковой транскрипции.

## 7.8. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА Tet НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ Noxa10 И Noxa11 В СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА И В МАТКЕ МЫШИ

Смирнова А.С.<sup>1</sup>, Кулебякина М.А.<sup>2,3</sup>, Еремичев Р.Ю.<sup>2</sup>,  
Александровичкина Н.А.<sup>2,3</sup>, Попов В.С.<sup>3</sup>, Макаревич П.И.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>РНИМУ имени Н. И. Пирогова, Москва

<sup>2</sup>Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва

anast\_smir@mail.ru

Гены семейства Nox являются универсальными регуляторами процессов формирования тела эмбриогенезе многоклеточных животных. В постнатальный период тканеспецифичная экспрессия генов Nox сохраняется в стромальных клетках, и, по данным последних лет, необходима для обновления и регенерации ряда тканей. Так, для регенерации эндометрия, предположительно, важны гены Noxa10 и Noxa11. В эндометрии человека и мыши наблюдается сравнительно высокий базальный уровень экспрессии этих генов, что может обуславливать уникальную способность этой ткани к многократному обновлению и регенерации (Kulebyakina and Makarevich, Front Cel Dev Biol, 2020). На данный момент неизвестно, какие механизмы способствуют поддержанию экспрессии Noxa10 и Noxa11 в тканях матки. Мы предположили, что для этого требуется активность ферментов семейства Tet, катализирующих ключевую стадию процесса активного деметилирования ДНК.

Целью работы было изучить влияние ингибирования ферментов Tet на поддержание базального уровня экспрессии генов Noxa10 и Noxa11 в матке мыши и стромальных клетках эндометрия человека (далее ЭСК). Для этого половозрелым самкам мыши линии C57/B16 внутрибрюшинно вводили низкомолекулярный ингибитор ферментов Tet. Спустя сутки у животных забирали образцы маток и в них оценивали экспрессию Noxa10 и Noxa11 методами ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга и ОТ-ПЦР. Для экспериментов *in vitro* использовали первичную культуру ЭСК. К клеткам добавляли низкомолекулярный ингибитор ферментов Tet до конечной концентрации 20 либо 80 мкМ. Спустя сутки в клетках оценивали экспрессию NOXA10 и NOXA11 аналогично описанному выше. Согласно полученным результатам, спустя сутки после введения ингибитора ферментов Tet в матке мыши наблюдается снижение базовой экспрессии генов Noxa10 и Noxa11 по сравнению с мышами контрольной группы. Добавление ингибитора к ЭСК человека спустя сутки дозозависимо снижает в них экспрессию NOXA10, а также меняет экспрессию NOXA11. Таким образом, мы показали, что ферменты семейства Tet регулируют экспрессию генов Noxa10 и Noxa11 как в матке мыши, так и в стромальных клетках эндометрия человека. В дальнейшей работе планируется исследовать вклад этих процессов в обновление и регенерацию эндометрия.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

## 7.9. ЭРИТРОЦИТАРНАЯ МОДЕЛЬ ПЕРОКСИДНОГО ГЕМОЛИЗА: ВЫБОР ИНИЦИАТОРА

*Соколова Е.М.<sup>1</sup>, Дубенская Н.А.<sup>2</sup>, Психа Б.Л.<sup>1</sup>, Нешев Н.И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
sem89@icp.ac.ru

При нарушении работы антиоксидантной системы в клетках возрастает количество активных метаболитов кислорода, которые вызывают разнообразные оксидативные повреждения, приводящие клетку к окислительному стрессу, наиболее опасным проявлением которого является пероксидное окисление липидов (ПОЛ) мембран. Важное значение придается разработке биологических моделей, на которых осуществляется эффективное тестирование химических соединений на антиоксидантную активность. Эффективность разрабатываемой модели в первую очередь определяется качеством инициирования ПОЛ в биологическом субстрате. Работа посвящена исследованию пероксидного гемолиза эритроцитов под действием инициаторов пероксидной природы: пероксида водорода (НООН) и трет-бутилгидропероксида (t-BuOOH).

Нами установлено, что под действием исследуемых пероксидов в мембране эритроцитов увеличивается содержание ТБК-реактивных продуктов (продуктов пероксидного окисления липидов) и наблюдается гемолиз эритроцитов, что согласуется с имеющимися литературными данными [1]. В то же время кинетические закономерности гемолиза под действием данных соединений существенно различались.

В широком диапазоне концентраций ( $10^{-6}$ - $10^{-3}$  М) была изучена кинетика гемолиза 0,2%-ной суспензии эритроцитов мыши под действием t-BuOOH и НООН. В качестве количественной характеристики гемолитической активности эффектора использовали время достижения 10% степени гемолиза - период индукции гемолиза, который определяли графически. Зависимость периода индукции гемолиза от начальной концентрации t-BuOOH была существенно нелинейной и хорошо аппроксимировалась биэкспоненциальной функцией вида  $y = A_1 e^{-k_1 C} + A_2 e^{-k_2 C} + y_0$ , где  $k_1$  и  $k_2$  равны  $2 \cdot 10^{-2}$  и  $65 \cdot 10^{-2}$ , соответственно. Это может указывать на присутствие в системе двух различных факторов или процессов, влияющих на развитие гемолитического процесса.

НООН вызывает гемолиз примерно в том же диапазоне концентраций, однако сквозную концентрационную зависимость в пределах всего диапазона концентраций построить не удастся. Это указывает на присутствие в системе дополнительных факторов, влияющих на гемолиз.

Делается вывод, что помимо ПОЛ липидов мембраны вклад в гемолиз эритроцитов при действии пероксидов могут вносить обсуждаемые в докладе дополнительные факторы, что следует учитывать при возможном практическом использовании t-BuOOH и НООН в качестве инициаторов ПОЛ в модели пероксидного гемолиза.

*Литература:*

1. Шевченко О.Г., Шишкина Л.Н. Успехи современной биологии. 2014. Т. 134. № 2. С. 133-148.

## 7.10. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ И ОСТЕОКОММИТИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ 7-СУТОЧНОМ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ

Тырина (Голоикова) Е.А., Бобылёва П.И.

ГНЦ РФ - Институт медико-биологических проблем РАН, Москва  
eagolikovamsu@gmail.com

Выделяемые из пуповинной крови гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки (ГСПК) являются широко используемой альтернативой костномозговому предшественникам. Для *in vitro* экспансии ГСПК наиболее часто используются клетки со стромальными свойствами, такие как мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (МСК). Особый интерес для исследователей представляет взаимодействие коммитированных МСК и гемопоэтических предшественников из пуповинной крови, что стало предметом изучения в данной работе.

Для выполнения нашего исследования в течение 72 часов сокультивировали выделенные из пуповинной крови мононуклеары с остеокоммитированными МСК (МСКост) и интактными МСК (МСКинт). После этого удаляли неприкрепившиеся клетки и в течение 7 суток сокультивировали МСК с адгезированными к ним ГСПК. Определяли паракринный профиль с помощью мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа кондиционированной среды. Ассоциаты МСК и ГСПК разделяли с помощью магнитной сепарации путем селекции по CD45. Полученные МСК и ГСПК использовали для анализа транскрипционной активности в ПЦР реального времени.

На 7 сутки в монокультуре МСКост отмечали увеличение экспрессии ключевого регулятора остеодифференцировки RUNX2. Менее выраженная активация транскрипции этого гена была и в МСКост, сокультивируемых с ГСПК. Через 72 ч в сокультуре МСКост-ГСПК показано снижение продукции ряда гемопоэз-ассоциированных медиаторов, таких как IL-8, IL-10, IP-10, GM-CSF, MCP-3, MIP-1a, MIP-1b по сравнению с МСКинт, и снижение экспрессии *IL-6*, *-8*, *-10*, *GM-CSF*, *G-CSF*, *MCP-1*, *MIP-1a* в ГСПК, сокультивируемых с МСКост. На 7 сутки в сокультуре с МСКост в отличие от МСКинт увеличилась продукция IL-6, MIP-1a, VEGF, MCP-3, IP-10, MIP-1b, а также экспрессия *IL-6*, *VEGF*, *M-CSF* в ГСПК.

Таким образом, 7-суточное сокультивирование с ГСПК снижало транскрипционную активность генов, участвующих в регуляции остеодифференцировки в МСКост, что могло быть обусловлено измененным паракринным профилем ассоциатов МСКост и ГСПК и транскрипционной активностью ГСПК, сокультивируемых с МСКост.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-29-04026.

## 7.11. ВОДОРАСТВОРИМЫЙ АНАЛОГ БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА ws-Lynx1 ПОДАВЛЯЕТ РОСТ И МИГРАЦИЮ ПЕРВИЧНЫХ ЛИНИЙ ГЛИОБЛАСТОМ

*Шлепова О.В.<sup>1,2</sup>, Бычков М.Л.<sup>2</sup>, Шулепко М.А.<sup>2</sup>, Павлюков М.С.<sup>2</sup>, Люкманова Е.Н.<sup>2</sup>*

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

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
shlepova@phystech.edu, ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Мультиформная глиобластома является наиболее агрессивным и распространенным типом рака, локализованным в головном мозге. Несмотря на лечение, рак часто рецидивирует, причём в более агрессивной форме, устойчивой к химиотерапии. Перспективным направлением в лечении глиобластомы является таргетная терапия, целенаправленно воздействующая на молекулярную мишень, контролирующую рост опухоли, например, на никотиновый ацетилхолиновый рецептор  $\alpha 7$  типа ( $\alpha 7$ -nAChR).

Одним из эндогенных лигандов  $\alpha 7$ -nAChR является белок человека Lynx1, закрепленный в клеточной мембране с помощью GPI-якоря. Водорастворимый вариант белка ws-Lynx1 также является лигандом  $\alpha 7$ -nAChR. Ранее было показано, что он ингибирует рост клеток глиобластомы U251MG и глиомы A172, однако не влияет на пролиферацию нормальных астроцитов. Кроме того, было показано, что ws-Lynx1 проникает через гемато-энцефалический барьер мышей, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного препарата для эффективной и селективной терапии глиобластом.

В данной работе было изучено влияние ws-Lynx1 на рост и миграцию клеток первичных линий глиобластом 001, 011 и 020, а также молекулярные механизмы действия ws-Lynx1. Было показано, что 72-часовая инкубация клеток с 50 мкМ ws-Lynx1 приводит к значительному сокращению роста клеток всех трех первичных линий глиобластом. Кроме того, было показано, что ws-Lynx1 в концентрации 50 мкМ сокращает количество мигрирующих через поликарбонатную мембрану клеток линии 011, но не влияет на количество мигрирующих клеток линий 001 и 020. Для определения молекулярных механизмов избирательного действия ws-Lynx1 на опухолевые клетки, были изучены различия в экспрессии генов, отвечающих за рост и миграцию, в клетках первичных глиобластом. С помощью ПЦР в реальном времени были обнаружены значимые отличия в профиле экспрессии рецепторов, контролирующих рост опухоли, а также участников внутриклеточных киназных каскадов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Стипендии Президента РФ для поддержки молодых учёных СП-1900.2021.4 и РФФИ (проект № 18-29-01050).

## СЕКЦИЯ 8

### ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

#### 8.1. МАСШТАБИРОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ALOX15 В КЛЕТКАХ *E.COLI*

Аксенов В.В.<sup>1,2</sup>, Шошина Н.С.<sup>2</sup>, Кацар М.С.<sup>1,2</sup>, Голованов А.Б.<sup>1</sup>,  
Журавлев А.М.<sup>1</sup>, Иванов И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>МИРЭА - Российский технологический университет, Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
aksenov.v.v@edu.mirea.ru

Арахидонат липоксигеназы-15 (ALOX15) млекопитающих является монооксигеназой перекисного окисления липидов, участвующая в образовании низкомолекулярных медиаторов воспаления. Недавние исследования указывают на наличие аллостерического механизма регуляции фермента, что открывает новые возможности в области фармакологических исследований. Селективные ингибиторы и активаторы ALOX15 могут способствовать созданию новых подходов для лечения социально-значимых заболеваний человека. Одним из основных этапов дальнейших исследований в ряду структура-функция фермента является наработка препаративных количеств и масштабирование микробиологического синтеза рекомбинатных форм ферментного препарата в бактериальных клетках.

Микробиологический синтез ALOX15 в малых объемах - это дорогостоящий и нерентабельный с точки зрения белковой биотехнологии процесс. Ранее нами были разработаны и оптимизированы методы экспрессии фермента ALOX15 в бактериальных экспрессионных системах *E. coli BL21 (DE3)*. На данный момент стоимость ферментных препаратов ALOX15 составляет 500€ за 100 мкг, так как используются достаточно дорогостоящие питательные среды, например, EnPresso® (BioSitta Oy, Германия). Наши исследования показывают, что расходы на ферментацию можно сократить в разы, реализуя процесс с экономически доступными питательными средами с образованием мембранно-неассоциированной формы фермента.

Выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант №19-54-12002).

## 8.2. СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ БЕНЗИМИДАЗОЛА

Алексахина И.А.

<sup>1</sup>МИРЭА - Российский технологический университет, Москва

<sup>2</sup>Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва

aleksahinaia@gmail.com

Цель данной работы заключалась в синтезе ряда рибозидов бензимидазола и их дальнейшего изучения. Нуклеозиды ряда бензимидазола обладают селективной противовирусной, противоопухолевой активностью и характеризуются невысокой цитотоксичностью.

Ферментативный метод синтеза новых нуклеозидов бензимидазола основан на реакции трансгликозилирования, осуществляемой с помощью генно-инженерного фермента - пурииннуклеозидфосфорилазы (PNP).

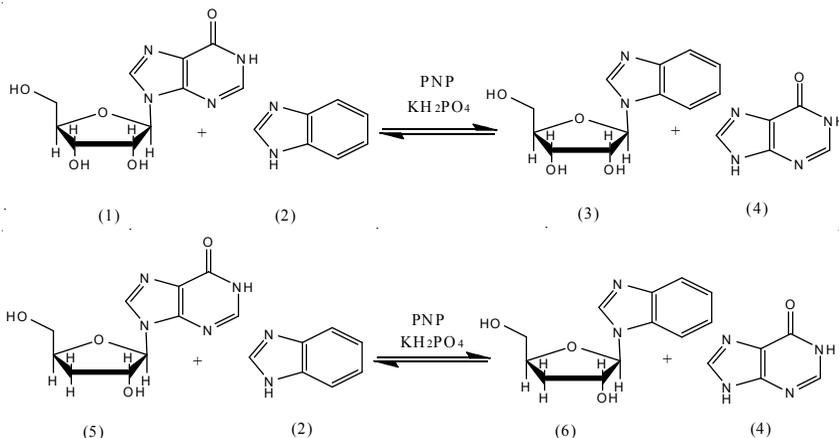


Схема 1. Синтез рибозида и 3'-деоксирибозида бензимидазола. Инозин (1), бензимидазол (2), рибозид бензимидазола (3), гипоксантин (4), 3'-деоксиинозин (5), 3'-деоксирибозид бензимидазола (6).

Был разработан эффективный биотехнологический способ синтеза модифицированных нуклеозидов бензимидазола.

Синтез был оптимизирован по следующим параметрам:

- количество PNP (2800 е.а. для синтеза с Ino, 850 е.а. для синтеза с 3'dIno);
- соотношение субстратов (Benz : Ino и Benz : 3'dIno 2:6 и 1:3 соответственно).

После оптимизации условий ферментативной реакции трансгликозилирования был проведен синтез рибозида и 3'-деоксирибозида бензимидазола.

Выход рибозида бензимидазола - 25,5%, а 3'-деоксирибозида бензимидазола - 53%.

### 8.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА И ЗОЛОТА

*Барышев А.В., Касьяненко Н.А.*

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва  
andry-barash@mail.ru

В последние десятилетия широко изучаются структуры на основе молекулы ДНК, которая выступает в роли матрицы таких структур. Из-за разнообразных свойств и структур самой ДНК можно создавать различные нанообъекты, которые затем можно применять в нанооптике, электронике, тераностике и так далее. Наночастицы металлов нашли своё применение в медицине, электронике, фармацевтике и т.д. Это произошло из-за широкого спектра их физико-химических и биологических свойств, которые зависят от различных параметров самих наночастиц, таких как форма, размеры, используемый металл. На данный момент существует множество способов синтеза наночастиц, что позволяет тонко настраивать необходимые свойства у используемых наночастиц. Сопряжение наночастиц с ДНК приводит к формированию структур со свойствами используемых компонент, некоторые из которых значительно усилены, а также с новыми уникальными свойствами. Это делает подобные системы привлекательными для использования в тераностике, биоэлектронике маркировки и доставки биологически активных агентов. В данной работе рассматривается взаимодействие ионов серебра с ДНК, а также последующее восстановление ионов на ДНК путём добавления восстанавливающего агента  $\text{NaBH}_4$ . Системы исследовали методами спектрофотометрии, атомно-силовой микроскопии, люминесценции и электрофореза. Спектры поглощения, полученные при изучении комплексов ДНК с ионами серебра ( $\text{Ag}^+$ ) в растворе, показали, что связывание ионов происходит с азотистыми основаниями макромолекулы. Методом люминесцентной спектроскопии при использовании люминесцирующих красителей в качестве зондов было показано, что наночастицы гасят люминесценцию красителей в комплексах DAPI и EtBr с ДНК. Были получены АСМ изображения систем ДНК с восстановленными наночастицами золота и серебра. Гель-электрофорез показал, что подвижность ДНК в комплексах с наночастицами серебра меняется в сравнении с подвижностью свободной ДНК.

#### 8.4. ОТРАБОТКА ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНОГО СПОСОБА СИНТЕЗА НОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЁННОГО АЛЛОПУРИНОЛА

Башорин А.Р.<sup>1</sup>, Есипов Р.С.<sup>2</sup>, Константинова И.Д.<sup>2</sup>, Фатеев И.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РГУ МИРЭА - Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
bashorinartur@gmail.com

Различные модификации в гетероциклической части нуклеозидов приводят к появлению ряда соединений, чьи противовирусные и противоопухолевые свойства позволяют синтезировать важные препараты, активно применяющиеся в клинической практике. Предпринятая попытка введения в структуру гетероциклической части пиримидинового основания меркапто-группы с целью химико-ферментативного синтеза 4-меркапто-6-хлор-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидина привела к синтезу нового соединения, 2-((6-хлор-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-ил)тио)бутан-2-ола.

Цель настоящей работы заключается в получении модифицированного гетероциклического основания, 4-меркапто-6-хлор-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидина из производного аллопуринола, 4,6-дихлор-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидина, с последующим созданием нуклеозида на его основе с использованием ферментативной реакции трансгликозилирования.

Было синтезировано 13 мг (6.57%) 2-((6-хлор-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-ил)тио)бутан-2-ола. Для синтезированного гетероциклического основания показана возможность синтеза рибозида и 2-дезоксирибозида с помощью пуриннуклеозидфосфорилазы и уридинфосфорилазы *E. coli*, а также определено оптимальное количество ферментов для синтеза рибозида. Проведён синтез 7.3 мг (68.9%) рибонуклеозида 2-((6-хлор-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-ил)тио)бутан-2-ола.

## 8.5. ДЕТЕКЦИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА *M. TUBERCULOSIS* С ПОМОЩЬЮ БИНАРНЫХ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ ЗОНДОВ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

*Березовская М.Ю., Горбенко Д.А., Рубель М.С., Колпашиков Д.М.*

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург  
berezovskaya@scamt-itmo.ru

Серьезной и актуальной проблемой является точное выявление и генотипирование туберкулеза (комплекса *Mycobacterium tuberculosis* МТВ). В наши дни туберкулез излечим и поддается профилактике, однако является одной из 10 основных причин смерти и основной причиной смерти, обусловленной каким-либо одним возбудителем инфекции (опережая ВИЧ/СПИД) [1]. Анализ нуклеиновых кислот - базовый принцип диагностики патогенных инфекций. На сегодняшний момент необходимы РОСТ (point-of-care testing) системы, которые могут быть доступны в условиях отсутствия обученного персонала и специального оборудования, такого как количественная полимеразная цепная реакция, ввиду чего использование новой концепции биосенсоров может быть разумным решением.

В представленной работе бинарный гибридационный ДНК-зонд был использован для обнаружения фрагмента РНК (аналита) *M. Tuberculosis* (ген *HigA1*), отвечающего за обретение антибиотикорезистентности. Благодаря своей структуре стержневой петли гибридационный зонд имеет повышенную селективность, которую обеспечивает "длинное" аналит-связывающее плечо и способен распознавать даже однонуклеотидные замены (обеспечивается "коротким", нарушающим формирование комплекса, плечом).

В основе используемой в работе тест-системы лежит конструкция, состоящая из двух цепей ДНК и гибридационного зонда с флуоресцентным F-субстратом на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце (МВ). Обе последовательности ДНК состоят из двух частей - комплементарной аналиту и комплементарной МВ. При добавлении аналита формируется комплексная конструкция, в результате чего увеличивается флуоресцентный сигнал. В работе использовали F-субстрат с флуорофором FAM. Реакцию проводили в присутствии 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ Tris pH 7,5. После инкубирования смеси 40 минут в водяной бане при температуре 23°C уровень флуоресценции образцов измеряли на флуориметре Тесан. Было показано, что предел чувствительности сенсора, измеренный десятичными разведениями аналита - 1 наномоль. При не полностью комплементарном анализе разница флуоресцентный сигнал/фон оказывалась в 1,23 раз ниже, чем с полностью комплементарным анализом.

*Литература:*

1. World Health Organization. (2020, October 14). Tuberculosis (tb). World Health Organization. Retrieved September 27, 2021, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>.

## **8.6. ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК СЕЛЕЗЁНКИ СВИНЬИ КАК МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**

***Будагова Т.Ю.<sup>1</sup>, Колбин И.С.<sup>2</sup>, Кузнецова Е.Г.<sup>2</sup>, Власова Н.Н.<sup>2</sup>, Земскова М.Ю.<sup>3</sup>***

<sup>1</sup>Кубанский государственный университет, Краснодар

<sup>2</sup>Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир

<sup>3</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина

РАН, Пущино

3780358@list.ru

Африканская чума свиней (АЧС) вызываемая вирусом АЧС - высококонтагиозное заболевание, поражающее домашних и диких свиней всех возрастов, против которого не существует эффективных вакцин и методов лечения. Количество перевиваемых линий, подходящих для размножения вируса АЧС является ограниченным, в силу невозможности этих клеток обеспечивать репродукцию различных изолятов вируса. В 2021 году в ФГБУ "ВНИИЗЖ", (г. Владимир) была получена линия клеток, выделенная из селезенки свиньи, и показано, что эти клетки могут поддерживать размножение различных вирусных изолятов. В задачи данного исследования входило: охарактеризовать новую клеточную линию с целью ее дальнейшей проверки, как модели для изучения биологии вируса АЧС.

Показано, что эти клетки являются перевиваемой линией, полученной в результате спонтанной импортизации первичных клеток селезенки свиньи. Определено, что это прикрепленные клетки размером 67,767 мкм - 85,459 мкм, растущие кластерами. Время удвоения клеток, измеренное в режиме реального времени посредством технологии xCelligence, составило в среднем 22.41 +/- 0.46 часа. Анализ клеточного цикла показал, что основная популяция клеток находится в фазе G1 (52.6 +/- 7.5%). Поскольку выход вируса в окружающую среду обеспечивается вследствие гибели зараженных клеток в результате апоптоза, был исследован тип клеточной гибели. Показано, что в перевиваемой культуре базовая клеточная гибель происходит преимущественно результате апоптоза. Для определения к какому типу клеток селезенки принадлежат изучаемые клетки, был проведен анализ экспрессии тканеспецифических генов. Было выдвинуто предположение, что эти клетки являются ретикулярными клетками стромы. Следует отметить, что появление и дальнейшая характеристика новой модельной клеточной линии позволит расширить наши знания о способности вируса АЧС размножаться в клетках определенного типа и откроет новые возможности для создания эффективных вакцин и диагностических препаратов.

## 8.7. СОЗДАНИЕ СПЕЦИФИЧНЫХ К ОБЩЕМУ ЛЕЙКОЦИТАРНОМУ АНТИГЕНУ CAR-T КЛЕТОК ДЛЯ МИЕЛО- И ИММУНОАБЛЯЦИИ

Волков Д.В.<sup>1</sup>, Украинская В.М.<sup>1</sup>, Масчан М.А.<sup>2</sup>, Степанов А.В.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва  
ya.wolf.otl@yandex.ru

T-клетки, модифицированные химерным антигенным рецептором (CAR-T) стали доминирующим объектом исследования стремительно развивающейся адоптивной иммунотерапии. Начиная с первого поколения химерных антигенных рецепторов (CAR), идет непрекращающаяся оптимизация структуры этой молекулы и способов надзора за действием CAR-T клеток, что привело к появлению еще четырех поколений рецептора и регистрации 5 препаратов на основе данной технологии. Вместе с разработкой новых мишеней и подходов для противоопухолевой CAR-T терапии рассматриваются иные возможности для применения CAR-T клеток. Одной из них является кондиционирующая терапия перед трансплантацией костного мозга, которая снижает риск отторжения трансплантата. Стандартные режимы кондиционирования (препараты группы алкиляторов и высокие дозы гамма-облучения) ассоциированы с высоким риском органной токсичности, связанной с генотоксичностью. Также, несмотря на интенсивное кондиционирование, у значительной доли пациентов (до 30%) развивается отторжение трансплантата. Одним из примечательных кандидатов-мишеней для CAR в данном случае является молекула CD45. Эта тирозиновая фосфатаза экспрессируется на поверхности всех лейкоцитов и их предшественников, что способствует полноценной деплеции иммунных клеток такими CAR-T клетками.

Наше исследование имело целью создание CAR-T клеток, лишенных CD45 (для исключения взаимоуничтожения CAR-T клеток) и несущих в то же время рецептор, специфичный к данной молекуле. Полученные экспериментальные данные позволяют убедиться в том, что, во-первых, модифицированные и обычные T-клетки относительно без последствий переносят нокаут по гену CD45, несмотря на неоднозначные литературные данные по выживаемости T-клеток с нефункционирующим CD45 (который принимает регуляторное участие в сигнальном каскаде T-клеточного рецептора); во-вторых, анти-CD45 CAR функционально активен и обеспечивает необходимый уровень активации CAR-T, что было подтверждено *in vitro*. Эксперименты *in vivo* проводятся в данный момент.

По сравнению с существующими жесткими методами кондиционирования использование иммунотерапии, направленной на CD45, является более специфичным и безопасным подходом.

## 8.8. АНАЛИЗ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ДИГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ ДЛЯ ЛИНИЙ КЛЕТОК CHO С ГЕНОТИПОМ *dhfr*+/- И *dhfr*-/-, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/Cas9

Гаямова Е.А.<sup>1,2</sup>, Даянова Л.К.<sup>1,3</sup>, Ковнир С.В.<sup>1</sup>, Воробьев И.И.<sup>1,3</sup>, Орлова Н.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФИЦ Биоинженерии РАН - Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Москва

<sup>2</sup>РНИМУ имени Н.И. Пирогова, Москва

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
elizavetagaiaam@gmail.com

Клетки яичника китайского хомячка CHO широко используются для создания продуцентов терапевтически значимых белков. Для некоторых селекционных маркеров, в частности, для дигидрофолатредуктазы (DHFR), возможно проведение геномной амплификации целевого гена под действием возрастающих концентраций ингибитора. Это позволяет многократно увеличить уровень экспрессии целевого гена. В случае DHFR известно, что собственные аллели гена *dhfr* клетки-хозяина также способны к быстрой геномной амплификации под действием ингибитора DHFR метотрексата, что затрудняет получение клональных продуцентов в суб-линиях клеток CHO, содержащих интактные аллели гена *dhfr*. Ранее нами был проведен нокаут одной или двух аллелей гена *dhfr* в клетках линии CHO S методом геномного редактирования CRISPR/Cas9.

Целью настоящей работы являлось исследование остаточной ферментативной активности DHFR в линиях клеток CHO с генотипом *dhfr*+/- и *dhfr*-/-. Измерение проводили спектрофотометрически. Меряли падение концентрации NADPH, происходящее при восстановлении дигидрофолата до тетрагидрофолата, катализируемом DHFR. Неспецифические процессы катализируемого окисления NADPH выявляли при помощи измерения скорости реакции в присутствии избытка ингибитора DHFR.

Установлено, что для лизата интактных клеток CHO S активность DHFR составляет  $2,0 \pm 0,4$  мЕд/мг, для клеток с генотипом *dhfr*+/-  $0,4 \pm 0,2$  мЕд/мг (падение в 5 раз), а в клетках с генотипом *dhfr*-/- активность DHFR не имеет достоверных отличий от фонового значения. В случае линии клеток CHO с генотипом *dhfr*-/- и множественными геномными копиями генетической кассеты с маркером устойчивости DHFR, ферментативная активность DHFR составила  $20 \pm 0,5$  мЕд/мг, что в 10 раз больше, чем для интактных клеток CHO S. Единица активности DHFR была определена как количество дигидрофолата натрия в мкмоль, которое восстанавливается за 1 мин.

Таким образом, мы подтвердили, что в результате полного нокаута гена *dhfr*, но не одного аллеля гена, собственная активность DHFR в клетках CHO исчезает полностью, при этом собственная активность DHFR в клетках CHO с генотипами +/- и -/- пренебрежимо мала в сравнении с активностью DHFR в составе интегрированных в геном плазмидных конструкций. Оба данных варианта клеток могут быть использованы для получения стабильно трансфицированных линий клеток с маркером устойчивости DHFR.

## 8.9. ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН КАК КОМПОНЕНТ "БЕЛКОВОЙ КОРОНЫ" НАНОЧАСТИЦ И ЕГО ДЕТЕКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ

*Горобец М.Г.<sup>1</sup>, Мурадова А.Г.<sup>2</sup>, Шарпаев А.И.<sup>2</sup>, Бычкова А.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

maria.g.gorobets@gmail.com

Разработка систем на основе магнитных наночастиц (МНЧ) является одной из наиболее перспективных технологий в создании биомедицинских материалов различного назначения. В биологических жидкостях наночастицы вступают во взаимодействие с многочисленными белками, формируя вокруг своей поверхности "белковую корону", определяющую распределение частиц в организме, их токсичность, а также эффективность функционирования [1]. В данной работе в качестве модельного белка выбран ЧСА, как наиболее распространённый белок плазмы крови, и как часто используемый для модификации частиц в тераностике белок.

Адсорбция ЧСА на поверхности МНЧ исследована совокупностью физико-химических методов: динамическим светорассеянием и спектрофотометрией в УФ/видимой областях.

Показано, что при добавлении ЧСА к дисперсии МНЧ гидродинамический радиус МНЧ увеличивается, что подтверждает связывание МНЧ и ЧСА.

Для количественной оценки вхождения ЧСА в состав белковой короны использованы магнитные частицы  $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$ , поверхность которых модифицирована антителами к ЧСА. С использованием СФ и метода Бредфорда показана способность модифицированных антителами частиц к преципитации ЧСА из раствора. Продемонстрирован факт взаимодействия МНЧ, на поверхности которых сорбирован ЧСА, и модифицированных антителами частиц. Следует отметить, что данное взаимодействие, однако в меньшей степени, наблюдается и между наночастицами с сорбированными белками и не модифицированными антителами частицами, что указывает на наличие неспецифического связывания. Ведутся работы по подбору агентов для модификации поверхности частиц с целью снижения неспецифического связывания. Представленная работа обладает значительным практическим потенциалом, так как нацелена на разработку универсальных методик модификации поверхности частиц, способствующих повышению специфичности и инертности их поверхности.

*Литература:*

1. Pederzoli F., Tosi G., Vandelli M.G., Belletti D., Forni F., Ruozi B. Protein corona and nanoparticles: how can we investigate on? WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2017. Vol. 9. P. 1-23.

## 8.10. ГАЛОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ РОДОВ *HALOMONAS* И *MARINOBACTER* ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ РОССИИ И КАЗАХСТАНА И ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Эришов А.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Турова Т.П., Груздев Д.С., Назина Т.Н.

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва  
e.alexey.mail@yandex.ru

Пластовая вода многих нефтяных месторождений имеет высокую солёность, что осложняет нефтедобычу, очистку и утилизацию нефтезагрязнённых вод. Применение микробных технологий на месторождениях с минерализованной водой ограничено из-за низкой растворимости кислорода и негативного воздействия соли на микроорганизмы, включая разрушение клеточной стенки, денатурацию ферментов и др. Положительное воздействие микроорганизмов на нефтяной пласт обусловлено жизнедеятельностью углеводородоксилирующих бактерий, рост которых на нефти всегда сопровождается образованием поверхностно-активных веществ. Бактерии родов *Halomonas* и *Marinobacter* часто встречаются в составе микробных сообществ местообитаний с высокой солёностью, включая морские водоёмы, глубинные подземные горизонты, нефтяные пласты, сточные воды нефтедобывающих предприятий.

Целью настоящей работы было определение состава микробного сообщества нефтяных пластов с высокоминерализованной пластовой водой, выделение галофильных углеводородоксилирующих бактерий, изучение их физиологических и геномных характеристик и роли в биотрансформации нефти. Методом секвенирования V3-V4 региона гена 16S рРНК показано присутствие бактерий рода *Halomonas* в нефтяных пластах Ромашкинского месторождения (Россия), характеризующегося с низкой температурой и высоким содержанием сульфида в пластовых флюидах, и бактерий рода *Marinobacter* - в нефтяных пластах Узени (Казахстан) с высокой пластовой температурой. Из нефтяных пластов выделены галофильные бактерии *Halomonas titanicae* TAT1 и *Marinobacter lutaoensis* Kaz22, определены их физиологические характеристики и секвенированы геномы. Оба штамма использовали широкий спектр углеводородов нефти с образованием биоПАВ при солёности среды более 100 г/л, и различались интервалом температуры для роста, составившим 4-42°C для штамма TAT1 и 22-55°C - для штамма Kaz22. В геномах штаммов обнаружены гены, детерминирующие устойчивость к солёности, и гены алкангидроксилаз (*alkB*-ген - у *H. titanicae* TAT1 и *alkB1*, *alkB2*, *alkB3* и *almA* - у *M. lutaoensis* Kaz22), ответственных за деградацию n-алканов с разной длиной цепи. Рассматривается возможность применения штаммов в биотехнологиях увеличения нефтеизвлечения и биоремедиации нефтезагрязнённых экосистем.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 21-64-00019).

## 8.11. ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОЦЕССА АНАЭРОБНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ НАВОЗНОГО СТОКА СВИНОКОМПЛЕКСА

Журавлева Е.А.<sup>1,2</sup>, Шехурдина С.В.<sup>1,2</sup>, Литти Ю.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН - Институт микробиологии им. С.Н.

Виноградского, Москва

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

zhuravleva\_2595@mail.ru

Животноводство является одной из ключевых отраслей сельского хозяйства, несущее высокую экологическую нагрузку на окружающую среду вследствие образования больших объемов быстроразлагаемых навозных стоков. Одним из многообещающих вариантов решения данной проблемы является стимулирование недавно открытого процесса прямого межвидового переноса электронов (DIET) путем внесения электропроводящих материалов.

В работе было изучено влияние электропроводящих материалов (карбоновый войлок, сетка из нержавеющей стали) с разными инокулятами (сброженный осадок сточных вод (далее, ОСВ) и сброженный навоз крупного рогатого скота (далее, КРС) на процесс анаэробной переработки стока и навоза свиного комплекса. Для определения вклада биоуплотнения и процесса DIET на эффективность сбраживания, применялись контроли без и с внесением инертных материалов, близких по физико-химическим свойствам (полиэфирный войлок и сетка из стекловолокна). Первый этап эксперимента включал периодическое термофильное анаэробное сбраживание стока и навоза с относительно низкой концентрацией органического вещества (ОВ) 13,5 г/л, на втором этапе в качестве субстрата использовался только навоз, и концентрация ОВ субстрата была увеличена до 25,6 г/л. На первом этапе наибольшая эффективность процесса наблюдалась при использовании КРС и сетки из нержавеющей стали. Удельный выход метана при использовании КРС с сеткой из нержавеющей стали составил 318,5 мл  $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$ , что было выше на 17,3% относительно контроля. Разложение растворенного ОВ составило 37%, а нерастворенного - 30%, соответственно. По результатам второго этапа эксперимента, комбинация КРС и сетки из нержавеющей стали была также наиболее оптимальной. При этом удельный выход метана составил 258,6 мл  $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$ , разложение растворенного ОВ - 43%, а нерастворенного - 40%. Анализ профиля микробного сообщества биопленок, образующих различные материалы, показал доминирование гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanothermobacter* во всех пробах в архейной составляющей сообщества, и доминирование класса *Limnochordia* в пробах с КРС и частично с ОСВ. Класс *Limnochordia* в основном был представлен некультивируемой группой МВА03, которая, по последним данным предположительно является синтрофной. Таким образом, для анаэробной переработки навозных стоков свиного комплекса наиболее эффективным было использование сброженного навоза КРС и сетки из нержавеющей стали, что вероятно связано с эффективным стимулированием прямого межвидового переноса электронов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от 16.11.2020г. на осуществление государственной поддержки создания и развития НЦМУ "Агротехнологии будущего".

## 8.12. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НУКЛЕОЗИДОВ 2-АМИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА

Зорина Е.А.

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

Большое внимание сейчас уделяется нуклеозидам, содержащим в качестве гетероциклического основания производные бензимидазола. Они относятся к классу неприродных нуклеозидов и являются перспективной группой противовирусных соединений с широким спектром биологической активности.

Целью работы было получение нуклеозидов 2-аминобензимидазола при помощи реакции трансклизирирования для дальнейшего исследования их биологической активности.

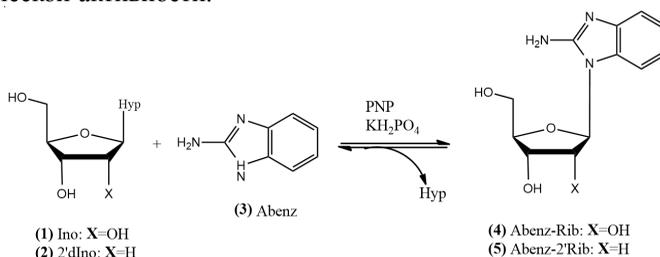


Рис. 1. Общая схема синтеза рибозида и 2'-дезоксирибозида 2-аминобензимидазола

На Рис.1 представлена общая схема синтеза рибозида и 2'-дезоксирибозида 2-аминобензимидазола. Реакции проводились в калий-фосфатном буферном растворе и катализировались пуриннуклеозидфосфорилазой (PNP). Для увеличения выхода целевых продуктов нами была проведена оптимизация условий ферментативного синтеза.

Оптимизированные условия синтеза 2-амино-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазола (4). В качестве донора рибозы использовали инозин (1) в соотношении 5:1 к 2-аминобензимидазолу (3). В реакцию добавляли 4.2 е.а. PNP (на 1 мл реакционной смеси) и термостатировали при 50°C. Выход составил 17% с чистотой 98% (по данным ВЭЖХ). Полученный рибозид 2-аминобензимидазола охарактеризован данными масс-спектрометрии и <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- и <sup>15</sup>N-спектроскопии.

Оптимизированные условия синтеза 2-амино-1-(β-D-2'-дезоксирибофуранозил)бензимидазола (5): донор 2-дезоксирибозы - 2'-дезоксинозин (2), соотношение 2-аминобензимидазола к 2'-дезоксинозину 1:7,7 е.а. PNP на 1 мл реакционной смеси, температура проведения реакции 50°C. Выход 2'-дезоксирибозида-2-аминобензимидазола составил 6%, чистота 97%. 2'-Дезоксирибозид охарактеризован данными масс-спектрометрии и <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-спектроскопии.

### 8.13. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДА 3-ГИДРОКСИ-6-ФТОРПИРАЗИН-2-КАРБОКСАМИДА

Иванов Д.К.<sup>1</sup>, Костромина М.А.<sup>2</sup>, Есинов Р.С.<sup>2</sup>, Константинова И.Д.<sup>2</sup>, Фатеев И.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РТУ МИРЭА - Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
d.k.lvanov@yandex.ru

В настоящее время значительную медицинскую и социально-экономическую нагрузку вызывает вирус гриппа. Существующие вакцины частично решают проблему снижения заболеваемости гриппом. На данный момент доступны два класса противовирусных препаратов: блокаторы каналов М2 - амантадин и римантадин, а также ингибиторы нейраминидазы - осельтамивир и занамивир. Из-за распространения вирусов гриппа, устойчивых к амантадину, в значительной степени исключено дальнейшее использование этого препарата. Более того, устойчивость вируса к осельтамивиру неуклонно растет.

Для защиты населения от сезонного гриппа и нерегулярных пандемических вспышек необходимы новые противовирусные препараты с иным способом действия. Таким является новое противовирусное соединение 3-гидрокси-6-фторпиразин-2-карбоксамид (фавипиравир). Синтез модифицированных нуклеозидов на его основе является перспективным для получения новых соединений, обладающий различной биологической активностью.

В качестве биокатализаторов были использованы фосфорибозил-пирофосфатсинтетаза II (PRPPS) и гипоксантинфосфорибозилтрансфераза (HPRT) *Thermus thermophilus*.

Были определены оптимальные условия реакции и осуществлен ферментативный синтез нуклеотида фавипиравира с использованием PRPPS и HPRT *Thermus thermophilus*.

## 8.14. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ НАНОЧАСТИЦ В КРОВОТОКЕ

Иванов И.Н.<sup>1,2,4</sup>, Синицына А.П.<sup>1,4</sup>, Зеленукин И.В.<sup>1,3,4</sup>, Деев С.М.<sup>1,4</sup>

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

<sup>2</sup>РНИМУ имени Н.И. Пирогова, Москва

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

<sup>4</sup>НИЯУ МИФИ, Москва

iliaivanov97@ Rambler.ru

Одной из проблем применения наночастиц в клинической практике является то, что их поглощают клетки иммунной системы и происходит их накопление в печени, что мешает частицам в полной мере оказать терапевтическое воздействие. Мы разработали методику доставки частиц с помощью изолированных митохондрий. Такой выбор был обусловлен тем, что митохондрии могут циркулировать в свободном виде в кровотоке и не вызывать иммунного ответа.

Митохондрии были получены гомогенизацией на льду тканей печени с последующим центрифугированием и выделением соответствующей фракции. После к ним добавляли магнитные наночастицы покрытые хитозаном и инкубировали в течение получаса. Успешность связывания была продемонстрирована с помощью сканирующего электронного микроскопа.

После отмывки мы переводили митохондрии с конъюгированными наночастицами в PBS и вводили мышам внутривенно через ретроорбитальный синус. Концентрацию частиц в крови мы оценивали с помощью спектральной магнитометрии, и после прекращения их циркуляции в кровотоке оценивали биораспределение наночастиц по органам. Было показано, что частицы, покрытые хитозаном, при их доставке на митохондриях дают сигнал преимущественно в легких. После этого митохондрии были окрашены красителем DeepRed FM, и с помощью люминесцентной томографии было установлено, что митохондрии следуют в печень. Можно предположить, что за счет трения о капилляры частицы теряют связь с поверхностью митохондрий и их аккумулируют лёгкие.

Таким образом нам удалось успешно применить изолированные митохондрии для доставки магнитных наночастиц в лёгкие, что в будущем позволит успешнее проводить терапию заболеваний дыхательной системы.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке РФФ, грант 17-74-20146.

## 8.15. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЭКСПРЕССИИ И ОЧИСТКИ ГИБРИДНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО БИСПЕЦИФИЧНОГО БЕЛКА DR5-B-iRGD

Исакова А.А., Воронцова Е.В., Курбанова Л.А., Марквичева Е.А., Артыков А.А., Яголович А.В., Гаспарян М.Э.

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

Противоопухолевый белок DR5-B на основе цитокина TRAIL индуцирует апоптотическую клеточную гибель, специфично связываясь с рецептором смерти DR5 на поверхности опухолевых клеток. Ранее была разработана методика экспрессии и очистки рекомбинантного белка DR5-B в клетках *E.coli*. В рамках настоящей работы была разработана генетическая конструкция, кодирующая гибридный белок DR5-B с пептидом iRGD на C-конце. Пептид iRGD специфически связывается с интегринами  $\alpha v \beta 3$  и  $\alpha v \beta 5$ , гиперэкспрессированными на поверхности опухолевых клеток, после чего претерпевает протеолитическую активацию и приобретает аффинность к рецептору NRP-1, участвующему в ангиогенезе. На основе полученной генетической конструкции гибридный белок был экспрессирован в растворимой клеточной фракции в штамме *E.coli* SHuffle B. Были подобраны условия экспрессии и очистки методами аффинной и ионообменной хроматографии. Цитотоксическая активность полученного белка была подтверждена методом МТТ на различных линиях опухолевых клеток и 3D моделях опухолевых сфероидов *in vitro*. Было показано, что гибридный белок DR5-B-iRGD быстрее и эффективнее проникает в сфероидные структуры опухолевых клеток. Биспецифическое воздействие на различные сигнальные пути, участвующие в развитии опухолей, с помощью гибридного белка DR5-B-iRGD является перспективным направлением противоопухолевой терапии.

## 8.16. БЕЛКОВЫЙ ИНТЕРФЕЙС БАРНАЗА\*БАРСТАР ЯВЛЯЕТСЯ ЭФФЕКТИВНЫМ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕМ АКТИВНОСТИ CAR-T КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ *IN VIVO*

Калинин Р.С.<sup>1</sup>, Шипунова В.О.<sup>1</sup>, Черников И.В.<sup>2</sup>, Зенкова М.А.<sup>2</sup>, Шульга А.А.<sup>1</sup>, Деев С.М.<sup>1</sup>, Рубцов Ю.П.<sup>1</sup>, Степанов А.В.<sup>1</sup>, Габитов А.Г.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск  
Roman.Kalinin.93@yandex.ru

На протяжении последних десятилетий борьбы с опухолевыми заболеваниями применение генно-инженерных аутологичных Т-клеток стало одним из перспективных направлений персонализированной медицины. Т-клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами (CAR-T), доказали свою эффективность в случае резистентной к терапии хронической лимфоцитарной лейкемии. Однако, несмотря на впечатляющие результаты этого подхода, были зарегистрированы существенные побочные эффекты, связанные с неконтролируемой гиперактивацией ("цитокиновый шторм") и неспецифической цитотоксичностью. Для нивелирования негативных последствий применения данного подхода возможность контроля CAR-T становится крайне актуальной задачей.

Мы предлагаем применить белковый интерфейс Барназа-Барстар для включения/выключения цитотоксических эффектов CAR-T. При создании контролируемых CAR-T, нами была изменена основная парадигма адоптивной клеточной терапии, которая подразумевает непосредственный контакт опухолевой клетки и CAR-T клетки. Новизна технологии заключается в применении третьего компонента, который является промежуточным звеном между раковыми и терапевтическими клетками. Третий компонент в системе - молекула-посредник, состоящая из двух слитых белков - дарпина (миметик антитела), распознающий раковый антиген HER2, и барназы (бактериальная РНКаза). Барназа специфически связывается со своим природным ингибитором - барстаром, он в свою очередь входит в распознающую часть CAR. Мы показали эффективность нашего подхода *in vitro*, продемонстрировав дозозависимую цитотоксичность CAR-T. И далее на иммунодефицитных мышах (NSG) создали модель солидной опухоли, подкожно ввели клетки линии BT-474 с конститутивной экспрессией люциферазы. Инокулированных мышей разделили на три группы, две из которых получили терапию CAR-T. Одной из которых вводили молекулу-посредник дарпин 9-29-барназа специфичную к субдомену I HER2, а другой G3-барназу - с субдомену IV. В результате эффективность терапии против солидной опухоли была выше в группе CAR-T + дарпин 9-29-барназа.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 17-74-30019).

## 8.17. ПОЛИМЕРНЫЕ АДРЕСНЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ФОТОТЕРМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

***Коваленко В.Л.<sup>1,2</sup>, Согомонян А.С.<sup>2</sup>, Шилова О.Н.<sup>2</sup>, Шипунова В.О.<sup>1,2</sup>***

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

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
kovalenko.vl@phystech.edu

Усилия современной медицины направлены на разработку технологий адресной доставки лекарств с целью повышения эффективности лечения и снижения возможных побочных эффектов. Наиболее перспективными системами адресной доставки лекарств являются наночастицы на основе поли-лактид-ко-гликолида (PLGA) ввиду его биосовместимости и биоразлагаемости [1, 2]. Фталоцианиновые и цианиновые красители могут выступать в качестве лекарственного вещества благодаря фотосенсибилизации - явления передачи энергии внешнего лазерного облучения в тепловую энергию, приводящее к гибели раковых клеток. Задачей данного исследования являлась разработка полимерных адресных наноструктур для диагностики и фототермической терапии HER2-положительных опухолей.

В данной работе методом двойной эмульсии были получены наночастицы поли-лактид-ко-гликолида, загруженные различными фталоцианиновыми и цианиновыми красителями. Для реализации направленной доставки наночастиц к HER2-сверхэкспрессирующим раковым клеткам использовали антитело Трастузумаб, распознающее внеклеточную часть рецептора HER2. Полученные частицы облучали лазером с длиной волны 8008 нм и регистрировали зависимость температуры коллоидного раствора наночастиц от времени возбуждения. Было показано, что наночастицы, содержащие фталоцианин магния, демонстрируют наиболее эффективные гипертермические свойства, а именно - нагрев раствора с концентрацией частиц 1 г/л на 45 градусов за 7 минут.

Было показано, что такие частицы могут быть использованы для селективного уничтожения раковых клеток при воздействии лазерного ИК-излучения, входящего в окно прозрачности биоткани. Таким образом, данное исследование является шагом на пути к созданию средств тераностики раковых заболеваний, характеризующихся сверхэкспрессией HER2 рецептора.

Исследования выполнены в рамках гранта РФФ 21-74-30016.

*Литература:*

1. Shipunova V. et al. Dual Regioselective Targeting the Same Receptor in Nanoparticle-Mediated Combination Immuno/Chemotherapy for Enhanced Image-Guided Cancer Treatment. ACS Nano. 2020
2. Shipunova V. et al. Comparative Evaluation of Engineered Polypeptide Scaffolds in HER2-Targeting Magnetic Nanocarrier Delivery. ACS Omega. 2021.

## 8.18. ВЛИЯНИЕ ДВУХ ТИПОВ СУБСТРАТОВ НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДРОЖЖЕЙ *ENDOMYCES MAGNUSII*

Кокорева А.С.<sup>1</sup>, Гесслер Н.Н.<sup>2</sup>, Исакова Е.П.<sup>2</sup>, Дерябина Ю.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

<sup>2</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН - Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва  
kokoreva2013@list.ru

Дрожжи *Endomyces magnusii* являются мезофилами и обладают полной дыхательной цепью, сходной с дыхательной цепью животных. Полноценные митохондрии позволяют дрожжам эффективно использовать как субстраты ферментируемого типа, так и субстраты окислительного типа (глицерин, этанол).

Целью исследования являлось изучение влияния субстратов на морфофизиологические и биохимические характеристики дрожжей *E. magnusii* при длительном культивировании.

Периодическое культивирование дрожжей проводилось на полусинтетических жидких средах в течение 4 недель с использованием различных источников углерода: глицерин 1% и глюкоза 2%, 0,5% и 0,2%. В ходе длительного культивирования анализировали морфологию клеток, оценивали выживаемость культуры тремя независимыми методами, измеряли скорость клеточного дыхания, а также исследовали состав растворимых углеводов цитозоля.

С помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторениями (n=100) показали, что морфология клеток *E. magnusii* в большей степени зависит от природы субстрата и в меньшей степени от его концентрации. Клетки дрожжей, выращенных на 0,5% и 2% глюкозе, были более вытянутые, и их длина была в среднем в 1,85 раз больше по сравнению с размерами клеток, выращенными на глицерине. Цитометрическое исследование показало, что к 4 неделе культивирования клетки сохраняли высокую жизнеспособность. Однако их способность к образованию колоний значительно снижалась. По мере старения культуры на всех субстратах скорость дыхания снижалась и после четырех недель культивирования не превышала 10% от первоначальной. При этом значительная часть дыхания оставалась цианид-чувствительной. Основными растворимыми углеводами выступали полиолы арабит, маннит и инозит, причем арабит и маннит были более характерны для клеток, растущих на 2% глюкозе и 1% глицерине. В культуре, которая росла на 0,2% глюкозе, в течение 4 недель культивирования доминировал инозит. При культивировании в течение 1 недели на среде с 0,5% глюкозой основными углеводами цитозоля в этих клетках были арабит и маннит, затем арабит и маннит замещались инозитом.

## **8.19. СУРРОГАТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУС-НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ SARS-CoV-2 ПРИ ПОМОЩИ КОНЬЮГАТА АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА 2 С ПЕРОКСИДАЗОЙ ХРЕНА И ИНТАКТНОГО РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ШИПОВИДНОГО БЕЛКА**

***Колесов Д.Э.<sup>1</sup>, Синегубова М.В.<sup>1</sup>, Даянова Л.К.<sup>1,2</sup>, Орлова Н.А.<sup>1</sup>, Воробьев И.И.<sup>1,2</sup>***

<sup>1</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
52ru111@mail.ru

Присутствие в системной циркуляции вирус-нейтрализующих антител у лиц, перенесших инфицирование вирусом SARS-CoV-2 либо иммунизацию вакциной, включающей шиповидный белок данного вируса, уменьшает вероятность последующего первичного или повторного заражения данным вирусом. Стандартным методом определения титра нейтрализующих антител (nAb) является блокирование заражения лабораторным вариантом вируса культивируемых клеток человека, экспрессирующих ген основного рецептора вируса SARS-CoV-2 - ангиотензин-превращающего фермента 2 (АПФ2). Такое тестирование может быть выполнено только в лабораториях с уровнем биобезопасности 3 и выше, что делает его непригодным для массового применения. Замена коронавируса на псевдотипированный вирус, содержащий только шиповидный белок SARS-CoV-2, также требует лаборатории с уровнем биобезопасности 2 и выше. Суррогатный тест для определения уровня вирус-нейтрализующих антител может быть проведен в формате обычного ИФА и сводиться к измерению уровня ингибирования взаимодействия рецептор-связывающего домена шиповидного белка SARS-CoV-2 (RBD) и внеклеточного домена АПФ2.

Для проведения такого теста нами была создана клеточная линия на основе CHO, секретирующая АПФ2 в больших количествах и получены конъюгаты АПФ2 и RBD с пероксидазой хрена. При проведении суррогатного теста в формате ИФА было обнаружено, что предпочтительной схемой тестирования является иммобилизация RBD на поверхности микропланшет и использование АПФ2 в форме конъюгата с пероксидазой хрена. При таком проведении анализа кривая зависимости степени ингибирования взаимодействия RBD и АПФ2 от разведения сыворотки линейна в широком диапазоне разведений, также при таком методе проведения теста не требуется проводить прединкубацию исследуемых образцов с RBD в отдельных пробирках. При замене RBD исходного варианта SARS-CoV-2 на RBD варианта бета было продемонстрировано, что методика проведения теста не меняется. Разработанный метод суррогатного определения вирус-нейтрализующих антител может быть использован в рутинном определении уровней нейтрализующих антител для различных вариантов вируса SARS-CoV-2.

## 8.20. ДВУХСТАДИЙНАЯ ДОСТАВКА ПОЛИМЕРНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ПАРЫ БАРНАЗА\*БАРСТАР ДЛЯ АДРЕСНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ РЕЦЕПТОРА HER2

*Комедчикова Е.Н.<sup>1,2</sup>, Шипунова В.О.<sup>1,2,3</sup>, Котельникова П.А.<sup>2</sup>, Согомонян А.С.<sup>2</sup>, Деев С.М.<sup>1,2,3,4</sup>*

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

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

<sup>3</sup>НИЯУ МИФИ, Москва

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
elena.komedchikova@gmail.com

Традиционный метод лечения раковых заболеваний при помощи химиотерапевтических препаратов обладает рядом существенных недостатков, включающих низкий терапевтический индекс и высокую системную токсичность. Использование наночастиц в качестве платформ для доставки препаратов позволяет уменьшить их токсичность для организма, однако большинство доступных на данный момент наночастиц является неадресными и приходят в опухоль за счёт эффекта повышенной проницаемости и задержки (англ. enhanced permeability and retention, EPR, effect), который работает не на всех видах опухолей людей. В качестве альтернативы в данный момент разрабатываются методы двухстадийной доставки, при которых сначала происходит доставка в большей дозе нетоксичного распознающего компонента к раковым клеткам, с последующей доставкой в значительно меньшей дозе второго комплементарного компонента, несущего химиотерапевтический препарат.

Пара барназа\*барстар является одной из наиболее перспективных систем двухстадийной доставки. Бактериальная рибонуклеаза барназа и её природный ингибитор барстар обладают высокой константой аффинности ( $K_{\text{афф}} = 10^{14} \text{ M}^{-1}$ ), что в совокупности с их малым размером (12 и 10 кДа) и не представленностью в млекопитающих выгодно отличает их от традиционных двухстадийных систем (биотин-стрептавидин, антитело-гаптен).

В данной работе:

1. Были получены полимерные наночастицы, содержащие химиотерапевтический препарат доксорубин и флуоресцентный краситель нильский голубой.

2. Было продемонстрировано эффективное двухстадийное мечение клеток со сверхэкспрессией рецептора HER2.

3. Было продемонстрировано цитотоксические свойства наночастиц. Включение доксорубина в состав наночастиц приводило к снижению IC50 более, чем на порядок, которая в итоге составляла  $42.7 \pm 2.7 \text{ nM}$ .

Таким образом, в данной работе были получены полимерные наночастицы, обладающие терапевтическими и диагностическими свойствами, для двухстадийной доставки к HER2 экспрессирующим раковым клеткам.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 21-74-30016.

## 8.21. ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОЛИЗА ГАЛАКТАНА И АРАБИНАНА В ПРИСУТСТВИИ ГОМОГЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Курьшикина М.С.<sup>1</sup>, Семёнова М.В.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

maria.kuryshkina@chemistry.msu.ru

На данный момент актуальной является проблема переработки и использования отходов растительного происхождения. Одним из общих способов переработки данного типа сырья является применение ферментных препаратов. Состав гемицеллюлоз, входящих в клеточную стенку растений, варьируется от вида растительного сырья, что нужно учитывать при выборе оптимального ферментного комплекса, позволяющего осуществить глубокую конверсию сложного субстрата в максимальной концентрации при наименьших затратах фермента. При выборе оптимального комплекса важным фактором является взаимодействие ферментов эндо- и экзо-типов действия.

В рамках работы было изучено взаимодействие гомогенных ферментов, разрушающих галактан и арабинан.

При гидролизе галактана в присутствии смеси эндогалактаназы *Aspergillus niger* (с активностью 230 ед/мг) и  $\beta$ -галактозидазы *Penicillium canescens* (4 ед/мг) наибольший синергетический эффект наблюдался для смеси ферментов в соотношении 60%:40% соответственно, а рассчитанный коэффициент синергизма составил 1,2. Продуктом гидролиза была галактоза.

При гидролизе разветвлённого арабинана было изучено взаимодействие между эндоарабиназой *A. foetidus* (с активностью 12 ед/мг) и экзоарабиназой (20 ед/мг), арабиноксилан-арабинофурангидролазой (35 ед/мг), арабинофуранозидазой *P. canescens* (2 ед/мг) или арабинофуранозидазой *A. foetidus* (10 ед/мг). Наибольший синергетический эффект наблюдался для смеси эндоарабиназы и арабиноксилан-арабинофурангидролазы в соотношении примерно 50%:50%; рассчитанный коэффициент синергизма составил 2,6. Единственным продуктом гидролиза была арабиноза.

Свекловичный жом - побочный продукт переработки сахарной свеклы - является ценным источником таких сахаров, как арабиноза, галактоза, глюкоза. На основе вышеперечисленных ферментов, а также ферментов, гидролизующих целлюлозу и пектин, была составлена смесь, эффективно разрушающая свекловичный жом (исходная концентрация сырья 100 г/л) до степени конверсии по общим сахарам 68%. Гидролизат содержал 20 г/л арабинозы, 17 г/л глюкозы и 2 г/л галактозы.

## **8.22. ВЛИЯНИЕ ПОЛИКАТИОННОГО ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТА ПДАДМАХ НА СОСТОЯНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПЛЕНКАХ СЕРЕБРА**

*Матусевич О.А., Коктыш И.В., Мельникова Я.И.,  
Пицко (Калугина) Т.С., Маскевич С.А.*

Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь  
drkoktysz@gmail.com

Твердофазный иммунофлуоресцентный анализ предполагает не только формирование на поверхности металлической нанопленки, но и покрытие этой пленки слоем положительно заряженного полиэлектролита для эффективной сорбции молекул белка. Взаимодействие белок-полиэлектролит определяет как конформационное состояние, так и функциональную активность иммобилизуемых белковых молекул и таким образом влияет на антигенсвязывающие параметры иммунохимических тест-систем. Наноструктурированные пленки серебра были сформированы на поверхности лунки полистирольных планшетов и представляли собой непрерывный слой наночастиц сферической формы размером от 30 до 80 нм. В экспериментах использованы две концентрации IgG-FITC - стандартная - 500 нг на лунку и насыщающая - 1000 нг на лунку. Покрытие поверхности серебряной нанопленки AgNP2 раствором ПДАДМАХ в концентрации С1 приводило к возрастанию интенсивности флуоресценции иммобилизованного IgG-FITC (500 нг на лунку) в 1,5 раза по сравнению с интенсивностью флуоресценции IgG-FITC, иммобилизованного на поверхности полистирола, покрытой слоем ПДАДМАХ в той же концентрации. При увеличении количества иммобилизуемого IgG-FITC до 1000 нг на лунку, интенсивность флуоресценции возросла в 2,6 раза по сравнению с аналогичным параметром при иммобилизации IgG-FITC на слое ПДАДМАХ. В экспериментах с использованием для покрытия серебряной нанопленки в 2 раза большей концентрации ПДАДМАХ С2, при иммобилизации IgG-FITC (500 нг на лунку) регистрировалось увеличение интенсивности сигнала в 3,0 раза по сравнению с флуоресценцией IgG-FITC, иммобилизованных на слое ПДАДМАХ.

Следует отметить, что определение концентрации белка, иммобилизованного на поверхности наноструктурированной пленки, покрытой ПДАДМАХ, выявило увеличение количества сорбированных IgG-FITC на 20-30% по сравнению с количеством иммобилизованного конъюгата на слое полиэлектролита. Это подтверждает наши данные о том, что покрытие поверхности пленок серебра слоем катионного полиэлектролита ПДАДМАХ приводит к увеличению интенсивности флуоресценции иммобилизованных IgG-FITC от 1,5 до 3 раз по сравнению с интенсивностью флуоресценции IgG-FITC, иммобилизованных на слое ПДАДМАХ.

## 8.23. ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ C/N В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА АВТОАГРЕГАЦИЮ ФАКУЛЬТАТИВНОГО МЕТИЛОТРОФА *METHYLORUBRUM EXTORQUENS*

Митина Е.Р., Алексахина В.В., Пшеничникова А.Б.

РТУ МИРЭА - Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва  
mitinakaterina@bk.ru

Агрегация - формирование макроскопических скоплений бактериальных клеток, оседающих на дне культуральных сосудов - наряду с образованием биопленок является распространенной формой "многоклеточного" существования бактерий. Известно, что клетки в агрегатах более устойчивы к внешним воздействиям, чем планктонные клетки; также агрегация играет значительную роль в адгезии клеток к поверхностям, формировании биопленок и развитии бактериальных инфекций.

Природной нишей розовоокрашенных факультативных метилотрофов (РОФМ) рода *Methylorubrum* являются поверхности листьев растений, где эти бактерии существуют в виде биопленок или агрегатов клеток, прикрепленных к поверхности. Механизм агрегации РОФМ изучен мало, однако известно, что увеличение соотношения C/N в среде усиливает агрегацию [1]. Выделенный нами штамм *Methylorubrum extorquens* LP (ВКПМ В-13995) выраженно агрегирует при культивировании в жидких средах, образуя агрегаты звездчатой формы размером 2-3 мм.

В ходе данной работы было изучено влияние соотношения источников углерода и азота (C/N) - метанола и нитрата калия в минеральной среде на планктонный рост *M. extorquens* LP (определяли по изменению оптической плотности при 600 нм) и массу клеток в составе агрегатов, которые выделяли из культуральной жидкости фильтрованием через бумажные фильтры. Культивирование проводили при 28°C, pH 7, при перемешивании со скоростью 170 об/мин в течение 48 часов. Соотношение C/N варьировало от 12 до 50 моль/моль (что соответствовало концентрации метанола от 0,5 до 2% об.). Масса агрегированных клеток составила от  $0,49 \pm 0,03$  г/л до  $1,05 \pm 0,04$  г/л с максимумом при C/N, равном 24. Оптическая плотность планктонной культуры падала от  $1,23 \pm 0,01$  до  $0,35 \pm 0,07$  с ростом содержания метанола в среде. Изучение кинетики роста *M. extorquens* LP показало, что агрегаты образуются параллельно с планктонным ростом.

Полученные данные свидетельствуют о том, что агрегация *M. extorquens* усиливается при увеличении C/N, что согласуется с данными для других РОФМ. Интересно отметить, что увеличение отношения C/N в среде по-разному влияет на планктонный рост и образование агрегатов - оптическая плотность суспензии клеток значительно уменьшается, а масса агрегатов растет до C/N = 24, затем медленно падает. Можно предположить, что клетки в агрегатах более устойчивы к высоким концентрациям метанола, чем клетки планктонной культуры.

*Литература:*

1. Chanratana M. et al. AMB Expr 7, 208 (2017).

## 8.24. ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АННЕКСИНА V, МЕЧЕННОГО FITC, ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТ

Новикова Н.И.<sup>1</sup>, Майоров С.Г.<sup>2</sup>, Земскова М.Ю.<sup>2</sup>, Грановский И.Э.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино  
nataliya.novikova2000@mail.ru

Аннексин V - Ca<sup>2+</sup>-зависимый фосфолипид-связывающий белок, обладающий высоким сродством к фосфатидилсерину, широко представленному в поверхностном слое мембраны апоптотических клеток. Конъюгация аннексина V с флюорохромами делает данное вещество оптимальным маркером для количественной детекции программируемой клеточной гибели путем апоптоза в клетках эукариот. Целью нашей работы стала оптимизация технологии получения аннексина V, меченного FITC.

Был создан штамм-продуцент *Escherichia coli* BL21 (DE3)/ PNAХ5 28 $\alpha$ , у которого высокоэффективная транскрипция целевого гена аннексина V находится под контролем РНК-полимеразы фага T7 с индуцибельным промотором lacUV5. Показано, что исследуемый рекомбинантный белок находится преимущественно в растворимом состоянии. В дальнейшем очистка белка проводилась посредством металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA агарозе с последующим диализом. Концентрация очищенного рекомбинантного аннексина V составила 6,5 мг/мл, что на 3 порядка выше производительности представленных на данный момент методик получения данного белка. Инкубирование раствора белка при концентрации 3,7 мг/мл с 2,5 кратным избытком FITC и последующее выделение из реакционной смеси полученных конъюгатов на анионообменном сорбенте привели к получению целевого продукта. Эффективность аннексина V-FITC детектировать клеточную гибель в культурах клеток эукариот была оценена посредством проточной цитометрии.

В результате была разработана и успешно протестирована высокопроизводительная методика получения реагента аннексин V-FITC с выходом 60-100 мг с 1 л бактериальной биомассы. Данный оптимизированный протокол позволяет повысить доступность аннексина V, которая в настоящее время является лимитирующим фактором для проведения исследований клеточной гибели.

## 8.25. НОВЫЕ ЗАЩИТНЫЕ ГРУППЫ ДЛЯ СИНТЕЗА 5'-ТИОЛ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

**Орешков С.Д.<sup>1,2</sup>, Брылёв В.А.<sup>2</sup>, Коришун В.А.<sup>2</sup>, Устинов А.В.<sup>2</sup>**

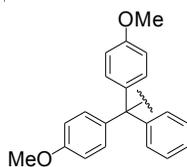
<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

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

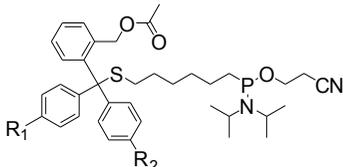
seryunat@gmail.com

Фундаментальная проблема твердофазного олигонуклеотидного синтеза заключается в побочных реакциях, которые снижают эффективность одного синтетического цикла до значений менее 100%. По мере синтеза олигонуклеотида накапливаются продукты неполной длины, от которых необходимо очищать целевой полноразмерный продукт. Одним из эффективных и простых методов очистки является картриджная очистка, основанная на принципе твердофазной экстракции. Наличие липофильной удаляемой группы на 5'-конце является ключевым для применения очистки на обращенно-фазовых сорбентах.

Современные методы удаления тритильных защитных групп (**1**) с тиольной функции основаны на взаимодействии с солью серебра(I) и восстановителя, либо на обработке кислотой [1,2]. Эта стадия может вызывать депуринизацию азотистых оснований в составе цепи а также приводить к неполному удалению тритильной защиты [3].



**1**



**2-7**

R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H  
R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>  
R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>  
R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = SCH<sub>3</sub>  
R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>  
R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = SCH<sub>3</sub>

В настоящей работе впервые предложен и синтезирован ряд тиол-несущих амидофосфитов (**2-7**), содержащих новую (2-метилацетокси)тритильную защитную группу с различными заместителями. С помощью протолитических констант охарактеризована их стабильность в кислой среде и осуществлен синтез олигонуклеотидов, модифицированных по 5'-концу меркапто-группой. Произведенная модификация позволяет сделать кислотное детритилирование тиол-содержащего олигонуклеотида необратимым, повышая общий выход целевого полноразмерного олигонуклеотида.

*Литература:*

1. Shchepinov, M. & Korshun, V. Recent Applications of Bifunctional Trityl Groups. Chem. Soc. Rev. 32, 170-180 (2003).
2. Turner, J. J., Williams, D., Owen, D. & Gait, M. J. Disulfide Conjugation of Peptides to Oligonucleotides and Their Analogs. Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. 24, 4.28.1-4.28.21 (2006).
3. Dellinger, D. J., Betley, J. R., Wyrzykiewicz, T. K. & Caruthers, M. H. Synthesis of DNA Using a New Two-Step Cycle BT - Oligonucleotide Synthesis. in (ed. Herdewijn, P.) 1-16 (Humana Press, 2005). doi:10.1385/1-59259-823-4:001.

## 8.26. ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ ШТАММА *STREPTOMYCES TSUKUBAENSIS* FRC 53-16 - ПРОДУЦЕНТА ТАКРОЛИМУСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ И ОПТИМИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Петрова К.С.<sup>1</sup>, Глаголева Е.В.<sup>2</sup>, Джавахия В.В.<sup>2</sup>, Кучугурин В.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет),  
Москва

<sup>2</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

<sup>3</sup>ООО "ИЗВАРИНО ФАРМА", Москва

petrova.ksenia.s@yandex.ru

В качестве исходного штамма использовали штамм *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2797D (патент RU2686779 С1), продуктивность которого составляла 0.75±25 г/л такролимуса. Повышение продуктивности штамма осуществлялось путем направленных методов отбора изолятов исходного штамма и ненаправленного индуцированного многоступенчатого УФ-мутагенеза с применением мутагенных факторов и последующей селекцией. После серии экспериментов по облучению суспензии исходной культуры в течение 25 минут были получены наиболее продуктивные изоляты FRC 53-5 и FRC 53-16 с продуктивностью 1,2-1,3 г/л такролимуса.

Помимо УФ-излучения в качестве селективного фактора отбора, на изолированные в чистую культуру колонии воздействовали добавлением в агаризованную среду субстанции такролимуса из расчёта 1 г/л (с чистотой 99,63%). Добавление данного антибиотика способствовало подавлению роста низко продуктивных колоний (отсеивающий фактор), с другой стороны, повышению продуктивности выживших мутантных колоний-продуцентов. Оценку количественного содержания такролимуса в культуральной жидкости проводили методом ВЭЖХ.

Следующим этапом работы было повышение продуктивности полученных мутантных штаммов путем оптимизации состава жидкой питательной среды. Проведение однофакторного эксперимента по подбору источников азотного питания: микробный белок (содержание сырого протеина не менее 70%), картофельный белок (содержание сырого протеина не менее 80%), соевый пептон (содержание общего азота - 9%) привело к увеличению продуктивности нового высокоактивного штамма в колбах до 1,40-1.55 г/л. Наибольшая продуктивность достигнута добавлением в жидкую питательную среду микробного белка в количестве 7 г/л.

## **8.27. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИ-L-ЛИЗИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КОНЬЮГАТОВ IgG-FITC, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОПЛЕНОК СЕРЕБРА**

***Пицко (Калужина) Т.С., Мельникова Я.И., Коктыш И.В., Матусевич О.А., Маскевич С.А.***

Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь  
univer.yanina@gmail.com

Наночастицы этих металлов и системы детекции с их использованием имеют широкое биомедицинское применение - они используются в геномике, биосенсорике, иммуноанализе, лазерной фототерапии раковых клеток, адресной доставке лекарственных препаратов, ДНК и антигенов, биоимиджинге и мониторинге клеток и тканей. На поверхности лунок полистирольных планшетов методом электростатического осаждения было получено несколько вариантов нанопленок серебра, отличающихся различной структурой поверхности и физико-химическими свойствами с размерами частиц от 30 до 80 нм. В экспериментах использовали нанопленку AgNP2. В качестве модельного белка был использован конъюгат моноклонального антитела класса IgG1 с флуоресцеином IgG-FITC в рабочих концентрациях 2,5 мкг в мл и 5 мкг в мл. Раствором поли-L-лизина в концентрациях C1 и C2 покрывали нанопленки серебра, иммобилизованные в лунках полистирольного планшета, и в качестве контроля использовали покрытие раствором поли-L-лизина интактных лунок полистирольного планшета. В экспериментах по иммобилизации модельного IgG-FITC в концентрации 2,5 мкг/мл было установлено, что при использовании покрытия нанопленки серебра поли-L-лизином в концентрации C1 интенсивность флуоресценции иммобилизованного белкового конъюгата возрастает в 3,8 раза по сравнению с интенсивностью флуоресценции IgG-FITC в той же концентрации, иммобилизованного на слое поли-L-лизина, покрывающем лунки полистирольного планшета без серебра. Увеличение для покрытия двух вариантов твердых фаз концентрации поли-L-лизина в два раза (C2) практически не изменило интенсивность флуоресценции иммобилизованного IgG-FITC - она возросла в 4 раза по сравнению с контролем. При увеличении концентрации иммобилизуемого белка до 5 мкг в мл, наблюдалось возрастание интенсивности флуоресценции сорбированного на нанопленках серебра IgG-FITC в 3,4 раза по сравнению с контролем при покрывающей концентрации поли-L-лизина C1 и в 3,2 раза при покрывающей концентрации поли-L-лизина C2. При определении концентрации белка, сорбированного на поверхности нанопленок серебра, было установлено увеличение количества иммобилизуемого белка на 30-50% по сравнению с количеством белка, иммобилизуемого на слое поли-L-лизина, покрывающем лунки полистирольного планшета в качестве контроля.

## 8.28. СКРИНИНГ МАТЕРИАЛОВ-НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ АНАММОКС-ПРОЦЕССА *IN SITU*

Попова Н.М.<sup>1</sup>, Чеглакова В.Н.<sup>2</sup>, Вишнякова А.В.<sup>3</sup>, Литти Ю.В.<sup>3</sup>, Сафонов А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

<sup>2</sup>Московский педагогический государственный университет, Москва

<sup>3</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН - Институт микробиологии им. С.Н.

Виноградского, Москва

missis\_96@mail.ru

Проблема загрязнения подземных вод азотными соединениями в результате деятельности предприятий добычи и переработки урановой руды, а также урановой металлургии остается актуальной уже более 70 лет. При фильтрации растворов из поверхностных хранилищ твердых отходов в подземные воды попадают нитраты, аммоний, нитриты в экстремально высоких концентрациях, а также тяжелые металлы и уран. Препятствием распространению загрязнений в подземных водах могут служить проницаемые барьеры, в основе которых используются различные материалы: цеолиты, керамзит, песок, глины и т.д., а также барьеры типа "стена в грунте", способствующие иммобилизации металлов. При обрастании барьерных материалов микробными биопленками может формироваться биогеохимический барьер в котором бактерии в определенных условиях служат для удаления разных азотных соединений. При комплексном загрязнении окисленными и восстановленными формами азота наиболее эффективной является группа анаммокс-бактерий, осуществляющих процесс анаэробного окисления аммония нитритом. Поскольку анаммокс бактерии растут преимущественно в виде биопленок эффективность биообрастания минерального субстрата в барьере является ключевой.

Целью данной работы является оценка возможностей образования биопленок анаммокс бактерий на различных минеральных носителях, перспективных для использования в проницаемых барьерах в подземных водах. В исследовании были использованы как барьерные материалы (цеолит, керамзит, вермикулит, каолиновые и бентонитовые глины, песок), так и различные синтетические материалы (нетканый полипропилен и др.). Анализ активности биопленок анаммокс сообщества на материалах проводили путем оценки дыхательной активности (МТТ-тест), по скорости удаления аммония и накопления нитрата а также толщину и площадь биопленки оценивали методом сканирующей лазерной конфокальной микроскопии с последующей обработкой программными методами.

Было выявлено, что исследуемые материалы обрастают биопленками с различным соотношением клеток к продуцированному экзополисахаридному матриксу. Среди материалов естественного происхождения наиболее подходящими для *in situ* применения оказались каолиновые глины и керамзит. Путем корреляционного анализа определены закономерности развития биопленок в зависимости от минерального и элементного состава материалов.

## 8.29. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА ПЫЛЬЦЕВОГО АЛЛЕРГЕНА ОЛЬХИ *Aln g 1* И ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ СВЯЗЫВАТЬ ЛИПИДНЫЕ ЛИГАНДЫ

Потанов А.Е.<sup>1,2</sup>, Богданов И.В.<sup>1</sup>, Мельникова Д.Н.<sup>1</sup>, Овчинникова Т.В.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

azotic2000@gmail.com

Гомологи *Bet v 1* составляют важный класс липид-связывающих растительных аллергенов, вызывающих аллергические реакции на пыльцу деревьев и растительные пищевые продукты. Своё название эти аллергены получили вследствие структурной гомологии с основным сенсibilизатором иммунной системы человека среди белков данного класса - главным аллергеном из пыльцы берёзы *Bet v 1*. Как полагают, многие пыльцевые и пищевые аллергены данного класса способны вызывать аллергические реакции у людей с пыльцевой аллергией на *Bet v 1* берёзы. В последнее время в литературе появляется все больше исследований, подтверждающих решающую роль липидных молекул в развитии аллергических реакций на белки, способные связывать липиды.

Для изучения главного аллергена *Aln g 1* из пыльцы ольхи был разработан способ получения его рекомбинантного аналога методом гетерологичной экспрессии в клетках *E.coli*. В качестве штамма-продуцента был выбран родительский штамм *Clear coli BL21(DE3)*, позволяющий получать рекомбинантные белки, свободные от пирогенных бактериальных эндотоксинов. Трансформацию клеток *E.coli* плазмидой *pET-His8-TrxL-Aln g 1* осуществляли методом теплового шока. Затем клетки культивировали на среде LB с 20 мМ глюкозы и 100 мкг/мл ампицилина при температуре 37°C на орбитальном шейкере. Индукцию экспрессии гибридного белка проводили добавлением в питательную среду 0,2 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида. Целевой рекомбинантный белок *Aln g 1* был получен в результате последовательных операций выделения гибридного белка *His8-TrxL-Aln g 1* из растворимой клеточной фракции методом аффинной хроматографии на Ni<sup>2+</sup>-сефарозе, отщепления белка-партнера бромцианом, повторной металлохелатной хроматографии и финальной стадии очистки методом обращённо-фазовой ВЭЖХ. Гомогенность полученного белка была подтверждена с использованием методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и SDS-электрофореза в ПААГ. Для изучения способности рекомбинантного *Aln g 1* связывать липидные молекулы был использован флуоресцентный зонд - 2-п-толуидинилнафталин-6-сульфоновая кислота (TNS). Нами было показано, что аллерген ольхи *Aln g 1* обладает способностью связывать широкий спектр жирных кислот, а также дизолипиды.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (проект № 20-45-05002).

### 8.30. БАЛАНСИРОВКА ОТНОСИТЕЛЬНОГО УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ЦЕПЕЙ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГОНАДОТРОПИНОВ

*Синегузова М.В.<sup>1</sup>, Орлова Н.А.<sup>1</sup>, Кочина Я.А.<sup>1</sup>, Воробьев И.И.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
mvsineg@gmail.com

Тиреотропный гормон человека (ТТГч) и хорионический гонадотропин человека (ХГч) представляют собой нековалентно связанные гетеродимерные белки с общей для семейства гонадотропинов альфа-цепью и специфической для каждого гормона бета-цепью. ТТГч и ХГч используются для терапии раковых заболеваний щитовидной железы и проведения экстракорпорального оплодотворения. Ранее нами были созданы линии клеток СНО, секретирующие родственные ТТГч и ХГч фолликулолестимулирующий гормон и лютеинизирующий гормон, и было установлено, что система экспрессии с реинициацией трансляции второго целевого гена значительно более продуктивна, чем система экспрессии с двумя независимыми оперонами. Одновременно с этим было установлено, что эффективное образование гетеродимерного фолликулолестимулирующего гормона происходило только при расположении цистронов в генетической кассете как "промотор - альфа цепь - сайт внутреннего связывания рибосом - бета цепь", при этом большая часть альфа-цепи гормона обнаруживалась в культуральной среде в свободной форме. Цель настоящей работы - выявление зависимости уровня секреции цепей гормонов от расположения соответствующего цистрона в многоцистронной генетической кассете и поиск способов балансировки относительного уровня биосинтеза и секреции цепей гонадотропных гормонов.

Для ТТГч было обнаружено, что относительные уровни биосинтеза гетеродимерного гормона и свободной альфа-цепи практически одинаковы для генетических кассет, содержащих в качестве первого цистрона альфа- и бета-цепи, при этом амплификация кассет в геноме многократно увеличивает уровень секреции ТТГч и свободной цепи, но практически не меняет соотношение уровней гетеродимерной формы и свободной альфа-цепи. Конечный титр ТТГч составил 18 мг/л за три дня простого периодического культивирования. В случае ХГч гетеродимерный целевой белок детектировался только при расположении гена альфа-цепи в первом цистроне, при этом максимальный титр ХГч после геномной амплификации составил только 3 мг/л, а отношение концентрации свободной альфа-цепи и гетеродимера ХГч около 4:1. Для балансировки относительных уровней секреции цепей ХГч клетки были трансфицированы плазмидой, кодирующей бета-цепь ХГч с селекционным маркером глутаминсинтазы, и получена популяция клеток, секретирующая ХГч с титром до 6 мг/л при практически одинаковом уровне секреции свободных цепей гормона. Найденный в работе способ балансировки уровня биосинтеза и секреции цепей гетеродимерных гонадотропных гормонов может быть применен и для других гормонов данного семейства.

### 8.31. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ ДЛЯ ДОСТАВКИ НАНОЧАСТИЦ

Синицына А.П.<sup>1</sup>, Иванов И.Н.<sup>1,2,3</sup>, Зелепукин И.В.<sup>1,3</sup>, Шипунова В.О.<sup>1,3,4</sup>, Деев С.М.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>НИЯУ МИФИ, Москва

<sup>2</sup>РНИМУ имени Н.И. Пирогова, Москва

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

<sup>4</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный  
anastasi212@rambler.ru

Наночастицы являются одним из перспективных средств терапии и диагностики различных заболеваний.

Одной из проблем, препятствующих внедрению в медицинскую практику наноматериалов, является нехватка инструментов для их доставки внутрь клеток. Мы создали новый метод транспортировки наночастиц внутрь клеток при помощи изолированных митохондрий. Выбор митохондрий как инструмента доставки был обусловлен генотипическим родством митохондрий и их естественным присутствием в кровотоке млекопитающих.

Митохондрии были выделены из печени мыши путём гомогенизации ткани и последующего отделения их фракции центрифугированием. Мы проводили все манипуляции при температуре 4°C во избежание активации повреждающих фосфолипаз и протеаз. Полученная суспензия содержала изолированные митохондрии. Целостность оргanelл была подтверждена при помощи сканирующего электронного микроскопа.

Следующим шагом стала проверка жизнеспособности изолированных митохондрий. Она была проведена путём измерения флуоресценции при добавлении субстратов или ингибиторов дыхательной цепи. Окраска митохондрий была произведена красителем Rhodamine 123. Мы наблюдали уменьшение относительной флуоресценции при добавлении переносчиков протонов (аскорбиновая, глутаминовая, янтарная, яблочная кислоты в присутствии АДФ) и увеличение при добавлении разобщителей и ингибиторов мембранных комплексов (FCCP, ротенон) вследствие изменения мембранного потенциала. Вышеперечисленное свидетельствует о жизнеспособности изолированных митохондрий и отсутствие их значительных повреждений при выделении.

Нами была проверена возможность доставки наночастиц на поверхности митохондрий внутрь клеток *in vitro*. Митохондрии были окрашены при помощи флуоресцентных наночастиц, отделены от избытка центрифугированием и проинкубированы с клетками человеческой опухоли и мышинного эпителия. Конфокальная микроскопия показала активное проникновение комплекса митохондрий с наночастицами внутрь клеток.

Таким образом, показано, что покрытие изолированных митохондрий наночастицами является инновационным методом внутриклеточной доставки наноматериалов. Использование наночастиц, модифицированных таргетными антителами, позволит применять данную технологию в целях диагностики и терапии злокачественных новообразований.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ, грант 21-74-30016.

*Литература:*

1. Frezza, C., Cipolat, S. & Scorrano, L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* 2, 287-295 (2007)
2. Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Sep 30;1606(1-3):137-46.

### 8.32. ПРИМЕНЕНИЕ 3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ ДЛЯ *IN VITRO* ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Согомонян А.С.<sup>1,2</sup>, Шипунова В.О.<sup>1,2,3</sup>, Деев С.М.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>НИЯУ МИФИ, Москва

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный  
annasogomonyan2012@mail.ru

Трехмерные клеточные сфероиды являются эффективным инструментом в изучении цитотоксических и других свойств противораковых соединений. В отличие от двумерных культур клеток, которые на данный момент являются наиболее распространёнными *in vitro*, в 3D моделях точнее отражено взаимодействие клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс.

Нами был разработан воспроизводимый метод 3D культивирования клеток млекопитающих на основе многообразных форм для заливки агарозного геля. Застывший гель представляет собой матрицу, состоящую из 9 низкоадгезивных U-образных микроячеек размером 2.3x3.3 мм, помещаемую в лунку 12-луночного планшета, для формирования и роста объемных клеточных сфероидов. Полученные матрицы были исследованы на примере клеточной линии карциномы яичников человека SKOVip-kat с экспрессией красного флуоресцентного белка *Katushka* и сверхэкспрессией онкомаркера HER2. Было показано, что данная матрица позволяет получать воспроизводимые сфероиды для мультипараметрического анализа. Была исследована цитотоксичность адресного анти-HER2 иммунотоксина на основе анти-HER2 каркасного белка DARP 9\_29 и фрагмента экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa* - DARP-LoPE на 2D и 3D культурах клеток SKOVip-kat и показана значительная разница в IC50 данного белка.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ 21-74-30016.

### 8.33. НОВЫЕ БАКТЕРИОФАГИ СЕМЕЙСТВА

#### *AUTOGRAPHIVIRIDAE*, ИНФИЦИРУЮЩИЕ *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Тимошина О.Ю.<sup>1</sup>, Шнейдер М.М.<sup>1</sup>, Евсеев П.В.<sup>1</sup>, Михайлова Ю.В.<sup>2</sup>, Касимова А.А.<sup>3</sup>, Книрель Ю.А.<sup>3</sup>, Попова А.В.<sup>4</sup>, Мирошников К.А.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

<sup>3</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

<sup>4</sup>ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск  
lalatimosha@gmail.com

*Acinetobacter baumannii* является одним из наиболее опасных нозокомиальных патогенов, вызывающих разнообразные типы инфекций у госпитализированных пациентов по всему миру. Наиболее остро на данный момент стоит проблема антибиотикорезистентности внутрибольничных штаммов *A. baumannii* к карбапенемам, традиционно считавшимся препаратами выбора для терапии инфекций, связанных с инвазией *A. baumannii*. Возможной альтернативой использованию антибиотиков в лечении инфекций, вызванных устойчивыми к противомикробным препаратам штаммами бактерий, может служить фаготерапия.

Целью исследования был поиск и изоляция из объектов окружающей среды новых бактериофагов семейства *Autographiviridae*, обладающих полисахарид-деградирующими ферментами и специфически инфицирующих штаммы *A. baumannii*.

В ходе работы из образцов сточной и речной воды, собранных на территории г. Москвы, методом обогащения были выделены 10 ранее неизвестных бактериофагов семейства *Autographiviridae*, специфически инфицирующих штаммы *A. baumannii* разных капсульных типов (K9, K14, K15, K16, K20, K26, K33, K37, K86, K128). Препараты бактериофагов были культивированы и очищены с помощью центрифугирования в градиенте CsCl. Геномная ДНК бактериофагов была секвенирована на платформе MiSeq. Геномы бактериофагов были депонированы в международную базу данных GenBank под номерами MZ868724, MK089780, MZ936315, MZ868725, MZ936316, MW345241, MZ86826, MZ967493, MZ936314, MW459163. В геномах бактериофагов обнаружены гены, кодирующие полисахарид-деполимеризующие ферменты. Последовательности генов, кодирующих структурные деацетилазы, были амплифицированы, клонированы в вектор pTSL, соответствующие белки были экспрессированы в клетках *E.coli*, очищены путем металло-хелатной и ионнообменной хроматографии. Показана активность рекомбинантных ферментов в отношении расщепления капсульных полисахаридов соответствующих штаммов *A. baumannii*, получены продукты расщепления капсульных полисахаридов, их химическая структура установлена методом ЯМР.

### 8.34. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ДЕФЕНСИНОВ ГОРОХА И АРАХИСА

Фатеева С.И.<sup>1,2</sup>, Финкина Е.И.<sup>1</sup>, Канушкина М.Д.<sup>1</sup>, Овчинникова Т.В.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
finkina@mail.ru

В последнее время в медицинской практике все чаще встречаются инвазивные микозы, которые развиваются на фоне ослабления иммунитета или иммунодефицитных состояний у ВИЧ-инфицированных, людей, перенесших трансплантацию органов и имеющих аутоиммунные заболевания, а также у больных с тяжелым течением COVID-19. Конвенциональные противогрибковые препараты требуют длительного применения в высоких дозах, характеризуются токсичностью, вызывают серьезные побочные эффекты и оказываются неэффективными в случае инфекций, вызванных мультирезистентными штаммами грибов. Перспективными объектами для исследований в качестве прототипов новых антимикотиков являются растительные дефенсины - основные пептиды с массой около 5 кДа, которые имеют компактную, устойчивую структуру, стабилизированную дисульфидными связями, и обладают выраженным противогрибковым действием не только в отношении фитопатогенов, но и ряда патогенных для человека штаммов грибов.

Рекомбинантные дефенсины гороха и арахиса были получены биотехнологическим способом путем гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Фрагменты ДНК, кодирующие дефенсины PsD1 гороха и AhD1 арахиса, получали методом синтеза *de novo* с помощью ПЦР. Полученные фрагменты методом безлигазного клонирования встраивали в экспрессирующую плазмиду pET, кодирующую белок-носитель тиоредоксин А и отагистидиновую последовательность под контролем промотора T7. Для проведения экспрессии клетки *E. coli* штамма BL21 трансформировали полученными плазмидами pET-His8-TrxL-PsD1 или pET-His8-TrxL-AhD1 и выращивали на богатой питательной среде, содержащей 20 мМ глюкозу и 100 мкг/мл ампициллина, при 28-30°C. Индукцию экспрессии осуществляли, добавляя 0,2 мМ изопропил-β-D-1-тиогиалактопиранозид. Очистку рекомбинантных PsD1 и AhD1 проводили из растворимой фракции клеточного белка, используя металлохелатную хроматографию, расщепление гибридных белков бромцианом по искусственно введенному остатку метионина и обращенно-фазовую ВЭЖХ. Высокое качество полученных препаратов рекомбинантных дефенсинов было подтверждено методами SDS-электрофореза в ПААГ, MALDI-TOF масс-спектрометрии и КД-спектроскопии.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 22-25-00654).

### 8.35. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НОВЫХ ИЗОСТЕРИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ РИБАВИРИНА

Фролова В.Д.<sup>1</sup>, Чудинов М.В.<sup>1</sup>, Константинова И.Д.<sup>2</sup>, Фатеев И.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РТУ МИРЭА - Институт тонких химических технологий им. М.В.

Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва

lera1974@icloud.com

В настоящее время модифицированные нуклеозиды представляют большой интерес в качестве противовирусных средств благодаря своей способности ингибировать репликацию вирусной ДНК или РНК. Среди аналогов нуклеозидов наиболее широкое распространение нашел рибавирин, на протяжении многих лет являющийся незаменимым в терапии вирусных инфекций (в т.ч. хронического вирусного гепатита С и геморрагических лихорадок). Флексимерные аналоги рибавирина являются перспективным направлением в создании новых препаратов, так как они позволяют предотвратить развитие лекарственной устойчивости.

Нами показана возможность синтеза рибозидов и 2'-деоксирибозидов ряда бициклических гетероциклических оснований с помощью реакции трансгликозилирования - ферментативной реакции переноса углеводного остатка с природного гетероциклического основания на модифицированное. Реакция катализируется нуклеозидфосфорилазами бактериальных клеток - пуридиннуклеозидфосфорилазой (PNP) и уридинфосфорилазой (UP), обладающими широкой субстратной специфичностью.

Синтезирован рибозид 3-(5-гептил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)-1,2,4-триазола с выходом 60% и чистотой более 95%. Мы ожидаем, что полученное соединение будет активно в отношении ДНК- и РНК-вирусов и, возможно, обладать меньшей токсичностью в сравнении с рибавирином.

## СЕКЦИЯ 9

### БИМЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 9.1. ПОЛЯРИЗОВАННЫЕ МАКРОФАГИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ АНТИ-ЭНДОМЕТРИОЗНЫЙ АГЕНТ

Артемова Д.А.<sup>1,2</sup>, Вишнякова П.А.<sup>3,4</sup>

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

<sup>2</sup>НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына, Москва

<sup>3</sup>НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.

Кулакова Министерства здравоохранения РФ, Москва

<sup>4</sup>Российский университет дружбы народов (РУДН), Москва

artiomova.darya@yandex.ru

Эндометриоз - это эстроген-зависимое хроническое воспалительное заболевание, характеризующееся наличием стромы и желез эндометрия вне эндометрия. Показано, что для эндометриоза, как и для опухолевого роста, характерно преобладание в очагах эндометриоза макрофагов с противовоспалительным фенотипом (M2). Уже известно, что активированные макрофаги с провоспалительным фенотипом (M1) обладают противоопухолевым действием. В связи с этим задачами нашей работы были: (1) оценить профиль экспрессии макрофагов в очагах эндометриоза на мышинной модели эндометриоза; (2) проверить эффективность введения репрограммированных M1-макрофагов в качестве возможного анти-эндометриозного агента.

Мы изучали фенотипический профиль макрофагов в очагах эндометриоза и анти-эндометриозную активность M1 макрофагов на аллогенной модели эндометриоза мыши *in vivo*, индуцированного у овариэктомизированных мышей после внутрибрюшинной трансплантации матки мыши с хроническим введением 17 $\beta$ -эстрадиола. Анализ фенотипического профиля макрофагов проводили с использованием иммуногистохимического окрашивания, вестерн-блоттинга и ПЦР. Нами было показано, что в очагах преобладают макрофаги с противовоспалительным фенотипом, что подтверждалось усилением продукции M2 маркера аргиназы 1. После верификации развития эндометриоза у мышей экспериментальной группе животных вводили M1-поляризованные макрофаги, а контрольной группе - неполяризованные макрофаги, затем наблюдали за животными в течение двух недель. Для получения M1-поляризованных макрофагов клеточную линию макрофагов RAW264 инкубировали с липополисахаридом (100 нг/мл) в течение 24 ч, что подтверждалось значимым повышением уровня маркеров MARCO, iNOS. После терапии животных M1 макрофагами мы обнаружили, что количество очагов и их размеры значимо уменьшились ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными животными. В своей работе мы доказали преобладание противовоспалительных макрофагов в очагах эндометриоза и получили первые результаты положительного влияния M1 макрофагов на регресс очагов эндометриоза.

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства РУДН и Министерством здравоохранения Российской Федерации (госзадание № 121040600409-1).

## 9.2. ИЗУЧЕНИЕ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА И ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ В МОДЕЛИ *IN VITRO*

Бирюкова В.Н.<sup>1</sup>, Дроздова М.Г.<sup>2</sup>, Толстова Т.В.<sup>2</sup>, Черногорцева М.В.<sup>3</sup>, Демина Т.С.<sup>4</sup>, Сажнев Н.А.<sup>3</sup>, Кильдеева Н.Р.<sup>3</sup>, Марквичева Е.А.<sup>2</sup>

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

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

<sup>3</sup>РГУ им. А.Н. Косыгина (Технология. Дизайн. Искусство), Москва

<sup>4</sup>Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова, Москва

vbiryukova2000@gmail.com

Фиброин (Фб) - фибриллярный белок, который обеспечивает жесткость и прочность шелковых нитей. Благодаря хорошим механическим свойствам, биосовместимости и биоразлагаемости, Фб является перспективным материалом для тканевой инженерии. Матрицы на основе природных биоразлагаемых полисахаридов являются перспективными биоматериалами для тканевой инженерии. В частности, известно, что Хитозан (Хит) обладает антибактериальной и биоадгезивной активностью, а гиалуроновая кислота (ГК) является основным внеклеточным компонентом соединительной ткани и участвует в процессах роста, пролиферации и дифференцировки.

Цель работы - получение различными методами и исследование структуры и свойств матриц на основе Фб, Хит и ГК, а также культивирование в них животных клеток в модели *in vitro*. Матрицы получали из Фб, Хит (320 кДа) и ГК (30 кДа). Структуру матриц (средний размер пор и их распределение по размерам) изучали с помощью конфокальной лазерной микроскопии, а цитотоксичность исследовали путем тестирования экстрактов на фибробластах мыши линии L929. Культивирование клеток линии L929 и иммортализованных мезенхимальных стволовых клеток линии hTERT-MCK в матрицах проводили в течение 7 дней. Распределение, адгезию и рост клеток в матрицах оценивали качественно с помощью конфокальной микроскопии, а количество жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ теста. Показано, что все матрицы поддерживали адгезию, рост и пролиферацию фибробластов и стволовых клеток.

### 9.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕТРАМЕРНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ АВИДНОСТИ ТАРГЕТНЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Бутылин А.А.<sup>1</sup>, Фролова А.Ю.<sup>2</sup>, Мартынов В.И.<sup>2</sup>, Пахомов А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
a.butylin2002@gmail.com

На сегодняшний день известно, что повышение экспрессии протоонкогена ErbB2, человеческого рецептора эпидермального фактора роста типа 2 (HER2/neu), играет важную роль в патогенезе ряда агрессивных опухолей. В данной работе онкомаркер HER2/neu использовался как терапевтическая мишень для адресной доставки белковых препаратов на основе нацеливающего искусственного белка DARPIn 9\_29 (Designed Ankyrin Repeat Protein). Для увеличения авидности препаратов к раковым клеткам использовали самособирающиеся в тетрамерные комплексы флуоресцентные белки. Были получены гибридные структуры, собирающиеся в комплексы с 4 и 8 лигандами DARPIn 9\_29. В качестве основы использовали флуоресцентные белки zoanGFP или zoan2RFP, которые формируют прочные тетрамерные комплексы. Были получены генно-инженерные конструкции, кодирующие DARPIn 9\_29 на N- и/или C-конце флуоресцентного белка в различных комбинациях (zoanGFP/RFP-DARPIn, DARPIn-zoanGFP/RFP, DARPIn-zoanGFP/RFP-DARPIn). Целевые гены клонировали в вектор pET24b. Нарработку белковых конструкций осуществляли в бактериальных клетках *E.coli* штамма BL21 (DE3) с применением ИПТГ в качестве индуктора экспрессии. На данном этапе были наработаны и выделены все белковые конструкции в количествах, необходимых для дальнейших исследований. Связывание полученных конструкций с раковыми клетками, гиперэкспрессирующими рецептор HER2/neu, проверяли на клеточной линии SK-BR-3.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект № 18-29-09166.

#### 9.4. ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ ХИТОЗАНА В КОМПЛЕКСНОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ РАН

Ванюшенкова А.А., Белов А.А.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,  
Москва  
AVanishenkova@yandex.ru

Создание комплексных систем доставки лекарственных средств непосредственно к пораженному органу является одной из приоритетных задач современной разработки лекарственных композиций.

В последние годы сохраняется значительный интерес к использованию хитозана, как антимикробного агента. Эти его свойства, наряду с нетоксичностью, биосовместимостью, гипоаллергенностью и биodeградируемостью, позволяют использовать его в биомедицинских целях в качестве вспомогательного компонента при антимикробной терапии, в особенности по отношению к резистентным бактериальным штаммам.

Известно, что низкомолекулярный хитозан обладает способностью к альтернативной активации нейтрофилов при непосредственном контакте с ним, что запускает каскад репаративно-регенеративных процессов в воспалительной фазе и способствуют накоплению коллагена в раневом ложе на этапе регенерации. Также он увеличивает степень проницаемости кровеносных сосудов, облегчая облегченную диффузию активного вещества в кровяное русло.

В нашей работе было показано, что иммобилизация хитозана на матрицу используемого нами целлюлозного носителя способствует стабилизации системы, значительно снижая скорость деструкции полимера. Благодаря этому, в среду выделяются более крупные "осколки", оказывающие существенно меньшее ингибирующее воздействие на ферментативную активность.

Из этого следует, что введение хитозана в состав ранозаживляющей композиции позволяет обеспечить пролонгированный терапевтический эффект, с сохранением значимой биологической активности наиболее лабильного компонента системы. Помимо этого, внедрение хитозана нивелирует возможные механические повреждения новообразованного эпителия.

Было изучено влияние композиций на основе хитозана на различные микроорганизмы гноеродной микрофлоры, в том числе и *Staphylococcus Aureus*. Установлено, что внедрение хитозана способствует увеличению антимикробного действия препарата, предположительно за счет образования олигохитозанов, обладающих значительно большим биоцидным действием, нежели высокомолекулярный биополимер, при взаимодействии с входящим в состав композиции ферментом.

## 9.5. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ HIF1 В МОДЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО ТЯЖЕЛОЙ ГИПОКСИЕЙ, ПРЕДОТВРАЩАЕТ СУПРЕССИЮ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ И АПОПТОЗ НЕЙРОНОВ В ГИППОКАМПЕ КРЫС

**Ветровой О.В.**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург  
vetrovoyov@infran.ru

Пентозофосфатный путь (ПФП) метаболизма глюкозы представляет собой ключевой источник НАДФН в мозге. НАДФН является незаменимым субстратом ферментативных реакций, направленных на поддержание эффективной антиоксидантной защиты и предотвращение окислительного стресса. В работе на крысах линии Wistar нами показано, что тяжелая гипобарическая гипоксия (ТГ) и последующая реоксигенация, вызывающие краткосрочное увеличение количества регуляторной альфа субъединицы HIF1 (HIF1 $\alpha$ ) в CA1 поле гиппокампа, индуцируют снижение количества и активности Г6ФДГ и количества НАДФН, что сопровождается окислительным стрессом и запуском апоптоза. Инъекция ингибитора HIF1 топотекана перед ТГ предотвращает увеличение количества HIF1 $\alpha$ , снижает экспрессию маркера транскрипционной активности HIF1, эритропоэтина, нормализуя количество и активность Г6ФДГ и увеличивая уровень НАДФН, что сопровождается нормализацией окислительно-восстановительного статуса и снижением свободнорадикального окисления в гиппокампе, а также предотвращением апоптогических процессов и гибели нейронов. Кроме того, с применением модели умеренной гипобарической гипоксии *in vivo* выявлена обратная связь между активностью HIF1 и количеством мРНК Г6ФДГ. Универсальность открытого механизма HIF1-зависимой негативной регуляции экспрессии Г6ФДГ подтверждена в *in vitro* экспериментах на культуре клеток НЕК человека, трансфицированных люциферазой под HIF-зависимым промотором. Полученные данные расширяют современные представления о механизмах постгипоксической патологии. Использование индукторов ПФП в ранний постинсультный период может быть рассмотрено в качестве потенциально эффективной стратегии коррекции постинсультных состояний в клинической практике.

Исследования осуществлены с использованием оборудования ресурсных центров "обсерватория экологической безопасности" и "развитие молекулярных и клеточных технологий" научного парка СПбГУ и Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова.

## 9.6. ИЗУЧЕНИЕ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТИ, СВЯЗАННОЙ С СИНДРОМОМ КОФФИНА-СИРИСА, В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Григорьев Я.А.<sup>1,2</sup>, Бусыгин С.А.<sup>1,2</sup>, Деев Р.В.<sup>1</sup>, Лебедева Л.А.<sup>1</sup>,  
Шидловский Ю.В.<sup>1,3</sup>

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

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

<sup>3</sup>Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет),  
Москва

yaroslavgrig@icloud.com

Синдром Коффина-Сириса является редким врождённым мультисистемным генетическим заболеванием, характеризующимся задержкой в развитии и умственной отсталостью. Причиной развития синдрома являются мутации в генах, кодирующих субъединицы хроматинремоделирующего комплекса BAF. В случае данной патологии прежде всего затрагиваются гены ARID1B и ARID1A. Для изучения роли ARID1 в нейрогенезе был использован модельный организм *D. melanogaster*. Специфические хроматинремоделирующие комплексы BAP и PBAP дрозофилы содержат перекрывающийся набор центральных субъединиц и АТФазы, но также несут специфические субъединицы osa и D4 (для BAP) или PB, Var170 и SAYP (для PBAP). Osa является ортологом белка BAF250b/ARID1 человека у *D. melanogaster*. Его нокаунт путем РНК-интерференции в постмитотических нейронах грибовидного тела мозга дрозофилы, являющегося критической структурой мозга для обучения и памяти, вызывает возрастную потерю аксонов в грибовидном теле и влияет на долговременную память. Для получения новой модели заболевания был использован метод геномного редактирования CRISPR/Cas9. С его помощью мы воспроизводим на молекулярном уровне те нарушения, которые происходят в случае синдрома Коффина-Сириса в мозге дрозофилы. В ходе работы модифицируется ген *osa D. melanogaster*. Для этого в линию мух, экспрессирующую Cas9, вносились две плазмиды: рНД и рU6. Первая плазида несёт области, кодирующие эпитопы V5 и FLAG и ауксин-индуцибельный дегрон, а также репортёрный ген DsRed, loxP-сайты, сайты AttB и гомологичные плечи для рекомбинации. Вектор рU6 является матрицей для синтеза геновой РНК. Наш подход, являющийся альтернативой методу РНК-интерференции, позволит создать линию мух, экспрессирующих меченый белок *osa*, который может быть селективно деградирован на определенной стадии развития.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-54-7803.

## 9.7. ТЕСТИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА ИНКАПСУЛЯЦИИ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА В АЛЬГИНАТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ

*Ермакова П.С.<sup>1</sup>, Леньшина Н.А.<sup>2</sup>, Конев А.Н.<sup>2</sup>, Батенькин М.А.<sup>2</sup>,  
Чесноков С.А.<sup>2</sup>, Загайнов В.Е.<sup>1</sup>, Загайнова Е.В.<sup>1,3</sup>, Кашина А.В.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева, Нижний Новгород

<sup>3</sup>Нижегородский исследовательский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород  
bardina-polina@mail.ru

Трансплантация инкапсулированных островков Лангерганса (ОЛ) при лечении сахарного диабета (СД) первого типа позволяет преодолеть отторжение трансплантата без необходимости применения иммуносупрессивных препаратов. Поэтому тестирование потенциальных инкапсулирующих систем и оценка качества ОЛ в них является необходимым этапом в создании технологии лечения СД посредством трансплантации инкапсулированных ОЛ.

**Цель:** Тестирование эффективности инкапсуляции ОЛ в альгинатные микрокапсулы, оценка их жизнеспособности внутри микрокапсул и проницаемости микрокапсул.

**Материалы и методы:** ОЛ получали из поджелудочной железы свиньи породы Визенау, возрастом 5-9 месяцев. Выведение ОЛ проводилось ручной фрагментацией и ферментацией коллагеназой V и очисткой от экзокринной ткани. Инкапсуляция ОЛ производилась микрофлюидным методом на основе низкомолекулярного альгината 2% с покрытием поли-L-лизинном (концентрации от 0,05 до 3%). Оценивалась эффективность инкапсуляции при нагрузках 2 - 25 тыс. ОЛ/мл альгината путем подсчета пустых капсул и капсул с ОЛ. Жизнеспособность ОЛ внутри капсул оценивалась МТТ-тестом. Проницаемость капсул оценивалась с помощью FITC-меченых лектинов молекулярной массой 35; 75; 120; 150 кДа.

**Результаты:** Исследования по эффективности инкапсуляции показали, что оптимальной нагрузкой является 15-20 тысяч ОЛ на мл альгината. При этом жизнеспособность ОЛ сохраняется не менее чем на 80%. Было подтверждено, что альгинатные микрокапсулы, покрытые поли-L-лизинном проницаемы для низкомолекулярных лектинов (35 и 75 кДа) и не проницаемы для высокомолекулярных лектинов (120 и 150 кДа), что позволяет питательным веществам и инсулину диффундировать через мембрану и ограничивает проницаемость антител.

**Заключение:** Полученные данные о качестве и эффективности инкапсуляции ОЛ в альгинатные микрокапсулы в дальнейшем могут быть использованы для разработки технологии инкапсуляции островковых клеток поджелудочной железы.

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения РФ (государственное задание № АААА-А20-120022590096-6).

## 9.8. ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫХ ИНСУЛИНА И ГАНГЛИОЗИДОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА В ПЕЧЕНИ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-ГО ТИПА

Ильсов И.О.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург  
Ilyasov.igor.99@mail.ru

Уровень заболеваемости сахарным диабетом 2-го типа (СД2) значительно вырос за последние десятилетия и приобрел масштабы эпидемии. Поскольку СД2 сопровождается серьезными осложнениями в деятельности сердечно-сосудистой и нервной систем, разработка новых методов лечения, особенно на стадии пре-диабета, является важной и актуальной задачей современной фармакологии. При диабете на фоне гиперинсулинемии в крови снижается уровень инсулина в мозге, что приводит к нарушениям функциональной активности нейронов и центральной регуляции метаболизма глюкозы. Недостаток инсулина в мозге может компенсироваться за счет интраназальных введений. Однако наиболее перспективным представляется совместное использование инсулина с веществами природного происхождения, усиливающими его действие на ЦНС, к числу которых относятся и ганглиозиды. В ходе проведенного исследования оценивался эффект 4-х недельного раздельного и совместного интраназального введения инсулина (ИВИ, 0,5 МЕ/животное) и суммарного препарата ганглиозидов мозга быка (ИВГ, 6 мг/кг) на экспрессию генов, регулирующих метаболизм глюкозы в печени крыс линии Вистар при сахарном диабете 2-го типа. Использование ПЦР-РВ позволило выявить увеличение экспрессия гена инсулинового рецептора (*InsR*) в печени крыс диабетических животных после ИВГ, причем она возрастала в 1,5 раза с одинаковой достоверностью ( $p < 0,05$ ) не только по отношению к контрольной группе, но и по сравнению с диабетическими животными в группах, получавших инсулин (Д+Инс) или одновременно инсулин с ганглиозидами (Д+Инс+Г). Как совместное введение инсулина и ганглиозидов, так и отдельное ИВГ способствовало значительному снижению экспрессии гена глюконеогенеза фосфоенолпируват карбоксикиназы (*PCK*) у диабетических и здоровых животных, по сравнению с контрольной и диабетической группами. Аналогичный эффект, направленный на снижение экспрессии гена глюкозо-6-фосфатазы (*G6PC*) при диабете, наблюдался при введении ганглиозидов. В случае гена глюконеогенеза фруктоза-бис-фосфатаза (*FBPase*) при всех типах введений как у здоровых, так и у крыс с СД2 не выявлено никаких изменений. Таким образом, апробированный впервые ИВГ может рассматриваться в качестве перспективного способа, наравне с ИВИ, для нормализации метаболизма глюкозы при диабетических патологиях.

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290427-7.

## 9.9. ОЦЕНКА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ПАРАМЕТРОВ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ТЕСТОВ У МОЛОДЫХ САМОК И САМЦОВ МЫШЕЙ СВРВ

Калинин М.А.<sup>1,2</sup>, Аронов Д.А.<sup>1</sup>, Моисеева Е.В.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА им. К.И. Скрябина, Москва  
Mic\_Kalinin@mail.ru

Одной из проблем планирования поведенческих тестов для нейробиологии является выбор пола и возраста экспериментальных мышей. С одной стороны, считается, что показатели самок характеризуются гетерогенностью вследствие циклического изменения половых гормонов, а для самцов более свойственно агрессивное поведение и социальное доминирование отдельных особей. С другой стороны, в ряде исследований показано, что пол мышей не влияет на результаты поведенческих тестов значительно. Цель данного исследования - оценить разброс показателей поведенческих тестов у самок и самцов мышей линии СВРВ одного возраста.

**Материалы и методы.** Использовали молодых самок и самцов мышей линии СВРВ в возрасте  $14,3 \pm 0,1$  недель. Оценивали физиологические показатели (масса тела, температура, и др.), проводили оригинальные поведенческие экспресс-тесты: тест "Квадрат" для оценки тревожности; тест "Цилиндр", разработанный для оценки двигательной и исследовательской активности; и тест "Туннель" для оценки особенностей походки. Оценка различий между группами проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни, оценку разницы дисперсий показателей разных групп проводили с помощью критерия Левена. Степень изменчивости данных внутри группы выражали с помощью коэффициента вариации для самцов (CVm) и самок (CVf), рассчитанного как процентное отношение стандартного отклонения к среднему.

**Результаты.** Самцы характеризовались большей массой тела ( $27,1 \pm 0,4$  г) по сравнению с самками ( $21,2 \pm 0,2$  г,  $p < 0,001$ ), большой изменчивостью массы тела (CVm = 5,2%; CVf = 4,1%;  $p = 0.017$ ) и температуры тела (CVm = 2,1%; CVf = 1,4%;  $p = 0.028$ ). Изменчивость вертикальной активности в тесте "Цилиндр" была выше в группе самцов (CVm = 72%; CVf = 52%;  $p = 0.030$ ), при этом абсолютные значения исследовательской активности были выше у самок ( $14,9 \pm 1,7\%$ ), чем у самцов ( $9,7 \pm 2,0\%$ ;  $p = 0.02$ ). Значимых различий и значимой вариабельности показателей в тестах "Квадрат" и "Туннель" не было обнаружено.

**Выводы.** Самцы и самки мышей одного возраста отличаются по ряду показателей поведенческих тестов, при этом самцы характеризуются более выраженной вариабельностью как физиологических, так и поведенческих параметров, что необходимо учитывать при планировании нейробиологического исследования.

## 9.10. ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ С ЛЕКАРСТВАМИ ММАЕ И ММАF И ОЦЕНКА ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ПАНЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С РАЗЛИЧНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГАНГЛИОЗИДА GD2

*Калиновский Д.В.<sup>1</sup>, Холоденко И.В.<sup>2</sup>, Гречихина М.В.<sup>1</sup>, Доронин И.И.<sup>1</sup>, Деев С.М.<sup>1</sup>, Холоденко Р.В.<sup>1,3</sup>*

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

<sup>2</sup>НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

<sup>3</sup>ООО "Реал Target", Москва

dcalinovschi@yahoo.com

В последние несколько лет наблюдается бурный рост в области разработки конъюгатов антител с лекарствами (ADC) для терапии рака, обусловленный как появлением более эффективных цитотоксических агентов и линкеров, так и новых подходов конъюгации лекарств и антител. Монометил ауристин E либо F являются одними из наиболее исследуемых лекарств, при этом их незначительное структурное отличие друг от друга часто обуславливает разную эффективность в терапии. Ганглиозид GD2 широко распространен на различных типах рака. GD2-экспрессирующие опухоли составляют не менее 10% всех злокачественных новообразований человека, что определяет широкий спектр разработок для их иммунотерапии. Однако практически отсутствуют исследования в области GD2-специфичных ADC.

С использованием химерных GD2-специфичных антител ch14.18 нами были получены ADC за счет конъюгации низкомолекулярных ингибиторов ММАЕ или ММАF к межпочечным цистеинам антител посредством тиол-малеимидной химии. В ходе оптимизации условий реакции были получены стабильные конъюгаты ММАЕ-ADC и ММАF-ADC с различным соотношением лекарства и антитела (drug-to-antibody ratio, DAR). Для дальнейшего анализа были выбраны молекулы, преимущественно характеризующиеся DAR 4. Оценка DAR в конъюгатах проводилась посредством спектрофотометрического анализа, а также коррелировала со степенью пришивки флуорофоров FAM либо Dox; высокое связывание конъюгатов с антигеном GD2 было подтверждено в ходе прямого ИФА и цитофлуориметрического анализа GD2-положительных клеточных линий. Поскольку эффективность GD2-направленной терапии может коррелировать с уровнем экспрессии ганглиозидов GD2 на поверхности опухолевых клеток различного происхождения, анализируемые линии были дифференцированы по экспрессии ганглиозидов GD2 посредством проточной цитофлуориметрии. Уровень экспрессии ганглиозидов GD2 оценивался на человеческих линиях нейробластом IMR-32, SH-SY5Y и NGP-127, глиом T98G, 1321N1 и U87MG, сарком U2OS, MG-63 и HOS, рака молочной железы Hs578T, MCF-7 и SKBr3 и меланом COLO-38, mS и A375, а также на мышиных линиях лимфомы EL-4 и меланом B16, B78-D14 и M3. Далее был проведен анализ цитотоксических эффектов полученных конъюгатов ММАЕ-ADC и ММАF-ADC на представленной панели раковых клеточных линий в ходе МТТ-теста. Результаты, полученные в серии экспериментов по оценке жизнеспособности человеческих и мышиных опухолевых клеток в присутствии анти-GD2 ADC, показали строгую корреляцию между цитотоксическими эффектами ADC и уровнем экспрессии ганглиозидов GD2 на опухолевых клетках.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00758.

## 9.11. РАЗРАБОТКА МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ТАРГЕТНЫХ АГЕНТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

*Котельникова П.А.<sup>1</sup>, Шипунова В.О.<sup>1,2,3</sup>, Деев С.М.<sup>1,3</sup>*

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

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

<sup>3</sup>НИЯУ МИФИ, Москва

kotelnikova@phystech.edu

Локализованный поверхностный плазмонный резонанс в наночастицах благородных металлов приводит к резонансному рассеянию света или переходу его энергии в тепловую. Это позволяет использовать такие наночастицы в качестве биосенсоров, диагностических и терапевтических агентов. Плазмонные свойства серебряных наночастиц непосредственно связаны с их формой, размерами и покрытием. Возможность настройки оптических свойств наночастиц серебра позволяет создавать наноконструкции для решения различных задач биомедицины.

Наночастицы серебра одновременно могут оказывать цитотоксическое действие и выступать в качестве фотосенсибилизирующего агента для фотодинамической и фототермической терапии. Сочетание действия локальной гипертермии, окислительного стресса и токсичных ионов серебра может приводить к гибели раковых клеток, резистентных к традиционным методам лечения.

Работа посвящена получению стабильных в физиологических условиях серебряных наночастиц и модификации их нацеливающими белками, в том числе неиммуноглобулиновой природы, для адресного воздействия на раковые клетки. Показана специфичность по отношению к HER2-положительным раковым клеткам, изучены фотосенсибилизирующие и цитотоксические свойства полученных конструкций.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-34-90029 (культивирование клеток, тесты по исследованию цитотоксичности) и гранта РНФ 17-74-20146 (синтез наночастиц).

## 9.12. СФЕРОИДЫ КАК 3D *IN VITRO* МОДЕЛИ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Кудан С.П.<sup>1</sup>, Кудан Е.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Школа № 1568 им. Пабло Неруды, Москва

<sup>2</sup>3D Bioprinting Solutions – Лаборатория биотехнологических исследований, Москва  
kudan956@yandex.ru

Разработка новых лекарственных средств - очень важный и длительный процесс. От начала выявления рабочих веществ до выдачи регистрационного удостоверения проходит обычно около 15 лет. За это время происходят доклинические исследования препарата на монослое клеток, затем на лабораторных животных, после этого клинические исследования на людях, и если препарат окажется эффективным, то компания подаёт заявку на регистрационное удостоверение. Однако результаты, полученные при тестировании на монослое клеток, не всегда хорошо коррелируют с результатами клинических исследований. В связи с этим всё большее распространение получают 3D модели, отражающие все виды межклеточных взаимодействий и взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом, что дает возможность адекватнее моделировать специфическую архитектуру ткани. Одной из таких моделей являются сфероиды - шарообразные плотноупакованные агрегаты из клеток.

В настоящей работе разработаны два алгоритма тестирования лекарственных препаратов на сфероидах. Первый из них является чувствительным, быстрым, но дорогим. Он включает в себя формирование сфероидов с помощью планшетов с низкоадгезивным покрытием, добавление различных концентраций тестируемых препаратов и затем анализ их антипролиферативной активности с помощью тест-системы CellTiter-Glo 3D или цитотоксической активности с помощью тест-системы CellTox Green. Второй алгоритм - менее чувствительный, медленный на стадии анализа, но более дешевый и не требующий лизирования сфероидов. Он включает в себя формирование сфероидов с помощью агарозных форм, добавление различных концентраций тестируемых препаратов и затем анализ их антипролиферативной активности с помощью резазурина.

Используя разработанные алгоритмы, была проведена оценка антипролиферативной и цитотоксической активности препаратов цисплатина, доксорубина, фторурацила и этопозида на клеточных линиях Vero CCL-81 и HEK293 в условиях 2D и 3D культивирования. Сравнительный анализ значений  $IC_{50}$  и  $CC_{50}$  для двух методов культивирования показал, что антипролиферативная активность цитостатиков была выше в 2D, в то время как цитотоксичность ярче проявлялась в 3D, позволяя предположить, что использование сфероидов даст возможность выявлять цитотоксичность соединений на более ранних стадиях доклинического анализа.

### **9.13. ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 ПРИ ОСТРОМ ПОРАЖЕНИИ ПОЧКИ**

***Курганова Э.А.<sup>1</sup>, Гордеева А.Е.<sup>2</sup>, Новосёлов В.И.<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

<sup>2</sup>ФИЦ "ПушНЦ биологических исследований РАН" - Институт биофизики

клетки РАН, Пушкино

kurganova.ezhena@yandex.ru

Ишемически-реперфузионное поражение (ИРП) - совокупность патологических процессов, развивающихся при нарушении притока оксигенированной крови в орган, с последующим его восстановлением. С проблемой ИРП почки связан ряд клинических случаев в том числе дисфункция удаленных органов. В основе ИРП лежит повреждающий эффект окислительного стресса. Одно из перспективных направлений в снижении ИРП - нейтрализация окислительного стресса с помощью ферментов-антиоксидантов. Цель работы - исследовать влияние экзогенного фермента-антиоксиданта пероксиредоксинаб (Ргхб) на снижение поражения ренальной и печеночной ткани при ИРП.

В работе использовали модель ИРП правой почки крысы с предварительной левосторонней нефрэктомией. Животным внутривенно за 15 минут до ишемии (45 мин) вводили раствор Ргхб (1 мг/мл). Период реперфузии 24 часа. Животные были разделены на 3 группы: №1 - контроль; № 2 - И-Р; № 3 -И-Р+Ргхб.

По данным биохимического анализа в группе №2 через 24 часа реперфузии в крови отмечается рост концентрации мочевины в 3,8 раза, креатинина в 2 раза относительно контроля. При использовании Ргхб было отмечено снижение уровня почечных метаболитов до контрольных значений. ИРП почки влияет на активность печеночных ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаргатаминотрансферазы (АСТ) в крови. В группе №2 через 24 часа реперфузии наблюдается рост активности АЛТ в 2 раза, АСТ в 2,5 раза относительно контроля. При введении Ргхб активность АЛТ не изменяется, напротив для АСТ уменьшается в 1,5 раза. Гистологический анализ показал, что в группе №2 через 24 часа реперфузии в ренальной ткани отмечается повреждение структур нефрона; в печени выражена сосудистая реакция, дистрофия гепатоцитов. Предварительное введение белка-антиоксиданта Ргхб перед ишемией показывает снижение структурных повреждений ренальной и печеночной паренхимы.

Таким образом, применение экзогенного белка-антиоксиданта Ргхб до ишемически-реперфузионного поражения почек способствует сохранению морфофункционального состояния ренальной и печеночной ткани.

## 9.14. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ, pH И ЛИПИДНЫХ ЛИГАНДОВ НА СВОЙСТВА РАСТИТЕЛЬНЫХ АЛЛЕРГЕНОВ

Дарионова В.А.<sup>1,2</sup>, Финкина Е.И.<sup>1</sup>, Игнатова А.А.<sup>1</sup>, Овчинникова Т.В.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва  
finkina@mail.ru

Аллергические заболевания получают все большее распространение. Согласно статистике около 35% населения во всем мире сталкиваются с клиническими проявлениями аллергии. Ключевым этапом в развитии аллергии является сенсибилизация, которая происходит при первичном проникновении аллергена в организм. На то, будет ли конкретный белок воспринят организмом как аллерген, влияют не только его физико-химические и структурные особенности, но и сопутствующие обстоятельства. Поэтому, изучение механизмов сенсибилизации и выявление факторов, влияющих на аллергенные свойства белков, являются актуальными задачами экспериментальной аллергологии.

Один из ключевых классов клинически значимых пищевых и пыльцевых растительных аллергенов составляют гомологи основного аллергена пыльцы березы Bet v 1. Характерной особенностью данных белков является наличие в структуре внутренней полости, способной вмещать и удерживать гидрофобные лиганды различной природы. В данной работе мы исследовали влияние температуры, pH и присутствия липидных лигандов на свойства аллергенных гомологов Bet v 1: Bet v 1 и AIn g 1 из пыльцы березы и ольхи, соответственно, а также Gly m 4 сои и Fga a 1 клубники. Все четыре аллергена были получены биотехнологическим способом путем гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli*. С помощью КД-спектроскопии было показано, что при нагревании происходит полная денатурация данных белков. Однако, их структура восстанавливается при последующем охлаждении. Присутствие липидных лигандов предотвращает тепловую денатурацию гомологов Bet v 1. В кислых условиях, имитирующих среду в желудке человека, происходит денатурация пищевых аллергенов Gly m 4 сои и Fga a 1 клубники, и присутствие липидов не влияет на этот процесс. Однако, при нейтрализации pH происходит рефолдинг данных аллергенов. Методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием анти-Bet v 1 кроличьих IgG, а также сывороток пациентов с аллергией, содержащих специфичные к Bet v 1 IgE, было показано, что наименьшее сходство среди исследуемых белков с мажорным аллергеном пыльцы березы Bet v 1 имеет Gly m 4 сои. Также с помощью ELISA было показано, что нагревание и присутствие липидных лигандов приводит к снижению иммунореактивности исследуемых аллергенов.

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

## 9.15. СОЗДАНИЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ФЕРРИТИНА И DARPin 9\_29 ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ К РАКОВЫМ КЛЕТКАМ

*Мамаева А.А.<sup>1</sup>, Фролова А.Ю.<sup>2</sup>, Какуев Д.Л.<sup>2</sup>, Мартынов В.И.<sup>2</sup>, Пахомов А.А.<sup>2</sup>*

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

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинниковой РАН, Москва  
mamaeva.anastas@bk.ru

Ферритин - белковый комплекс, который состоит из 24 субъединиц, самоорганизующихся в сферообразную структуру. Ферритин является основным белком, запасующим железо и сохраняющим его в нетоксичной форме как у прокариот, так и у эукариот. При низких значениях pH ферритиновый комплекс способен обратимо разбираться, благодаря чему его можно "нагружать" низкомолекулярными веществами, например, лекарственными препаратами или флуорофорами.

В настоящей работе была получена гибридная конструкция на основе ферритина, несущего на N-конце искусственный белок DARPin 9\_29 для нацеливания к раковым клеткам, гиперэкспрессирующим онкомаркер Her2/neu. Была получена генно-инженерная конструкция, кодирующая в одной рамке считывания DARPin 9\_29 и ферритин человека FTL (Ferritin light chain). В качестве линкера между DARPin 9\_29 и FTL использовали последовательность, содержащую остатки Ser и Gly, а также шесть остатков His для дальнейшего выделения белка с помощью металл-хелатной хроматографии. Целевой белок нарабатывали в *E.coli*, затем выделяли и очищали с использованием Ni-NTA агарозы. Очищенный белок был помечен флуоресцентным красителем AlexaFluor488 и протестирован на культуре раковых клеток SK-BR-3, гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu, а также на контрольных культурах с нормальной экспрессией рецептора HER2/neu. Показано, что полученную конструкцию на основе ферритина и DARPin 9\_29 можно использовать для адресной доставки к раковым клеткам, гиперэкспрессирующим онкомаркер HER2/neu.

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-09166.

## 9.16. КОМПОЗИТНЫЕ МАТРИКСЫ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ ХИТОЗАНА С ОЛИГОЛАКТИДАМИ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Мамедова А.Р.<sup>1,2</sup>, Толстова Т.В.<sup>1</sup>, Дроздова М.Г.<sup>1</sup>, Демина Т.С.<sup>3</sup>,  
Попырина Т.Н.<sup>3</sup>, Марквичева Е.А.<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup>Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва

mamedova.aygun.99@mail.ru

Скаффолды являются ключевым компонентом тканеинженерных конструкций, поскольку служат подложкой для прикрепления и роста клеток. Биоматериалы для создания таких матриксов могут быть синтетического или природного происхождения. Кроме того, они должны биодеградировать и способствовать адгезии и пролиферации клеток. Хитозан - природный биополимер, удовлетворяющий основным требованиям тканевой инженерии, однако получение композитных матриксов на его основе позволяет улучшить механические характеристики, скорость деградации и гидрофильно-гирофобный баланс и др.

Целью данной работы было получение композитных пленок (2D) и макропористых гидрогелей (3D) на основе сополимеров хитозана с L,L- и L,D-олиголактидами; изучение их физико-химических свойств и структуры, а также пролиферации/дифференцировки на/в них животных клеток в модели *in vitro*. В работе были использованы пленки и гидрогели на основе сополимеров Chit (ММ 80 кДа СД 0,9) с L,L- и L,D-олиголактидами (ММ 5 кДа), в частности, были изучены образцы Chit-LL и Chit-LD. Структуру гидрогелей изучали методом конфокальной лазерной микроскопии. Было показано, что в набухом состоянии гидрогели обладают системой взаимосвязанных макропор со средним размером 120-140 мкм и могут применяться для культивирования животных клеток. Изучены физико-химические свойства полученных гидрогелей и показано, что использование матриксов на основе сополимеров приводило к снижению набухаемости и увеличению скорости деградации гидрогелей. Кроме того, было отмечено, что поверхность 3D матриксов обеспечивает хорошую адгезию (конфокальная микроскопия), а также рост и пролиферацию клеток мышечных фибробластов L929 и мезенхимальных стромальных клеток человека (МТГ-тест) при их длительном культивировании в гидрогелях. Также было показано, что пленки из сополимеров хитозана с олиголактидами поддерживают остеодифференцировку МСК (измерение активности щелочной фосфатазы).

Таким образом, матриксы на основе сополимеров хитозана с олиголактидами являются перспективными для тканевой инженерии.

## 9.17. СОЕДИНЕНИЯ ВОДИРҮ С ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

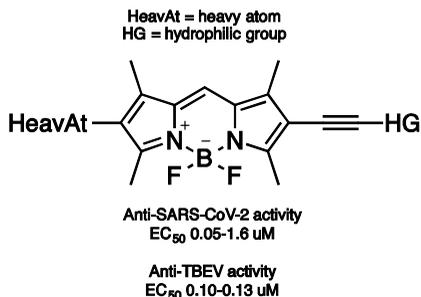
Мариевская К.А.<sup>1</sup>, Красильников М.С.<sup>1,2</sup>, Чистов А.А.<sup>1</sup>, Коршун В.А.<sup>1</sup>, Устинов А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва  
mariewskaya.k@gmail.com

Разработка противовирусных препаратов в настоящее время является весьма актуальным направлением. Пандемия COVID-19 продолжается около двух лет; за это время было получено и исследовано несколько сотен различных соединений, эффективных против SARS-CoV-2, однако при проведении клинических испытаний большинство из них не проявило эффективности [1].

Противовирусная активность некоторых классов красителей-фотосенсибилизаторов [2] воодушевила нас детально исследовать соединения типа ВОДИРҮ в качестве ингибиторов репликации вирусов. Была синтезирована серия соединений, имеющих в составе тяжелый атом в 2-положении как гаситель флуоресценции и гидрофильную группу в 6-положении. Для полученной серии была изучена активность в отношении SARS-CoV-2 (коронавирус) и TBEV (вирус клещевого энцефалита) *in vitro*. Вещества показали высокую активность на данных вирусах. Отсутствие в молекуле тяжелого атома привело к исчезновению противовирусной активности, что косвенно свидетельствует в пользу фотосенсибилизационного механизма биологической активности. В настоящее время проводится изучение генерации синглетного кислорода данными соединениями.



Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 20-04-60499.

*Литература:*

1. Sanders J.M. et al. JAMA, 2020, 323(18), 1824-1836.
2. Mariewskaya K.A. et al. Molecules, 2021, 26, 3971.

## 9.18. НАРУШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ЛИМФОЦИТАХ И ЛИПОПЕРОКСИДАЦИЯ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРКИНСОНИЗМЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ 6-ГИДРОКСИДОФАМИНОМ У КРЫС

*Медведева В.П.<sup>1,2</sup>, Мосенцов А.А.<sup>2</sup>, Миронова Г.Д.<sup>2</sup>, Хмиль Н.В.<sup>2</sup>, Хундерякова Н.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино  
vasilisa.med@icloud.com

Болезнь Паркинсона (БП) является хроническим нейродегенеративным заболеванием, связанным с гибелью дофаминергических нейронов (ДН) черной субстанции. Известно, что одним из путей развития БП является митохондриальная дисфункция, которая сопровождается снижением их энергетической эффективности, что является критичным для ДН. Мы определяли активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в лимфоцитах крови и уровень малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови в модели БП, индуцированной нейротоксином 6-гидроксидофамином (6-ГДА).

Для моделирования БП использовались самцы-крысы линии Wistar, весом 280-300 г. Животных разделили на 3 группы: Контроль; 2) 6-ГДА; 3) 6-ГДА+уридин в дозе 30 мг/кг веса животного. Уровень МДА в сыворотке крови определяли с помощью диагностического набора "ТБК-АГАТ". Активность СДГ и ЛДГ определяли Цитобиохимическим методом [1] в иммобилизованных на стекле лимфоцитах крови. Соотношение активности СДГ/ЛДГ оценивали как интегральное состояние энергетического обмена в клетке.

Нами показано, что активность СДГ в группе 6-ГДА у двух животных выше в два раза, чем в контроле. В третьей группе с уридином, у трех животных гиперактивация снизилась до уровня контроля. Активность ЛДГ в 1 и 2 группах достоверно не изменилась, а в 3 группе у двух крыс достоверно увеличилась. Показатель ЛДГ/СДГ выявил снижение анаэробных процессов к аэробным в два раза при БП, а в 3 группе у двух животных до уровня контроля. Уровень МДА при БП увеличивается на 15%, а в группе с уридином уменьшилась на 12% относительно группы 6-ГДА, соответственно. Таким образом развитие БП, при введении 6-ГДА, приводит к нарушению митохондриальной активности, а уридин, в свою очередь, снижает эту дисфункцию.

*Литература:*

1. Kondrashova M et al. Int J Biochem Cell Biol. 2009 Oct;41(10):2036-50.

## 9.19. БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЛИНКЕРЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИЛАМИНА ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ КАРБОНИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

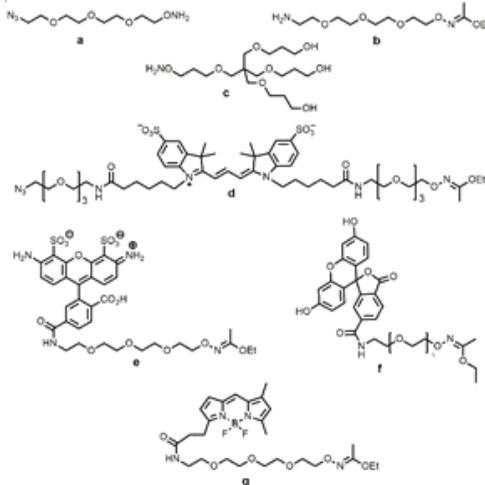
Мелешкина Е.Г.<sup>1,2</sup>, Коршун В.А.<sup>1</sup>, Сапожникова К.А.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

elisaveta.privalova@yandex.ru

*O*-Замещенные гидроксилламины находят применение для синтеза биоконъюгатов благодаря быстро и количественно протекающей реакции с карбонильной группой альдегидов и кетонов в водной среде и при физиологических значениях pH с образованием достаточно устойчивых оксимов [1]. Реакция конденсации полностью удовлетворяет критериям т.н. "клик-химии" и является удобным методом модификации биомолекул и биологически активных соединений. Среди *N*-защитных групп для синтеза *O*-замещенных гидроксилламинов представляет интерес этоксиэтилиденная группа, устойчивая в щелочной и нейтральной среде, но легко удаляемая при подкислении [2]. С использованием этой защитной группы нами получены бифункциональные реагенты на основе тетраэтиленгликоля (**a-b**), содержащие свободный или защищенный оксиамин. Получены гидрофилизатор (**c**) на основе разветвленного пентаэритритового ядра [3]. Разработан синтез линкерных молекул, содержащих в своем составе флуоресцентный краситель, например, родамин AF488, флуоресцеин FAM и бордипиррометен BODIPY-FL (**e-g**), а также бифункциональный линкер с цианиновым красителем (**d**). Краситель в составе полифункционального линкера послужит для контроля стехиометрии, что облегчает подбор условий для синтеза конъюгатов.



Подобные реагенты представляют интерес в первую очередь для получения конъюгатов лекарство-антитело (antibody-drug conjugates, ADC) [4] с контролируемой стехиометрией и несущих более одной молекулы фармакофора. Разветвленные линкеры перспективны для увеличения нагрузки терапевтических молекул на полноразмерный иммуноглобулин в ADC [5]. Присоединение оксиаминов осуществляется по окисленным периодатом углеводным остаткам иммуноглобулинов, что позволяет сохранить аффинность к антигену и улучшить гомогенность конъюгатов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект 20-15-00361); К.А.С. благодарит за поддержку РФФИ (проект 20-34-90125 "Аспиранты).

*Литература:*

1. D.K. Kölmel and E.T. Kool Chem. Rev. 2017 117 10358-10376.
2. M.A. Khomutov et al. Amino Acids 2010 38 509-517.
3. A.I. Ponomarenko et al. Tetrahedron 2016 72 2386-2391.
4. K.C. Nicolaou and S. Rigol Angew. Chem. Int. Ed. 2019 58 11206-11241.
5. Y. Anami et al. Org. Biomol. Chem. 2017 15 5635-5642.

## 9.20. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ИОНОВ $\text{Ca}^{2+}$ НА $\text{Sr}^{2+}$ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ СОВМЕСТИМОСТЬ ОКТАКАЛЬЦИЙ ФОСФАТА *IN VITRO*

Менухов В.О.<sup>1</sup>, Минайчев В.В.<sup>1,2</sup>, Фадеева И.С.<sup>1,2</sup>, Смирнов И.В.<sup>2</sup>, Тетерина А.Ю.<sup>2</sup>, Фадеев Р.С.<sup>1</sup>, Михеева П.В.<sup>2</sup>, Кобякова М.И.<sup>1,2</sup>, Звягина А.И.<sup>1</sup>, Акатов В.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

<sup>2</sup>Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва  
vladmen1609.ru@mail.ru

Создание и повышение биосовместимости остеопластических материалов на основе кальций фосфатных соединений (КФС) остаётся актуальной задачей тканевой инженерии. Одним из перспективных КФС является синтетический октакальций фосфат (ОКФ), благодаря его способности к трансформации в физиологических условиях в нативный гидроксиапатит костной ткани, а также остеоиндуктивным свойствам. Для усиления остеогенных свойств ОКФ применяют различные подходы, одним из которых является замещение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в кристаллической решетке на ионы различных макро- и микроэлементов ( $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и т. д.).

Целью данной работы было исследование влияния Sr-замещённого ОКФ (ОКФ-Sr) на жизнеспособность клеток, а также изменение митохондриального потенциала ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) и продукции активных форм кислорода (АФК) клетками *in vitro*. В данной работе исследовались образцы ОКФ со степенью замещения  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Sr}^{2+}$  на 1%(ОКФ-Sr\_1), 10%(ОКФ-Sr\_10) и 50%(ОКФ-Sr\_50).

Исследования проводились на мышинных эмбриональных фибробластах линии С3Н/10Т1/2. Клетки культивировали в течение 96 часов без КФС (контроль), а также ОКФ и ОКФ-Sr в концентрациях 10, 3, 1, 0.3 и 0.1 мг/мл. Затем производили исследование жизнеспособности,  $\Delta\Psi\text{m}$  и продукции АФК.

Жизнеспособность клеток, инкубированных с ОКФ, ОКФ-Sr\_1 и ОКФ-Sr\_10, была существенно ниже, чем в контрольных условиях, вплоть до концентрации 0.3 мг/мл. Наибольшую жизнеспособность выявлена для клеток, инкубировавшихся со Sr-ОКФ\_50. При исследовании влияния ОКФ и Sr-ОКФ на значение  $\Delta\Psi\text{m}$  было показано, что, после инкубации, со всеми КФС происходило понижение  $\Delta\Psi\text{m}$  у клеток. Исследование содержания АФК клеток показало, что ОКФ, ОКФ-Sr\_1 и ОКФ-Sr\_10 не приводили к изменению продукции АФК по сравнению с контролем. Однако ОКФ-Sr\_50 достоверно снижал продукцию АФК в клетках, что может указывать на потенциальные антиоксидантные свойства ОКФ-Sr\_50.

Полученные результаты указывают на то, что замещение  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Sr}^{2+}$  в ОКФ в количестве 50% может снижать цитотоксичность нативного ОКФ, что может быть связано с отсутствием или даже ингибирующим действием на продукцию АФК.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН, при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ (СП-1275.2019.4) и РНФ в рамках проекта № 21-73-20251.

## 9.21. БЛОКАДА СИСТЕМЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ НАНОЧАСТИЦАМИ ФЕРРИГИДРИТА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ДОСТАВКИ НАНОАГЕНТОВ В ОПУХОЛЬ

Миркасымов А.Б.<sup>1</sup>, Зеленукин И.В.<sup>1,2,3</sup>, Иванов И.Н.<sup>1,3,4</sup>, Джалилова Д.Ш.<sup>5</sup>, Деев С.М.<sup>1,3,6</sup>

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

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

<sup>3</sup>НИЯУ МИФИ, Москва

<sup>4</sup>РНИМУ имени Н.И. Пирогова, Москва

<sup>5</sup>НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына, Москва

<sup>6</sup>Институт молекулярной медицины - Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва

mirkasymov@phystech.edu

Широкому применению наночастиц в медицине для диагностики, направленной доставки лекарств и терапии препятствует быстрое выведение частиц из кровотока и поглощение системой мононуклеарных фагоцитов (СМФ), в основном клетками Купфера в печени. Для улучшения эффективности доставки наноагентов в терапевтическую цель и уменьшения возможных токсических эффектов по отношению к печени нами разрабатывается метод СМФ блокады. Метод основан на внутривенном введении малотоксичных нефункциональных агентов, при поглощении которых макрофагами происходит временное ингибирование их фагоцитарной активности. Это позволяет функциональным терапевтическим агентам дольше циркулировать в кровотоке и эффективнее накапливаться в цели.

Ранее нами было показано, что покрытие частиц является ключевым фактором, определяющим их блокирующую эффективность [1]. В этой работе мы синтезировали биосовместимые наночастицы ферригидрита, по составу аналогичные ядру эндогенного ферритина, использующегося в качестве депо железа, и покрыли их зарекомендовавшим себя карбоксиметил-декстраном. СМФ блокада полученными частицами позволила продлить циркуляцию наноагентов в кровотоке и увеличить эффективность их доставки в опухоль до 10% от введенной дозы. Также были изучены биораспределение частиц блокатора и их токсичность на основе динамики веса мышей, биохимических показателей крови и гистологического анализа основных органов. Таким образом, была показана высокая эффективность и низкая токсичность полученного СМФ блокатора.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (грант № 20-34-90052) и Российского Научного Фонда (грант № 17-74-20146)

*Литература:*

1. Mirkasymov A. B. et al. In vivo blockade of mononuclear phagocyte system with solid nanoparticles: Efficiency and affecting factors // Journal of Controlled Release. 2021. T. 330. С. 111-118.

## 9.22. ВЛИЯНИЕ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И РАЗМЕРЫ МОЛЕКУЛ КОЛЛАГЕНАЗЫ ИЗ *CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM*

Панкова С.М.<sup>1,2</sup>, Сакибаев Ф.А.<sup>1</sup>, Холявка М.Г.<sup>1</sup>, Артюхов В.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж

<sup>2</sup>Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н.

Бурденко, Воронеж

sazykina.93@mail.ru

Проблема подбора материалов для лечения ран и очистки их от омертвевших тканей в настоящее время является актуальной и нерешенной. Терапия гнойно-некротических процессов наиболее эффективна, если обеспечивает удаление нежизнеспособных тканей, подавление микрофлоры в очаге воспаления. Бактериальная коллагеназа, выделенная из *Clostridium histolyticum* (КФ 3.4.24.7), - протеолитический фермент, относящийся к семейству матриксных металлопротеаз. В медицине она используется для удаления некротических тканей из ран, лечения заболеваний глаз в офтальмологии. В качестве антимикробного, ранозаживляющего агента, помимо коллагеназы, может выступать ультрафиолетовое излучение. Бактерицидное, обеззараживающее действие УФ-лучей используется для лечения гнойных ран, а также широко применяется для дезинфекции помещений и хирургических инструментов. В связи с этим целью работы было исследовать динамику изменения размеров и удельной активности молекул коллагеназы из *Clostridium histolyticum* после УФ-облучения в диапазоне доз 151-6040 Дж/м<sup>2</sup>.

После облучения коллагеназы дозой 3020 Дж/м<sup>2</sup> зарегистрированы: 1) снижение ее удельной протеолитической активности на ~ 9%, 2) увеличение числа частиц, соответствующих нативной молекуле фермента, до 20%, 3) рост количества продуктов автолиза до 18%. При этом анализ динамики изменения размеров частиц в растворе показал снижение способности коллагеназы образовывать надмолекулярные комплексы с дальнейшим возрастанием дозы ее облучения УФ-светом.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.

## 9.23. ПОЛУЧЕНИЕ 3D МОДЕЛИ КОЖИ ПУТЕМ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ И КЕРАТИНОЦИТОВ

***Полянская А.Ю.<sup>1</sup>, Павлова Е.Р.<sup>1,2</sup>, Бояринцев В.В.<sup>1</sup>, Трофименко А.В.<sup>1</sup>,  
Фильков Г.И.<sup>1</sup>, Базров Д.В.<sup>2,3</sup>, Клинов Д.В.<sup>1,2</sup>, Дурьманов М.О.<sup>1</sup>***

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

<sup>2</sup>НИИ физико-химической медицины ФМБА, Москва

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
polyanskaya.ayu@phystech.edu

Разработка новых методик по созданию 3D моделей кожи является актуальной задачей для регенеративной медицины. Эквиваленты кожи, полученные путем совместного культивирования фибробластов и кератиноцитов применяются в терапии хронических ран, при лечении ран от ожогов [1,2]. Также 3D модели могут быть использованы для тестирования лекарственных препаратов, изучения механизмов биологических процессов в коже [3].

В данной работе была получена 3D модель кожи путем совместного культивирования фибробластов и кератиноцитов. Первичные фибробласты и кератиноциты были выделены из кожи новорожденных мышей возрастом 1 день. Идентификация первичных клеток была проведена путем иммуногистохимии, чтобы качественно подтвердить экспрессию клетками маркерного белка и проточной цитометрии для количественной оценки процента популяции клеток, экспрессирующих данный белок. Чистота популяции составила 93,6% и 92,8% для фибробластов и кератиноцитов соответственно.

Образцы исследовали методом иммуногистохимии криосрезом. Полученные результаты свидетельствуют о наличии маркеров, характерных для фибробластов (виментин), базальных кератиноцитов (цитокератин 5), кератиноцитов на начальных стадиях дифференцировки (цитокератин 10), а также терминально дифференцированных клеток эпидермиса (лорикрин). Наличие рогового слоя установлено уже на пятый день культивирования, что говорит о том, что кератиноциты в составе модели кожи в течение этого срока уже достигают терминального уровня дифференцировки, полученная 3D модель обладает анатомической организацией схожей с нативной кожей мыши.

*Литература:*

1. Roshangar L, Soleimani Rad J, Kheirjou R, Reza Ranjesh M, Ferdowsi Khosroshahi A. Skin Burns: Review of Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. //Wounds 2019. V. 31. P. 308-315.
2. Vivcharenko V, Wojcik M, Przekora A. Cellular Response to Vitamin C Enriched Chitosan/Agarose Film with Potential Application as Artificial Skin Substitute for Chronic Wound Treatment. // Cells. 2020. V. 9(5). P. 1185.
3. Niehues H, Bouwstra J.A, El Ghalbzouri A, Brandner J., Zeeuwen P., van den Bogaard E. 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. // Exp Dermatol. 2018. V. 27(5). P. 501-511.

## 9.24. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАТУСА МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ ПО ДАННЫМ RNASEQ

*Рабушко Е.Н.<sup>1,2</sup>, Никитин Д.М.<sup>1</sup>, Сунцова М.В.<sup>1</sup>, Сорокин М.И.<sup>1</sup>, Буздин А.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
elnrabush@gmail.com

Микросателлитная нестабильность (МСН) - один из ключевых маркеров геномной нестабильности раковых опухолей. МСН проявляется в изменении длины коротких повторов - микросателлитов. Ее возникновение связано с нарушением работы генов системы репарации неправильно спаренных нуклеотидов. Определение МСН используется в диагностических и прогностических целях, а также при назначении химиотерапии и иммунотерапии для лечения раковых опухолей желудочно-кишечного тракта и матки. В клинической практике для определения статуса МСН оценивают уровень экспрессии генов системы репарации с помощью иммуногистохимического метода (ИГХ) или изменение размеров повторов с помощью анализа длин продуктов амплификации. Все более широко в исследовании опухолей применяют секвенирование нового поколения (NGS). В этой работе мы предлагаем использовать транскриптомные данные для определения статуса МСН.

Две опубликованные генные подписи для определения статуса МСН были выбраны для разработки методики: первая основана на уровнях экспрессии генов репарации (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), вторая учитывает транскрипционную активность 10 генов, дифференциально экспрессирующихся в опухолях с разными статусами МСН. Мы протестировали эти подписи на профилях опухолевых образцов с известным статусом МСН из базы данных TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/repository>). Наилучшие результаты получены при объединении этих двух подписей: коэффициент корреляции Мэтьюза при использовании единой подписи был равен 0.81, что значительно выше индивидуальных подписей (для генов репарации - 0.61, для 10 дифференциальных генов - 0.73). Затем мы адаптировали алгоритм с использованием единой подписи для работы с новыми образцами неизвестного статуса и применили его к транскриптомным данным, полученным в нашей лаборатории. Для оценки эффективности алгоритма была проведена экспериментальная валидация. В качестве контрольного метода был выбран метод фрагментного анализа продуктов амплификации микросателлитных маркеров: Bat26, Bat25, NR24, NR21, NR27. Валидация показала, что алгоритм предсказывает статус МСН с чувствительностью 100% и специфичностью 80%, AUC = 0.9.

Таким образом, нами разработан высокочувствительный и специфичный метод оценки статуса МСН по данным РНК секвенирования, что предоставляет возможность комбинировать определение статуса МСН с анализом других молекулярных маркеров в одной экспериментальной процедуре.

Работа поддерживается грантом РФФИ № 20-75-10071.

## 9.25. СОЗДАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛИ

*Садыкова Э.З.<sup>1</sup>, Бычкова А.В.<sup>1</sup>, Горобец М.Г.<sup>1</sup>, Якунина М.Н.<sup>2</sup>, Хачатрян Д.С.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

<sup>2</sup>НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва

<sup>3</sup>НИЦ Курчатовский институт - ИРЕА, Москва

sadykova.leonora@gmail.com

Актуальной задачей на сегодняшний день является целевая доставка магнитных наночастиц (МНЧ) в место злокачественных новообразований для последующей терапии. В исследовании представлены результаты создания функциональных систем, в состав которых входят наночастицы оксидов железа и сывороточный альбумин, связывание которых происходит за счет свободнорадикальной модификации альбумина на поверхности МНЧ в результате протекания реакции Фентона. Впервые с поверхностью таких частиц производится связывание фолиевой кислоты, рецепторы к остаткам которой экспрессируются опухолевыми клетками, что делает фолиевую кислоту перспективным биовектором для таргетной доставки МНЧ.

Для исследований были использованы МНЧ магнетита ( $Fe_3O_4$ ), синтезированные методом химического соосаждения из растворов солей железа. Для формирования устойчивого покрытия из сывороточного альбумина использовали человеческий сывороточный альбумин (A1653, Sigma-Aldrich, USA), пероксид водорода (H1009, Sigma-Aldrich, USA). Фолиевая кислота для связывания с поверхностью функциональных систем была предоставлена НИЦ Курчатовский институт - ИРЕА. Концентрацию альбумина, фолиевой кислоты и МНЧ, агрегирование частиц в растворе оценивали методом спектрофотометрии УФ/видимой области на спектрофотометре SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Germany).

В результате исследований были получены стабильные золи, представляющие собой МНЧ, покрытые устойчивым покрытием из человеческого сывороточного альбумина, связанного с модифицированной фолиевой кислотой. В дальнейших исследованиях планируется осуществить введение полученных функциональных систем в опухоли животных для оценки эффективности полученных систем.

## 9.26. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ СТАРЕНИИ ЭРИТРОЦИТОВ

Слатинская О.В., Максимов Г.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва  
slatolya@mail.ru

Механизм апоптоза является одним из интенсивно изучаемых вопросов современной биологии и физиологии. Долгое время считалось, что апоптоз характерен только для ядерных клеток. Однако, исследования последних десятилетий доказали, что для безъядерных клеток крови так же характерны механизмы апоптоза. Так, до наступления физиологического старения, эритроциты могут подвергаться повреждениям, нарушающих их целостность, что служит сигналом для начала эриптоза - программируемой гибели. Одной из возможных причин наступления эриптоза - увеличение  $\text{Ca}^{2+}$  в среде, что возможно в ряде заболеваний. Так, при повышении концентрации внутриклеточного и экстраклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивается агрегация эритроцитов за счет изменения распределения фосфолипидов и гликопротеинов, что вызывает кластеризацию отрицательных зарядов на поверхности мембраны эритроцита из-за перераспределения отрицательно заряженных остатков сиаловых кислот.

Известно, что кислород-транспортная функция эритроцитов зависит не только от гемодинамики и средства гемоглобина (Гб) к  $\text{CO}_2$ , но и от конформации Гб. Одним из способов диагностики конформации Гб в эритроцитах крови является Раман-спектроскопия, которая позволяет оценивать содержание и конформацию Гб в эритроцитах без предварительной пробоподготовки *in vitro*. Цель работы состояла в изучении перераспределения Гб и изменении его кислород-транспортной функции при старении эритроцита.

В ходе исследования установлено, что при увеличении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде, происходит перераспределение Гб к центру клетки, что характерно для стареющих эритроцитов. При этом, отсутствует изменение морфологии. Так же, происходит снижение мембранного потенциала и валентных колебаний винилов и  $\text{CH}_3$ -боковых радикалов пиррольных колец гема, что указывает на снижение сродства к  $\text{O}_2$ . Таким образом, изменения конформации Гб при увеличении экстраклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  вызвано изменением мембранного потенциала, что увеличивает количество свободных ОН-групп тирозина белка полосы 3, функционирующего как ионный канал. Отметим, что N-конец молекулы БПЗ содержит анионные центры для формирования комплексов с глицеральдегид-6-фосфатдегидрогеназой, альдолазой и примембранным Гб.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-34-90073).

## 9.27. НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИФЕРУЛОВЫХ И ПОЛИГЕНТИЗИНОВЫХ КИСЛОТ КАК НОВЫЕ НОСИТЕЛИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

*Смирнов И.В.<sup>1</sup>, Лисов А.В.<sup>2</sup>, Звонарев А.Н.<sup>2</sup>, Сузина Н.Е.<sup>2</sup>, Казаков А.С.<sup>3</sup>, Марквичева Е.А.<sup>4</sup>, Земскова М.Ю.<sup>2</sup>*

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

<sup>2</sup>ФИЦ ПНЦБИ РАН - Институт биохимии и физиологии микроорганизмов, Пушкино

<sup>3</sup>ФИЦ ПНЦБИ РАН - Институт биологического приборостроения, Пушкино

<sup>4</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
ivan\_smirnov\_98@mail.ru

Наночастицы как средства доставки лекарств в опухолевые клетки рассматриваются как один из важнейших вариантов усиления эффективности лечения новообразований. В последнее время показано успешное использование природных лигнинных полимеров для формирования биodeградируемых частиц, но отсутствие определенности химической структуры и ограниченность в возможности внесения модификаций в химический состав соединений ограничивает их использование в фармакологии. Нами было предложено синтезировать полимеры *de novo* из фенольных мономеров с целью возможности контроля полимеризации и формирования лигнин-подобных наночастиц.

Целью работы являлось получение лигнин-подобных полимеров из фенольных мономеров посредством биокаталитического или химического синтеза, оценка структуры и размеров полимеров и их способности формировать наночастицы, анализ размера и стабильности наночастиц, а также эффективность их интернализации клетками человека.

По результатам исследования показано, что из 12 исследованных фенольных мономеров оптимальными физико-химическими свойствами обладают наночастицы из полиферуловой и полигентизиновой кислот, которые были синтезированы посредством фермента - лакказы. Полученные частицы стабильны в белковых растворах и способны переносить гидрофобные низкомолекулярные соединения. При изучении интернализации наночастиц клетками линии MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы человека) показано более активное поглощение полиферуловых частиц.

Сравнительный анализ двух типов полимерных наночастиц показал возможность использования полиферуловых носителей для разработки новых подходов к противоопухолевой терапии, таких как: комплексной терапии с использованием смесей наночастиц, несущих разные фармакологические соединения и целевой доставки лекарств исключительно в клетки опухоли.

## 9.28. МУТАНТНЫЕ ФОРМЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ГИРУДИНА С УЛУЧШЕННОЙ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Софронова А.А.<sup>1</sup>, Семенюк П.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва

<sup>2</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва  
alina.a.sofronova@gmail.com

Тромбин, один из ключевых ферментов системы свертывания крови, является основной мишенью для разработки новых антикоагулянтов. Одним из наиболее высокоспецифичных природных ингибиторов тромбина является гирудин - 65-аминокислотный полипептид-антикоагулянт, содержащийся в слюнных железах медицинских пиявок *Hirudo medicinalis*. Ключевую роль во взаимодействии гирудин-тромбин играют ионные взаимодействия между сульфатированным остатком Туг63 на С-конце гирудина с положительно заряженной бороздкой на поверхности тромбина. Использование природного сульфатированного гирудина для медицинских целей лимитировано сложностью его получения, поэтому в клинической практике используют рекомбинантный аналог гирудина без сульфатированного остатка тирозина, что приводит к 10-кратному снижению аффинности гирудина к тромбину. Целью данной работы, было предложить мутантные формы гирудина, обладающие потенциально улучшенной аффинностью к тромбину по сравнению с рекомбинантной формой.

Для количественной оценки связывания мутантных форм гирудина с тромбином были проведены симуляции направленной молекулярной динамики. Были использованы следующие формы гирудина: рекомбинантный (десульфо) гирудин, сульфатированный и фосфорилированный гирудин по остатку Туг63, гирудин с заменой Туг63 на (карбоксиметил)фенилаланин, гирудин с заменой всех остатков лизина на остатки сукциниллизина и мутантные формы Туг63Glu, Gln65Glu. Расчет энергии взаимодействия комплекса проводился методом отбора проб зонтиком. Далее, была измерена антитромботическая активность полипептидов.

Согласно расчету свободной энергии связывания, фосфогирудин обладает наибольшей аффинностью к тромбину среди всех аналогов гирудина ( $dG = -137.2$  кДж/моль), значительно превосходя рекомбинантную ( $ddG = 51,7$  кДж/моль) и сульфатированную ( $ddG = 29,7$  кДж/моль) форму гирудина. Кроме того, *in vitro* измерение активности производных гирудина в плазме человека подтвердило наивысшую антитромботическую активность фосфогирудина среди всех аналогов при различных значениях pH. Дополнительно, улучшенную аффинность продемонстрировали формы гирудина с мутацией Gln65Glu и с заменой лизинов на сукциниллизины. Все они могут быть использованы для улучшения фармакологических свойств рекомбинантного гирудина.

## **9.29. АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИЕЙ ИЗМЕНЕНИЯ В ГЛУТАМАТНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ВЕНТРАЛЬНОЙ ТЕГМЕНТАРНОЙ ОБЛАСТИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РАЗВИТИЕ НИКОТИНОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ У КРЫС**

***Стратилов В.А.<sup>1</sup>, Ветровой О.В.<sup>1,2</sup>***

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург  
stratilov.v@infran.ru

Основная проблема нейробиологии аддикций заключается в отсутствии понимания причин широкой вариабельности индивидуальной предрасположенности к зависимостям. Накоплен существенный массив информации о наследственных факторах риска развития аддикций, однако до сих пор не сформирована цельная картина представлений о влиянии факторов внешней среды, особенно в период перинатального онтогенеза, на эффективность функционирования системы "вознаграждения".

Клинические данные и результаты экспериментальных исследований на животных показывают влияние стресса матери, сопровождающегося выбросом эндогенных глюкокортикоидных гормонов, а также патологий плаценты на дальнейшее физическое и когнитивное развитие потомства. Гипоксия является одной из наиболее распространенных форм пренатального стресса

Данная работа была посвящена изучению влияния пренатальной гипоксии (ПГ), пережитой на 14-16 сутки внутриутробного развития на склонность к потреблению никотина у взрослых 3-месячных крыс, тяжесть синдрома отмены после контролируемого потребления никотина, а также на особенности функционирования дофаминергической системы мозга.

У ПГ крыс нами была выявлена повышенная склонность к свободному потреблению никотина по сравнению с контрольными животными. Также в тесте условнорефлекторной реакции избегания с использованием мекамилamina после 2 недельного контролируемого потребления никотина было обнаружено усиление синдрома отмены.

При изучении особенностей функционирования дофаминергической системы мозга взрослых крыс, переживших ПГ, нами было обнаружено усиление фосфорилирования белка DARPP-32 по 34 треонину в прилежащем ядре стриатума на фоне отсутствия изменений количества дофамина в стриатуме и среднем мозге, и дофаминовых рецепторов 1го типа в стриатуме. Наблюдаемые паттерны фосфорилирования белка DARPP-32 при отсутствии изменений в количестве дофамина могут быть объяснены показанным нами усилением глутаматной стимуляции нейронов вентральной тегментарной области (VTA). Это потенциально может играть огромную роль в развитии именно никотиновой зависимости, поскольку в VTA чувствительные к никотину nAChR7 располагаются преимущественно на глутаматергических терминалах.

### 9.30. ИЗУЧЕНИЕ И СРАВНЕНИЕ pH-ЗАВИСИМЫХ СВОЙСТВ ХИМЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА EGFP И ПЕПТИДОВ pHLP

Сунгурова А.С.<sup>1</sup>, Фролова А.Ю.<sup>2</sup>, Пахомов А.А.<sup>2</sup>, Мартынов В.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
ania-sungurova2013@yandex.ru

Способность раковых тканей закислять межклеточное пространство ввиду активного метаболизма можно использовать для адресной доставки целевых конструкций к злокачественным опухолям. Недавно было показано, что пептид pHLP (pH low insertion peptides) способен к встраиванию в клеточные мембраны при пониженных значениях pH.

Данная работа посвящена изучению и сравнению свойств природного пептида pHLPwt и его укороченного мутантного варианта pHLP-VAR3 в составе химерных конструкций с флуоресцентным белком EGFP. На первом этапе были получены генетические конструкции, содержащие в одной рамке считывания ген флуоресцентного белка EGFP и определенную последовательность пептида pHLP (EGFP-pHLPwt и EGFP-pHLP-VAR3). Нарработку белков осуществляли в клетках *E. coli* с последующим выделением на Ni-NTA-агарозе.

При помощи метода проточной цитофлуориметрии был осуществлен подбор оптимального времени инкубации исследуемых конструкций с клетками HeLa, составившее 15 мин, и рабочей концентрации для определения константы кислотно-основного равновесия - 1 мкМ. Далее было проведено изучение связывания конструкций EGFP-pHLPwt, EGFP-pHLP-VAR3 и свободного EGFP с клетками HeLa при значениях pH от 7,4 до 5,6 с шагом 0,2 в трех повторах. По мере понижения pH усиливалось связывание конструкций EGFP-pHLPwt и EGFP-pHLP-VAR3, которое не наблюдалось в случае EGFP. На основе результатов тестирования были определены константы кислотно-основного равновесия конструкций EGFP-pHLPwt и EGFP-pHLP-VAR3, которые составили  $6,36 \pm 0,03$  и  $6,46 \pm 0,02$ , соответственно. Также было установлено, что связывание EGFP-pHLPwt при пониженных значениях pH выше в 8-10 раз по сравнению с EGFP-pHLP-VAR3. Полученные результаты были также подтверждены методом конфокальной микроскопии. Таким образом, все протестированные конструкции связывались с раковыми клетками в условиях ацидоза и не связывались при физиологических pH. Конструкция с пептидом pHLPwt демонстрировала лучшее связывание по сравнению с конструкцией, содержащей pHLP-VAR3.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 20-34-90019.

## 9.31. СИНТЕЗ КАТИОННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОРФИРИНОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Усанёв А.Ю., Савельева И.О., Жданова К.А., Брагина Н.А.

МИРЭА - Российский технологический университет, Москва  
alexey0usanev@gmail.com

С момента открытия антибиотиков лечение бактериальных инфекций усложняется из-за появления у микробов лекарственной резистентности, что приводит к росту заболеваемости, расходов на здравоохранение и высокой смертности во многих странах. Поэтому крайне важно разрабатывать эффективные альтернативные методы для уничтожения патогенов. Антимикробная фотодинамическая терапия (аФДТ) - альтернативный метод лечения, использующий свет с определённой длиной волны, фотосенсибилизатор (ФС) и молекулярный кислород для создания активных форм кислорода (АФК) - синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ), супероксидных и гидроксильных радикалов. При аФДТ реализуется механизм фотодинамической реакции II типа, в результате которого вырабатывается  $^1\text{O}_2$ , который вызывает окислительное повреждение клеточной стенки бактерий.

Грамположительные бактерии более восприимчивы к аФДТ, чем грамотрицательные. Структура внешней мембраны грамотрицательных бактерий препятствует поглощению анионных и нейтральных ФС. На протяжении многих лет порфириновые производные с положительными зарядами использовались для повышения фоточувствительности у грамотрицательных бактерий благодаря электростатическому взаимодействию между ФС и мембраной бактериальной клетки. Количество зарядов и их распределение в молекуле ФС играют важную роль в эффективности аФДТ для борьбы с грамотрицательными бактериями.

В представленной работе были получены новые фотосенсибилизаторы для аФДТ - производные мезо-арилзамещенных порфиринов, содержащие терминальные положительно заряженные пиридиновые группы, а также их комплексы с металлами ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ). Для синтеза целевых соединений использовали синтетическую стратегию: на первом этапе были получены модифицированные бензальдегиды, затем была использована монопиррольная конденсация по методу Линдсея, а на последнем этапе химически модифицировали терминальные группы для получения катионных порфиринов. Строение полученных продуктов подтверждалось данными УФ,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектроскопии, ESI масс-спектрометрии. В настоящее время проводятся биологические испытания на установление фотодинамической активности целевых соединений в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Авторы выражают благодарность Российскому научному фонду (проект №20-73-00286).

### **9.32. ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ДВУХСЛОЙНЫХ ТКАНЕВЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ**

***Фетисова В.Э.<sup>1</sup>, Тетерина А.Ю.<sup>1</sup>, Соловьёва Е.В.<sup>2</sup>, Комлев В.С.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва

<sup>2</sup>НИЦ Курчатовский институт, Москва

victoria.phetisova@yandex.ru

Последние несколько лет остро стоит проблема лечения различных дефектов кожных покровов - от диабетических язв до механических повреждений. В современной медицине существует два основных направления для решения данной проблемы: пересадка кожи и создание тканевых эквивалентов. Из-за того, что пересадка кожи является довольно травматичной и не всегда применима, всё чаще используют её искусственные эквиваленты. Для их создания всё чаще применяют биополимеры, склоняясь к биополимерам растительного происхождения, поскольку биополимеры животного происхождения потенциально могут быть переносчиками различных заболеваний. В данной работе использовался полисахарид растительного происхождения - альгинат натрия, поскольку он обладает способностью образовывать прочные пористые матриксы различных форм, имеет высокую влагоудерживающую способность и хорошие ранозаживляющие свойства.

Для полноценного восстановления кожных покровов требуется материал, который был бы максимально близок по строению и функциям к реальным тканям. В данной работе были разработаны двухслойные тканевые эквиваленты, позволяющие моделировать такую ткань: нижний слой - пористый, что позволяет удерживать влагу и обеспечивать васкуляризацию; верхний слой - тонкая плёнка, предотвращающая попадание в рану загрязнений.

Зачастую при использовании таких материалов, особенно на больших по площади ранах, происходит отторжение организмом. Чтобы такого не происходило, предлагается функционализация двухслойных материалов плазмой крови пациента, что повышает их совместимость с организмом пациента.

В данной работе для функционализации использовалась плазма, обогащённая и обеднённая тромбоцитами, в концентрациях от 5 до 25 масс.%. У полученных материалов были изучены закономерности изменения микроструктуры, состава, механических свойств и растворимости от концентрации плазмы.

### 9.33. ПОЛУЧЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ ГИБРИДНОЙ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА mCherry И pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ПЕПТИДА ATRAM ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ РАКА

Фролова А.Ю.<sup>1</sup>, Сунгурова А.С.<sup>2</sup>, Пахомов А.А.<sup>1</sup>, Мартынов В.И.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

anastasiya\_frolova\_box@mail.ru

Использование pH-чувствительных пептидов, нацеленных на кислотное микроокружение опухоли, для адресной доставки терапевтических агентов к раковым зонам является развивающимся и многообещающим подходом. Настоящая работа посвящена получению оптимальной конструкции на основе флуоресцентного белка mCherry и pH-чувствительного пептида ATRAM, обладающей большей водорастворимостью по сравнению с исходным пептидом, для дальнейшей конъюгации с низкомолекулярными фотосенсибилизаторами.

Были получены генетические конструкции, содержащие в одной рамке считывания ген флуоресцентного белка mCherry и пептида ATRAM, объединенные тремя различными линкерами: mCherry-SGLRSAEGS-ATRAM (mCherry-9-ATRAM), mCherry-GACGIERCGS-ATRAM (mCherry-10-ATRAM), mCherry-GASEEGEEGIERCGS-ATRAM (mCherry-15-ATRAM), осуществлена наработка целевых белков в клетках *E. Coli*, их выделение проводили на Ni-NTA-агарозе.

Изучение pH-зависимого связывания исследуемых белковых конструкций проводили на клеточной линии HeLa методом проточной цитофлуориметрии при десяти различных значениях pH в диапазоне от 5.6 до 7.4. Наименьшее связывание при закислении продемонстрировала конструкция mCherry-9-ATRAM, однако конструкции mCherry-10-ATRAM и mCherry-15-ATRAM связывались лучше первой примерно в 8 и 24 раза, соответственно. Данные результаты также были подтверждены при помощи флуоресцентной микроскопии. На основе наиболее удачной конструкции mCherry-15-ATRAM, была получена новая, несущая остаток Cys только на С-конце, который был конъюгирован с малеимидным производным красителя BODIPY-R6G. Данная конструкция обладала большей водорастворимостью по сравнению с контрольной конструкцией ATRAM-Cys-BODIPY-R6G, методом проточной цитофлуориметрии было показано, что краситель BODIPY-R6G не повлиял на ее pH-чувствительность и эффективность связывания при закислении.

Таким образом, в данной работе была получена новая pH-чувствительная конструкция, обладающая эффективным связыванием и улучшенной водорастворимостью, для конъюгации с синтетическими фотосенсибилизаторами и использования при терапестике раковых заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 20-34-90019.

### 9.34. РАЗНОНАПРАВЛЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ALOX15 ЭФФЕКТОРНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ НА ОСНОВЕ СОЕДИНЕНИЙ ИНДОЛА И ИМИДАЗОЛА

*Шафиуллина Р.Р., Голованов А.Б., Журавлёв А.М., Иванов И.В.*

МИРЭА - Российский технологический университет, Москва  
shafullina.rania@mail.ru

Липоксигеназы (LO) - негемовые железосодержащие ферменты, ответственные за окисление полиненасыщенных жирных кислот до гидропероксипроизводных. С недавних пор ALOX15 стала привлекательной мишенью для терапевтического вмешательства в силу разнонаправленности свойств метаболитов окисления ALOX15, которые проявляют как про-, так и противовоспалительные свойства. Таким образом, создание эффекторов ALOX15 в настоящее время является важной целью биомедицинских исследований.

На основании предварительных исследований и анализа литературных данных, нами были синтезированы ингибиторы ALOX15 на основе соединений индола и имидазола (1), представленные на Рисунке 1.

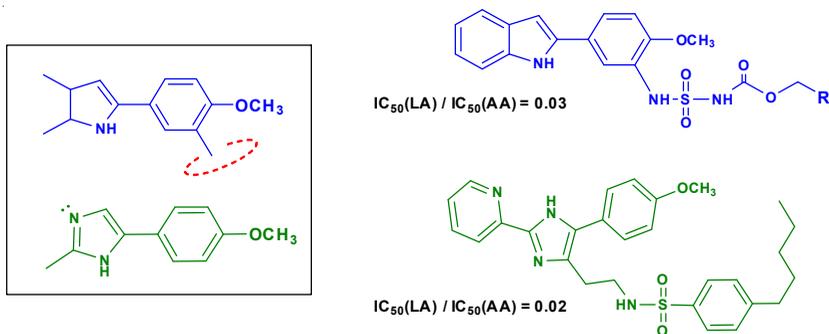


Рисунок 1. Структуры ингибиторов

Для полученных соединений были проведены исследования активности с использованием ALOX млекопитающих. Для обоих соединений наблюдалось избирательное ингибирование окисления линолевой кислоты ALOX15. Наличие  $CH_3O$ -группы в 4-положении арильного заместителя индола или имидазола играло ключевую роль в обеспечении избирательного аллостерического ингибирования линолеат-оксигеназной активности ALOX15, что открывает перспективы в возможности дальнейшей модификации фармакофора, приведенного на Рисунке 1.

Выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-54-12002).

*Литература:*

1. Weinstein, D. S.; Liu, W.; Ngu, K.; Med. Chem. Lett. 2007, 17, 5115.

### 9.35. ТАРГЕТНАЯ ДОСТАВКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКТОВ В ГЕПАТОЦИТЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ИНДУЦИРОВАННОГО ОНКОГЕНЕЗА В ПЕЧЕНИ

Шаховцев Д.А.<sup>1,2</sup>, Мальцев Д.И.<sup>1,3</sup>, Кельмансон И.В.<sup>1,2</sup>, Мощенко А.А.<sup>1,3</sup>, Абакумова Т.О.<sup>4</sup>, Ветошева П.И.<sup>4</sup>, Левкина А.А.<sup>2</sup>, Сысоева В.А.<sup>1</sup>, Зацепин Т.С.<sup>4</sup>, Шохина А.Г.<sup>1,2,3</sup>, Белоусов В.В.<sup>1,2,3</sup>, Конрад М.<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>РНМУ имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва

<sup>4</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

<sup>5</sup>Центр Гельмгольца, Мюнхен, Германия

dmitry.shakhovtsev@gmail.com

**Введение.** Одной из ключевых проблем современной противораковой терапии по-прежнему остается селективное уничтожение малигнизированных клеток без затрагивания структуры и функций здоровых тканей. Повышенная потребность в железе обуславливает чувствительность раковых клеток к недавно охарактеризованному типу железо-зависимой неапоптотической клеточной гибели - ферроптозу. Специфика метаболизма железа в гепатоцитах делает печень привлекательным объектом для изучения терапевтического потенциала модуляторов ферроптоза.

**Цель работы.** Целью данной работы было определение условий для индуцированного онкогенеза печени мыши *in vivo* для последующего тестирования на трансгенных линиях мышей с тканеспецифичной гиперэкспрессией ключевых белков-регуляторов ферроптоза (GPX4 и FSP1).

В рамках данной работы мы изучали несколько способов доставки онкогенов в ткани печени, а именно: частицы аденоассоциированных вирусов (AAV), липидные наночастицы и гидродинамическую трансфекцию. В случае вирусной трансдукции наилучших эффективности и селективности трансдукции гепатоцитов удалось добиться при использовании серотипа 8 и промотора TBG. Однако в данном случае не удалось избежать появления единичных трансдуцированных клеток в нецелевых органах - сердце и поджелудочной железе. В качестве альтернативы вирусной трансдукции были выбраны липидные наночастицы (LNPs). Были получены частицы, несущие ген люциферазы светлячка (Fluc). После введения частиц в хвостовую вену мышей и последующей инъекции люциферина люминесцентный сигнал оставался детектируемым с помощью системы прижизненной визуализации IVIS до 14 дней. Также применяли гидродинамическую трансфекцию плазмидой, содержащей нуклеотидную последовательность EGFP. Детекцию флуоресцентного сигнала в гепатоцитах успешно провели через 2 дня после инъекции. Мы полагаем, что использование плазмид с кДНК онкогенов, фланкированных касетами транспозона, в комбинации с транспозазой Sleeping Beauty позволит добиться стабильной экспрессии выбранных онкогенов на протяжении нескольких недель. При использовании 8 серотипа AAV в качестве агента вирусной трансдукции удалось достичь трансдукции практически всех клеток печени, однако, было отмечено нецелевое заражение сердца и поджелудочной железы. При использовании липидных наночастиц мы детектировали люминесцентный сигнал только в печени как через неделю после инъекции, так и через две, что делает их привлекательным инструментом для перспективного применения при доставке различных генов и индукции онкогенеза. В случае же гидродинамической трансфекции мы детектировали сигнал EGFP в печени уже через 2 дня после манипуляции. Полученные данные планируем использовать при работе с мышинными линиями с тканеспецифичной оверэкспрессией FSP1 и GPX4, полученными в лаборатории Маркуса Конрада (центр Гельмгольца, Мюнхен).

### 9.36. ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО АЛКАЛОЗА НА НЕЙРОЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ИОНОВ ЦИНКА

Шеденкова М.О.<sup>1</sup>, Стельмашук Е.В.<sup>2</sup>, Голышев С.А.<sup>3</sup>, Исаев Н.К.<sup>1,2,3</sup>

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

<sup>2</sup>НЦ неврологии, Москва

<sup>3</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В.

Ломоносова, Москва

margarita.shedenkova@yandex.ru

Цинк - двухвалентный ион, который принимает участие в реализации широкого спектра биологических функций. Уже достаточно давно известно, что нарушение гомеостаза цинка играет большую роль в гибели нейронов, вызванной инсультом, черепно-мозговой травмой и нейродегенеративными заболеваниями. Не менее известным является тот факт, что многие патологические состояния головного мозга сопровождаются нарушением внеклеточного и внутриклеточного рН. На сегодняшний момент существует немало исследований, которые показывают взаимное участие как внутриклеточного, так и внеклеточного ацидоза и ионов цинка в процессах развития патологических состояний таких как гипоксия, которая является одним из последствий травм головного мозга. Однако влияние защелачивания среды, которое происходит, например, во время гипогликемии, практически не изучено. В связи с выше сказанным, целью нашей работы было изучение влияния токсичных концентраций цинка на внутриклеточный рН и влияние внеклеточного алкалоза на нейроцитотоксичность  $Zn^{2+}$ . В ходе экспериментов было показано, что хлорид цинка (30-50 мкМ, 24 ч), добавленный в среду культивирования зернистых нейронов мозжечка крысы вызывал дозозависимую гибель этих клеток, которой предшествовало увеличение уровней свободного внутриклеточного цинка, снижение уровня внутриклеточного свободного кальция и снижение внутриклеточного рН. По ультраструктурным морфологическим признакам процесс гибели клеток происходил по механизму некроза, так как он сопровождался набуханием внутриклеточных органелл и нарушением клеточных мембран на фоне относительно интактных ядерных мембран. Однако токсическое действие ионов цинка значительно снижалось с увеличением внеклеточного рН от 7,3 до 7,8, за счет уменьшения цинковой перегрузки цитоплазмы этих клеток. Также было обнаружено, что присутствие в среде культивирования МК-801, блокатора каналов ассоциированных с NMDA-рецепторами, защищает от токсического действия  $Zn^{2+}$  при нейтральном рН и достоверно снижает загрузку ионов цинка в нейроны. Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что увеличение внеклеточного рН и блокировка NMDA-рецепторов способны снизить цитотоксическое действие ионов цинка.

### 9.37. ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧНЫЕ НАНОСТЕРЖНИ ДЛЯ ФОТОТЕРМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ *IN VIVO*

Шилова М.В.<sup>1</sup>, Прошкина Г.М.<sup>1</sup>, Шрамова Е.И.<sup>1</sup>, Котляр А.Б.<sup>2</sup>,  
Деев С.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Тель-Авивский университет, Тель-Авив, Израиль  
mari\_shilova29@mail.ru

В настоящее время идет активная разработка новых методов для эффективной терапии онкологических заболеваний, обладающих избирательным действием на опухоль и при этом вызывающих минимальные побочные эффекты. Одним из таких подходов является фототермическая терапия, принцип действия которой базируется на использовании фотон-индуцированного локального разогревания биоткани, вызывающего гибель опухолевых клеток без повреждения прилежащих здоровых тканей. Золотые наночастицы зарекомендовали себя одними из наиболее оптимальных кандидатов на роль фототермических агентов, поскольку обладают высокой коллоидной стабильностью, а также способны эффективно преобразовывать световую энергию в тепло.

В данной работе были получены стабилизированные бычьим сывороточным альбумином золотые наностержни (GNRs-BSA, линейные размеры 7x50 нм) с максимумом поглощения 850 нм (второе окно прозрачности биоткани, 700-1400 нм). К конъюгату GNRs-BSA ковалентно присоединяли молекулы адресного неиммуноглобулинового скаффолда DARPin, обладающего высокой специфичностью к поверхностному онкомаркеру HER2. Исследование DARPin-GNRs-BSA *in vivo* показало, что при внутрибрюшинном введении мышам с привитыми HER2-положительными опухолями адресных наностержней происходит их эффективное накопление в опухоли. Облучение опухоли светодиодом с длиной волны 850 нм вызывает замедление роста первичного опухолевого узла по сравнению с контрольной группой, коэффициент торможения роста опухоли при этом равен 70%.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-54-06001.

### **9.38. ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ СКРИНИНГ МИШЕНЕЙ И ДИЗАЙН ПРАЙМЕРОВ ПРИ СОЗДАНИИ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА**

***Ширшиков Ф.В.<sup>1,2</sup>, Беспятых Ю.А.<sup>1,2</sup>***

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

shirshikov@rcpcm.org

Молекулярная диагностика вирусных инфекций с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот зачастую осложняется мутационной изменчивостью вирусов и появлением новых генотипов. Международные базы данных ежедневно пополняются полными геномами актуальных штаммов, однако обработка такого массива данных требует значительных вычислительных ресурсов и применения узкоспециализированного программного обеспечения.

Разработанный ранее алгоритм MorphoCatcher (<http://morphocatcher.ru>) позволяет извлечь из множественного выравнивания генотип-специфичные нуклеотидные полиморфизмы, графически визуализировать их скопления и локализацию, а также разместить эти нуклеотиды на концах праймеров для повышения специфичности в отношении конкретного генотипа. Особенность данного подхода в том, что поиск консервативной области проводится не только для всех штаммов различных генотипов, но и для каждого отдельного генотипа. Это позволяет дополнить универсальную консенсусную последовательность нуклеотидами, которые сохраняются в штаммах одного генотипа. При этом количество анализируемых штаммов ограничивается только используемым алгоритмом множественного выравнивания. В совокупности эти особенности повышают ускорить процедуру дизайна специфичных праймеров, позволяя определять подходящий участок для сайтов отжига на протяжении всего генома, избегая необходимости анализировать полиморфизмы отдельных генов.

Целью данной работы было продемонстрировать использование алгоритма MorphoCatcher при создании тест-систем для генотипирования вирусов человека. Из геномных баз данных загружены геномы вируса гепатита С (1460 штаммов) и вируса Зика (517 штаммов). Построены филогенетические деревья на основе их полногеномных последовательностей. С помощью алгоритма MorphoCatcher определены полиморфные участки генома вирусов; сформированы библиотеки сайтов отжига праймеров с терминальными генотип-специфичными полиморфизмами; выполнен дизайн специфичных праймеров, которые можно использовать в методах полимеразной цепной реакции и петлевой изотермической амплификации.

## 9.39. РАЗРАБОТКА БИОСОВМЕСТИМЫХ ДЕГРАДИРУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ В СИСТЕМЕ БИОПОЛИМЕРЫ-ФОСФАТЫ КАЛЬЦИЯ

Шлык М.А.<sup>1</sup>, Тетерина А.Ю.<sup>2</sup>, Егоров А.А.<sup>2</sup>, Комлев В.С.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва  
mihashlykov@gmail.com

Человеческий организм подвержен болезням и старению; люди получают травмы. Это негативно сказывается на здоровье костной ткани: кости разрушаются и повреждаются, что приводит к появлению дефектов. Один из способов лечения - синтетические материалы для замещения костной ткани, которые обладают рядом преимуществ: биосовместимость, регулируемые физико-химические и биологические свойства, возможность включения в состав лекарственных препаратов [1].

В работе использованы полимеры: альгинат натрия и яблочный пектин - биосовместимые полисахариды растительного происхождения, позволяющие создавать пористые структуры. В состав полимерного матрикса включены гранулы  $\alpha$ -трикальцийфосфата ( $\alpha$ -ТКФ  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), размер гранул 300-500 мкм) - биосовместимая модификация, обладающая высокой (среди других фосфатов кальция) скоростью резорбции.

Такой состав позволяет создавать матриксы с применением аддитивных технологий, в частности, 3D-печати. Данный метод позволяет решить проблему несоответствия формы имплантата и дефекта [2].

В результате выполнения работы разработан материал для создания трехмерных конструкций методом 3D-печати на основе альгината натрия, яблочного пектина и  $\alpha$ -ТКФ. Исследованы микроструктура и физико-химические характеристики: получены зависимости динамической вязкости, кинетики деградации (7/14/28 дней) в замкнутой системе в SBF - растворе, имитирующем внеклеточную среду организма.

Работа выполнена в рамках реализации Государственного задания №075-00328-21-00 на 2021 год.

*Литература:*

1. Предеин Ю.А., Рерих В.В. Костные и клеточные имплантаты для замещения дефектов кости // Современные проблемы науки и образования, 2016, №2, с. 132-146.
2. Сергеева Н.С., Комлев В.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., Шанский Я.Д., Кувшинова Е.А., Федотов А.Ю., Тетерина А.Ю., Егоров А.А., Зобков Ю.В., Баринов С.М. Некоторые физико-химические и биологические характеристики трехмерных конструкций на основе альгината натрия и фосфатов кальция, полученных методом 3D-печати и предназначенных для реконструкции костных дефектов// Гены & клетки Том X, № 2, 2015.

#### **9.40. СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПЕРЕВЯЗОЧНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ РАН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТЕАЗ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА**

**Шокодько М.И., Ванюшенкова А.А., Побережный Д.Ю., Каленов С.В., Белов А.А.**

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,  
Москва  
mishokodko@mail.ru

Выбор компонентов препарата для заживления гнойно-некротических ран основан на понимании свойств того или иного материала, а также физиологии процесса заживления. Функции повязки: обеспечение влажности раневой поверхности (на ранних стадиях процесса заживления) и газообмена раневой поверхности с окружающей средой для интенсификации процесса выздоровления, препятствование теплопотере и вторичному инфицированию раны, а также эффективное удаление избытка раневого экссудата и его токсических компонентов. Свойства препарата: атравматичность, неаллергенность и нетоксичность. Также, в зависимости от генеза раны или фазы раневого процесса, требования, предъявляемые к заживляющим препаратам, значительно изменяются.

При разработке таких препаратов биологическую активность терапевтической композиции исследуют со стороны трёх составляющих: протеолитическая активность (способность препарата очищать рану от некротических и нежизнеспособных клеток, раневых экссудатов, гнойных детритов, сгустков крови), антиоксидантная активность (предупреждение развития свободно радикальных реакций в процессе перекисного окисления липидов в очаге воспаления) и антибактериальные свойства (нейтрализация и сорбция микробных клеток, активация фагоцитов и макрофагов).

Было исследовано влияние различных форм серебра на протеазы, использующиеся в медицине в 0,2М ацетатном буферном растворе при pH 6,1 (pH гнойной раны в начальный момент заживления), при различном времени совместного выдерживания. Параллельно изучали влияние на биоцидность полученной композиции добавки фермента или стабилизатора (хитозан). В качестве тест-культур использовались штаммы *St. aureus* и др. Биоцидное действие разрабатываемых композиций анализировали при помощи 96-луночного планшета и метода колодцев на твердых агаризованных средах. Полученные системы изучали различными физико-химическими методами. После исследований композиции протеолитический фермент (или комплекс ферментов) - серебро (в форме ионов или наночастиц химического или биогенного происхождения) сделали выводы о её соответствии препарату по вышеупомянутым параметрам. Самое важное качество данной композиции - возможность в определённых несложно реализуемых условиях одновременного присутствия компонентов в препарате, без значительного уменьшения активностей друг друга.

## 9.41. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У КЛЕТОК МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА К ДЕЙСТВИЮ TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА В ВЫСОКОПЛОТНЫХ КУЛЬТУРАХ

Штатнова Д.Ю.<sup>1,2</sup>, Кобякова М.И.<sup>2</sup>, Ломовская Я.В.<sup>2</sup>, Ломовский А.И.<sup>2</sup>, Фадеев Р.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, dariashtatnova@yandex.ru

На данный момент в терапии миелоидных лейкозов многообещающим является препарат, содержащий рекомбинантный белок TRAIL, из-за своих уникальных свойств избирательно действовать на опухолевые клетки и при этом сохранять нормальные. TRAIL-белок присоединяется к своим специфическим рецепторам на поверхности опухолевых клеток и запускает каскад реакций, приводящих к апоптозу. Однако клинические испытания потерпели неудачу из-за формирования резистентности у опухолевых клеток к действию препарата. Факторы микроокружения играют одну из решающих ролей в формировании резистентности лейкозных клеток. На сегодняшний день есть публикации, демонстрирующие повышение устойчивости *in vitro* клеток ОМЛ, зависящее от плотности культуры, к действию противоопухолевых препаратов. В данной работе мы провели исследование возможности возникновения устойчивости клеток ОМЛ в высокоплотных культурах к действию TRAIL-индуцированного апоптоза.

Объектами исследования послужили клеточные линии миелоидного лейкоза ТНР-1, К562 и U937 (Всероссийская клеточная коллекция, Санкт-Петербург, Россия). Для формирования высокоплотных структур использовали 96-луночные планшеты, покрытые 1,5% агарозным гелем, в которые высевали клетки в количестве  $5 \cdot 10^3$  в 100 мкл среды RPMI-1640/F-12 (Sigma-Aldrich, США) с 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), и культивировали в течение 24, 48, 72, 96 и 120 ч, после чего клетки были обработаны рекомбинантным белком izTRAIL. Жизнеспособность оценивали по интенсивности восстановления резазурина (Sigma, США).

В ходе исследования было установлено, что в течение 120 ч у клеток происходит повышение устойчивости к действию TRAIL-индуцированного апоптоза. Наиболее выраженный эффект показали клетки ТНР-1, так как на 5 суток после обработки рекомбинантным белком izTRAIL при концентрации 1,5 мкг/мл количество живых составляло 94,8%. У клеток же К562 и U937 показатели живых клеток составили 54% и 31%, соответственно.

Таким образом, результаты проведенного исследования демонстрируют возможность возникновения резистентности к действию TRAIL у клеток миелоидного лейкоза в высокоплотных культурах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №20-34-90062.

## 9.42. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ АНАЛОГОВ НУКЛЕОЗИДОВ К РНК-СОДЕРЖАЩИМ ВИРУСАМ

*Яковчук Е.В.*<sup>1,2</sup>, *Шустова Е.Ю.*<sup>1</sup>, *Матюгина Е.С.*<sup>3</sup>, *Хандажинская А.Л.*<sup>3</sup>, *Колпакова Е.С.*<sup>1</sup>, *Козловская Л.И.*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва

<sup>2</sup>Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва  
yakovchuklisa@gmail.com

Природные нуклеозиды и их модифицированные аналоги нашли широкое применение в лечении ряда вирусных инфекций. Действие таких препаратов чаще всего основано на ингибировании вирусных полимераз. Поскольку РНК-содержащие вирусы используют полимеразы, не характерные для клетки-хозяина (РНК-зависимую РНК полимеразу, РНК-зависимую ДНК полимеразу), эти ферменты можно использовать в качестве мишеней для противовирусных препаратов.

В данной работе были исследована эффективность 85 аналогов нуклеозидов против вирусов SARS-CoV-2 (штамм ПИК35), вируса Чикунгуны (штамм Nic) в культуре клеток Vero, ВИЧ-1 (штамм NL 4-3) в культуре клеток MT-4 и энтеровируса A71 (штамм 46973) в культуре клеток RD. Противовирусную активность оценивали по способности соединений подавлять цитопатическое действие вирусов, была рассчитана полуэффективная концентрация  $EC_{50}$ .

По результатам экспериментов два соединения показали ингибирующую активность против SARS-CoV-2 ( $EC_{50}$  20-70  $\mu$ M). Пять соединений показали ингибирующую активность против ВИЧ-1 ( $EC_{50}$  5-18  $\mu$ M), при этом они обладали более низкой цитотоксичностью, чем препарат сравнения азидотимидин. Одно из соединений проявило активность сразу против обоих вирусов.

Данные соединения являются многообещающей основой для дополнительных модификаций и дальнейшей разработки противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60414.

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абакумова Т.О.	159	Бершакский Я.В.	11, 21, 32
Агапова Ю.К.	5	Беспярых Ю.А.	162
Азарова Д.Ю.	6	Бирюкова В.Н.	125
Акатов В.С.	144	Бобылёва П.И.	87
Аксенов В.В.	89	Бовин Н.В.	24, 30, 41, 43, 45, 46, 48
Александровская Н.А.	85	Богданов И.В.	117
Алексахина В.В.	111	Бойко К.М.	13
Алексахина И.А.	91	Болховитина Е.Л.	73
Алексеев К.С.	59	Борщевский В.И.	10, 25, 58
Алексеева Л.Г.	74	Бочаров Э.В.	11, 21, 32, 68
Алексеева Н.А.	70	Бочарова О.В.	11
Амозова В.И.	78	Бояринцев В.В.	147
Андреев Я.А.	22, 36	Брагина Н.А.	155
Андрианова А.А.	7, 45	Брылёв В.А.	14, 113
Антошина Д.В.	8	Брюшкова А.А.	71
Антсон А.А.	69	Бугрова А.Е.	6
Арбатский М.С.	79	Будагова Т.Ю.	94
Аронов Д.А.	132	Буздин А.А.	148
Арсеньев А.С.	11, 23, 25, 32, 60, 64	Булахов А.Г.	71
Артемова Д.А.	124	Бусыгин С.А.	129
Артыков А.А.	67, 103	Бутузова Д.А.	79
Артюхов В.Г.	146	Бутылин А.А.	126
Архипова О.В.	35	Бучельников А.С.	51
Атрошенко Д.Л.	61	Бучельникова В.А.	51
Ахметгалиева А.Ф.	30	Бычек И.А.	12
<b>Багров Д.В.</b>	147	Бычков М.Л.	88
Багрова О.Е.	9	Бычкова А.В.	97, 149
Бакулев В.М.	53	Бэйфилд О.В.	69
Балакина А.А.	78	<b>Вабаев М.А.</b>	8
Баландин С.В.	8	Вавилов М.В.	39
Балеева Н.С.	49	Ваничкин Д.А.	52
Баранов М.С.	10, 49, 64	Ванюшенкова А.А.	127, 164
Барышев А.В.	91	Варакса Т.	58
Басалова Н.А.	79	Варижук И.В.	12
Батенькин М.А.	130	Варфоломеева Л.А.	13
Башорин А.Р.	92	Василев Ч.Л.	76, 77
Белкина Е.Г.	37	Василевский А.А.	15
Белов А.А.	127, 164	Василенко Е.А.	76, 77
Белов К.В.	50	Василенко Л.М.	54
Белогуров А.А.	26, 33	Васильева А.Д.	6
Белозерова О.А.	62	Васильева Е.В.	60
Белоусов А.С.	10	Вахрамеев Д.Д.	25
Белоусов В.В.	159	Величко А.К.	84
Березовская М.Ю.	93	Веретененко И.И.	40

Ветошева П.И.	159	Деев С.М.	74, 102, 104, 108,
Ветровой О.В.	128, 153		119, 120, 133,
Вишнякова А.В.	116		134, 145, 161
Вишнякова П.А.	124	Демина Т.С.	125, 139
Власова Н.Н.	94	Демкина А.О.	82
Волков Д.В.	95	Дергоусова Н.И.	13
Волынский П.Е.	23	Дерюшева Е.И.	17
Воробьев И.И.	96, 107, 118	Дерябина Ю.И.	47, 106
Воронцова Е.В.	103	Джавахиya В.В.	114
Габиров А.Г.	104	Джалилова Д.Ш.	145
Габова А.О.	80	Долгих Д.А.	67
Габрусенок П.В.	53	Доронин И.И.	133
Гавриленкова А.А.	68	Дреничев М.С.	57, 59
Гаврилина Е.С.	6	Дроздова М.Г.	125, 139
Гавшина А.В.	27	Дуань Ш.	18
Ганжула Е.П.	14	Дубенская Н.А.	87
Ганцова Е.А.	68, 81	Дурыманов М.О.	147
Гаспарян М.Э.	67, 103	Дышин А.А.	50
Гаямова Е.А.	96	Дятлова А.С.	72
Гесслер Н.Н.	106	Евсеев П.В.	121
Гиголаев А.М.	15	Егоркин Н.А.	19
Гилеп А.	58	Егоров А.А.	163
Глаголева Е.В.	114	Еремичев Р.Ю.	85
Голованов А.Б.	89, 158	Ермакова П.С.	130
Гольшев С.А.	160	Ершов А.П.	98
Гончарук М.В.	23, 25	Есипов Р.С.	92, 101
Гончарук С.А.	23, 25, 60, 64	Ефименко А.Ю.	79
Горбенко Д.А.	93	Ефремов Р.Г.	15, 21, 28, 40, 42
Гордеева А.Е.	136	Жданова К.А.	155
Горобец М.Г.	97, 149	Женило С.В.	82
Гороховатский А.Ю.	7	Журавлев А.Д.	55
Горшкова Е.Н.	76, 77	Журавлев А.М.	89, 158
Грамматикова Н.Э.	47	Журавлева Е.А.	99
Грановский И.Э.	112	Загайнов В.Е.	130
Гречихина М.В.	133	Загайнова Е.В.	130
Григорьев Я.А.	129	Загрядская Ю.	58
Гроза Н.В.	47	Зайграев М.М.	20
Груздев Д.С.	98	Зайцева Э.Р.	57
Гугля Е.Б.	62	Залевский А.О.	25
Гусева Е.А.	16	Зальгин А.В.	48
Дашевский Д.Е.	54	Зацепин Т.С.	159
Даянова Л.К.	96, 107	Звонарев А.Н.	151
Деев И.Е.	68, 81	Звягина А.И.	144
Деев Р.В.	129	Зеленукин И.В.	102, 119, 145
		Земскова М.Ю.	94, 112, 151

Зенкова М.А.	104	Кокорева А.С.	106
Зенов М.А.	83	Коктыш И.В.	110, 115
Зенченко А.А.	57	Колбин И.С.	94
Зимарева Д.А.	37	Колесов Д.Э.	107
Зорина Е.А.	101	Колпакова Е.С.	166
<b>Иванов Д.К.</b>	101	Колпашиков Д.М.	93
Иванов И.В.	89, 158	Комарова В.А.	41
Иванов И.Н.	102, 119, 145	Комедчикова Е.Н.	108
Игнатова А.А.	137	Комлев В.С.	156, 163
Идиятуллина А.Р.	21	Конев А.Н.	130
Илясов И.О.	131	Кононихин А.С.	6
Исаев Н.К.	160	Конрад М.	159
Исакова А.А.	103	Константинова И.Д.	92, 101, 123
Исакова Е.П.	106	Корнилов Ф.Д.	23
<b>Казаков А.С.</b>	17, 151	Коршун В.А.	14, 113, 141, 143
Какуев Д.Л.	138	Костромина М.А.	101
Каленов С.В.	164	Костюк К.А.	42
Калинин М.А.	132	Кот Э.Ф.	60, 64
Калинин Р.С.	104	Котельникова П.А.	108, 134
Калиновский А.П.	22	Котляр А.Б.	161
Калиновский Д.В.	133	Кочина Я.А.	118
Кантидзе О.Л.	84	Кошкина М.К.	61
Канушкина М.Д.	122	Красильников М.С.	141
Каплун Д.С.	82	Крестьянинов М.А.	50
Капранов И.	58	Кудан Е.В.	135
Карпова М.	58	Кудан С.П.	135
Касаикина О.Т.	66	Куджаев А.М.	62
Касимова А.А.	121	Кудряпцев Д.С.	63
Касьяненко Н.А.	53, 91	Кудряева А.А.	26, 33
Кацар М.С.	89	Кудряшова Е.В.	52
Кашина А.В.	130	Кузнецов А.С.	21
Каюшин А.Л.	23	Кузнецова Е.Г.	94
Кельмансон И.В.	159	Кулебякина М.А.	79, 83, 85
Кер Д.С.	69	Куликов А.М.	37
Кильдеева Н.Р.	125	Курбанова Л.А.	103
Киселев М.Г.	50	Курганова Э.А.	136
Клинов Д.В.	147	Курьшикина М.С.	109
Клычников О.И.	69, 79	Кучугурин В.А.	114
Книрель Ю.А.	121	Лазебный О.Е.	37
Кобякова М.И.	144, 165	Ларионова В.А.	137
Коваленко В.Л.	105	Лебедева Л.А.	129
Коваленко Е.И.	70, 75	Левкина А.А.	159
Ковнир С.В.	96	Леньшина Н.А.	130
Козлов С.А.	22, 36	Липатников А.Д.	24
Козлова А.А.	59	Лисов А.В.	151
Козловская Л.И.	166	Литти Ю.В.	99, 116
		Литус Е.А.	17

Ломовская Я.В.	165	Можаева В.А.	63
Ломовский А.И.	165	Моисеева Е.В.	132
Лугинина А.П.	25, 54	Мосенцов А.А.	141
Лушпа В.А.	15, 23, 25	Мотов В.В.	64
Люблинская О.Г.	55	Мощенко А.А.	159
Люкманова Е.Н.	20, 88	Мурадова А.Г.	97
<b>Мазур А.М.</b>	82	Мурова Д.Е.	73
Майкова О.О.	38	Мышкина Н.М.	7, 45
Майоров С.Г.	112	Мяснянко И.Н.	64
Макаревич П.И.	83, 85	<b>Надеждин К.Д.</b>	11
Макарова М.О.	26	Назина Т.Н.	98
Максимов Г.В.	150	Немашкалова Е.Л.	17
Максимов Е.Г.	19	Нестерко Е.Э.	72
Мальшко Е.В.	9	Нешев Н.И.	87
Мальцев Д.И.	159	Никитин Д.М.	148
Мальцева Д.В.	30	Никитина М.А.	29
Мамасва А.А.	138	Никифорова А.В.	30
Мамедова А.Р.	139	Николаев Е.Н.	6
Маренкова Е.А.	62	Новикова Н.И.	112
Мариевская К.А.	141	Новосёлов В.И.	136
Марквичева Е.А.	103, 125, 139, 151	Нокель А.Ю.	30
Мартынов В.И.	126, 138, 154, 157	<b>Образцова Е.А.</b>	46
Марынич Н.К.	27	Овсяникова О.В.	74
Маскевич С.А.	110, 115	Овчинникова Т.В.	8, 18, 29, 34, 117, 122, 137
Маслов И.В.	10	<b>Октябрьский О.Н.</b>	80
Масчан М.А.	95	Олейников В.А.	48
Магусевич О.А.	110, 115	Орешков С.Д.	14, 113
Матюгина Е.С.	166	Орлова Н.А.	96, 107, 118
Медведева В.П.	141	Осипова З.М.	7, 39, 45
Мелешкина Е.Г.	143	Ословский В.Е.	57
Мельникова Д.Н.	29, 117	Осмаков Д.И.	36
Мельникова Я.И.	110, 115	Охрименко И.С.	32, 58
Менухов В.О.	144	<b>Павлова Е.Р.</b>	147
Микулинская Г.В.	35	Павлюков М.С.	88
Минайчев В.В.	144	Паламарчук А.И.	70, 75
Минаков А.С.	28	Панкова С.М.	146
Минеев К.С.	15, 23, 25, 60, 64	Пантелеев П.В.	18, 34
Минина Е.П.	84	Папонов Б.В.	51
Миркасымов А.Б.	145	Парамонов А.С.	20
Миронова Г.Д.	141	Пахомов А.А.	126, 138, 154, 157
Мирошников К.А.	121	Пеньёр С.	15
Митина Е.Р.	111	Пермяков С.Е.	17
Михайлова А.Г.	31	Петракова Д.О.	43
Михайлова Ю.В.	121	Петренко А.Г.	68, 81
Михеева П.В.	144		
Мишин А.В.	54		
Мишин А.С.	10		

Петренко Д.Е.	31	Семенова Е.М.	98
Петрова К.С.	114	Семёнова М.В.	109
Петушков В.Н.	39	Семенюк П.И.	152
Пиньейро-Жуниор Э.Л.	15	Сервули Е.А.	73
Пицко (Калугина) Т.С.	110, 115	Сергиев П.В.	16
Плещинская Д.Д.	32	Серова О.В.	68, 81
Плетнев Ф.И.	16	Сивопляс Е.А.	37
Побережный Д.Ю.	164	Сильвестрова А.А.	45
Поляков К.М.	13	Синегубова М.В.	107, 118
Полянская А.Ю.	147	Синицына А.П.	102, 119
Попов В.О.	13	Слатинская О.В.	150
Попов В.С.	83, 85	Сливка Е.В.	46
Попова А.В.	121	Слонимский Ю.Б.	19
Попова И.С.	41, 45	Случанко Н.Н.	19, 69
Попова Н.М.	116	Смирнов А.Ю.	57
Попырина Т.Н.	139	Смирнов И.В.	144, 151
Потапов А.Е.	117	Смирнова А.С.	83, 85
Потапова Н.В.	66	Смирнова Г.В.	80
Прохоров К.А.	63	Смит Дж.Л.	69
Прошкина Г.М.	161	Согомонян А.С.	105, 108, 120
Психа Б.Л.	87	Соколов А.И.	64
Пшеничникова А.Б.	111	Соколова Д.Ш.	98
Рабушко Е.Н.	148	Соколова Е.М.	87
Раззоронова Е.А.	76	Соловьёва Е.В.	156
Разин С.В.	84	Сорокин М.И.	148
Ракитина Т.В.	5, 31, 32	Софронова А.А.	152
Рапопорт Е.М.	24, 41, 46	Сохранева В.А.	47
Родионова Н.С.	39	Стародумова И.П.	62
Розенфельд М.А.	6	Стельмашук Е.В.	160
Ролич В.И.	53	Степанов А.В.	95, 104
Рубель М.С.	93	Стратилов В.А.	153
Рубцов Ю.П.	104	Стрельцова М.А.	70, 75
Рыжов И.М.	41, 43, 45	Струшкевич Н.	58
Рыскина А.М.	33	Ступина Т.С.	78
Саблина М.А.	45	Сузина Н.Е.	151
Савельева И.О.	155	Сунгурова А.С.	154, 157
Савицкий А.П.	27	Сунцова М.В.	148
Савченко М.С.	45	Сысоев А.А.	69
Садькова Э.З.	149	Сысоева В.А.	159
Сажнев Н.А.	125	Табакмахер В.М.	15
Сакибаев Ф.А.	146	Тальзина И.А.	25
Санина Н.А.	78	Таухугдинова С.Р.	35
Сапожников А.М.	73, 74	Терентьев А.А.	78
Сапожникова К.А.	14, 143	Тетерина А.Ю.	144, 156, 163
Сафонов А.В.	116	Тимофеев В.И.	5, 31
Сафронова В.Н.	34	Тимошина О.Ю.	121
		Титгат Я.	15

Тихонова Т.В.	13	Черников И.В.	104
Тишков В.И.	61	Черногорцева М.В.	125
Толстова Т.В.	125, 139	Чесноков С.А.	130
Трофименко А.В.	147	Чистов А.А.	141
Трофимов Ю.А.	28, 40	Чугунов А.О.	20
Тугасва К.В.	69	Чудаков Д.М.	71
Тузиков А.Б.	43, 46	Чудинов М.В.	123
Турова Т.П.	98	Чурина Т.С.	77
Тырина (Толикова) Е.А.	87		
Тыргыш Т.В.	45	<b>Шабалкина А.В.</b>	23, 60, 64
Тюленев А.В.	80	Шарапаев А.И.	97
		Шаульская В.С.	54
<b>Украинская В.М.</b>	95	Шафиуллина Р.Р.	158
Усанёв А.Ю.	155	Шаховцев Д.А.	159
Устинов А.В.	113, 141	Шевелева М.П.	17
		Шевцов М.Б.	25
<b>Фадеев Р.С.</b>	144, 165	Шевченко М.А.	73
Фадеева И.С.	144	Шеденкова М.О.	160
Фатеев И.В.	92, 101, 123	Шенкарев З.О.	20
Фатеева С.И.	122	Шестопалова М.С.	48
Федорина А.С.	73	Шехурдина С.В.	99
Фегисова В.Э.	156	Шидловский Ю.В.	129
Филонова Г.Е.	82	Шилова М.В.	161
Фильков Г.И.	147	Шилова Н.В.	24, 30
Финкина Е.И.	122, 137	Шилова О.Н.	105
Фридрих Т.	19	Шипков Н.С.	13
Фролова А.Ю.	126, 138, 154, 157	Шипунова В.О.	104, 105, 108, 119, 120, 134
Фролова В.Д.	123		
		Ширшиков Ф.В.	162
<b>Хайдуков С.В.</b>	41, 46	Шлепова О.В.	88
Хандажинская А.Л.	166	Шлыков М.А.	163
Хасанов Т.А.	36	Шнейдер М.М.	121
Хачатрян Д.С.	149	Шокодько М.И.	164
Хлопин В.А.	30	Шохина А.Г.	159
Хмиль Н.В.	141	Шошина Н.С.	89
Ходов И.А.	50	Шрамова Е.И.	161
Хокинс Д.Э.	69	Штатнова Д.Ю.	165
Холоденко И.В.	133	Штыкова Э.В.	48
Холоденко Р.В.	133	Шулепко М.А.	88
Холявка М.Г.	146	Шульга А.А.	74, 104
Хорн П.А.	10, 54	Шупова Е.В.	51
Хуань Ю.	18	Шустова Е.Ю.	166
Хундерякова Н.В.	141		
		<b>Юрина Л.В.</b>	6
<b>Царькова А.С.</b>	39	Юсупова Д.А.	47
<b>Чеглакова В.Н.</b>	116	<b>Яголович А.В.</b>	67, 103
Чемезова А.А.	38	Яковчук Е.В.	166
		Якунина М.Н.	149

# СОДЕРЖАНИЕ

## ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

### СЕКЦИЯ 1

#### СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ. БИОКАТАЛИЗ

- 1.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ГИСТОНОПОДОБНЫХ НУ-БЕЛКОВ МЕТОДОМ MM-GBSA  
*Азапова Ю.К., Тимофеев В.И., Ракитина Т.В.* ..... 5
- 1.2. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЛЕКУЛЫ ФИБРИНОГЕНА, ВЫЗВАННЫЕ ПЕРОКСИД-ИНДУЦИРОВАННЫМ ОКИСЛЕНИЕМ  
*Азарова Д.Ю., Гаврилина Е.С., Юрина Л.В., Васильева А.Д., Бугрова А.Е., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А.* ..... 6
- 1.3. ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ РЕАКЦИИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ *NEONOTHOPANUS NAMBI*  
*Андрианова А.А., Гороховатский А.Ю., Мышкина Н.М., Осипова З.М.* ..... 7
- 1.4. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ II КЛАССА  
*Антошина Д.В., Ваваев М.А., Овчинникова Т.В., Баландин С.В.* ..... 8
- 1.5. ПРОСТЕЙШАЯ МЕХАНИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ХИРАЛЬНЫХ БИОМОЛЕКУЛ  
*Багрова О.Е., Малышко Е.В.* ..... 9
- 1.6. СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АДЕНОЗИНОВОГО РЕЦЕПТОРА  $A_{2A}$  ПРИ ПОМОЩИ СОЛЬВАТОХРОМНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ  
*Белюсов А.С., Маслов И.В., Хорн П.А., Мишин А.С., Баранов М.С., Борщевский В.И.* ..... 10
- 1.7. СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ ПОДСЕМЕЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ ИНСУЛИНА  
*Бершацкий Я.В., Бочарова О.В., Надеждин К.Д., Арсеньев А.С., Бочаров Э.В.* ..... 11
- 1.8. ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ И ПОВЫШЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР НА АКТИВНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ  
*Бычек И.А., Варижук И.В.* ..... 12
- 1.9. ПЕРЕСТРОЙКИ МЕДНОГО КЛАСТЕРА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *HYDROGENOPHILIA BACTERIUM* В ПРОЦЕССЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НА ОСНОВЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫХ ДАННЫХ С АТОМНЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ  
*Варфоломеева Л.А., Поляков К.М., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О.* ..... 13

- 1.10. НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КАТЕПСИНОВОГО ЛИНКЕРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСЩЕПЛЯЕМЫХ КОНЪЮГАТОВ БИОМОЛЕКУЛ  
*Ганжула Е.П., Брылёв В.А., Орешков С.Д., Сапожникова К.А., Коршун В.А.* ..... 14
- 1.11. НОВЫЙ ВЫСОКОАФФИННЫЙ ПЕПТИДНЫЙ ЛИГАНД КАЛИЕВОГО КАНАЛА Kv1.6  
*Гиголаев А.М., Табакмахер В.М., Пиньейро-Жуниор Э.Л., Лушпа В.А., Пеньёр С., Минеев К.С., Ефремов Р.Г., Титгат Я., Василевский А.А.* ..... 15
- 1.12. ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕТИЧЕСКОЙ РНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ NSUN7 НА СПЕРМАТОГЕНЕЗ МЫШИ  
*Гусева Е.А., Плетнев Ф.И., Сергиев П.В.* ..... 16
- 1.13. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СЕРОТОНИНА И ТРИПТОФАНА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЫВОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С АМИЛОИДНЫМ БЕТА-ПЕПТИДОМ  
*Дерюшева Е.И., Литус Е.А., Казаков А.С., Немашкалова Е.Л., Шевелева М.П., Пермяков С.Е.* ..... 17
- 1.14. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПОИСК НОВЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ТРАНСКРИПТОМАХ МОРСКИХ ПОЛИХЕТ  
*Дуань Ш., Хуань Ю., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.* ..... 18
- 1.15. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АСТАКСАНТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА AstaP  
*Егоркин Н.А., Слонимский Ю.Б., Фридрих Т., Максимов Е.Г., Слущанко Н.Н.* ..... 19
- 1.16. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕЙРОМОДУЛЯТОРА Lynx2 С  $\alpha 4\beta 2$ -НИКОТИНОВЫМ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ  
*Заиграев М.М., Чугунов А.О., Шенкарев З.О., Люкманова Е.Н., Парамонов А.С.* ..... 20
- 1.17. ВЫЯВЛЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ РОЛИ КОНСЕРВАТИВНЫХ ОСТАТКОВ ПРОЛИНА В РЕЦЕПТОРАХ СЕМЕЙСТВА IR МЕТОДАМИ АТОМИСТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ  
*Идиятуллина А.Р., Бершацкий Я.В., Кузнецов А.С., Бочаров Э.В., Ефремов Р.Г.* ..... 21
- 1.18. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КИСЛОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТЧНОЙ ЛИНИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА  
*Калиновский А.П., Козлов С.А., Андреев Я.А.* ..... 22
- 1.19. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА И ПРИМЕМБРАННОГО ГИДРОФОБНОГО РЕГИОНА РЕЦЕПТОРОВ TLR2, TLR3 И TLR9 ЧЕЛОВЕКА  
*Корнилов Ф.Д., Шабалкина А.В., Лушпа В.А., Гончарук М.В., Каюшин А.Л., Вольнский П.Е., Арсеньев А.С., Гончарук С.А., Минеев К.С.* ..... 23

- 1.20. ЕСТЕСТВЕННЫЕ АНТИТЕЛА РАСПОЗНАЮТ УГЛЕВОДНЫЕ ЭПИТОПЫ НА АПОПТОТИЧЕСКИХ ТЕЛЦАХ  
*Липатников А.Д., Рапопорт Е.М., Бовин Н.В., Шилова Н.В.* ..... 24
- 1.21. МОДУЛЯЦИЯ СТРУКТУРЫ И АКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 1 ИОНАМИ  $Zn^{2+}$   
*Лушпа В.А., Гончарук М.В., Залевский А.О., Талызина И.А., Лугинина А.П., Вахрамеев Д.Д., Шевцов М.Б., Гончарук С.А., Арсеньев А.С., Борщевский В.И., Минеев К.С.* ..... 25
- 1.22. ЛЮЦИФЕРАЗНАЯ СПЛИТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ УБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ  
*Макарова М.О., Белогуров А.А., Кудряева А.А.* ..... 26
- 1.23. MoxSAASot1: ПЕРВЫЙ БИФОТОХРОМНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК, УСТОЙЧИВЫЙ В ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СУПЕРРАЗРЕШАЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ  
*Марынич Н.К., Гавшина А.В., Савицкий А.П.* ..... 27
- 1.24. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОХОЖДЕНИЯ ИОНОВ  $Na^{+}$  ЧЕРЕЗ "ГИДРОФОБНЫЙ ЗАТВОР" В ПОРЕ ИОННОГО КАНАЛА TRPV1  
*Минаков А.С., Трофимов Ю.А., Ефремов Р.Г.* ..... 28
- 1.25. ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ K61V НА СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ И ЛИПИДСВЯЗЫВАЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ БЕЛКА ЧЕЧЕВИЦЫ Lc-LTP2  
*Никитина М.А., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В.* ..... 29
- 1.26. РЕВИЗИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ КОММЕРЧЕСКИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЛЕКТИНОВ  
*Никифорова А.В., Ахметгалиева А.Ф., Хлопин В.А., Мальцева Д.В., Нокель А.Ю., Бовин Н.В., Шилова Н.В.* ..... 30
- 1.27. МОДИФИКАЦИЯ ШАРНИРНОЙ ОБЛАСТИ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В ИЗ *SERRATIA PROTEOMACULANS* ПОДАВЛЯЕТ КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ, НО СПОСОБСТВУЕТ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТА  
*Петренко Д.Е., Тимофеев В.И., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В.* ... 31
- 1.28. ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА РЕЦЕПТОРА RAGE ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЙ  
*Плащинская Д.Д., Бершацкий Я.В., Ракитина Т.В., Охрименко И.С., Арсеньев А.С., Бочаров Э.В.* ..... 32
- 1.29. ПРИМЕНЕНИЕ БИМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ УБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ  
*Рыскина А.М., Белогуров А.А., Кудряева А.А.* ..... 33
- 1.30. ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ VRI-NOS-АССОЦИИРОВАННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ МОРСКИХ ПОЛИХЕТ  
*Сафронова В.Н., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.* ..... 34
- 1.31. РЕКОМБИНАНТНАЯ МЕТАКРИЛАТРЕДУКТАЗА *GEOBACTER SULFURREDUCTENS* AM-1  
*Тахутдинова С.Р., Микулинская Г.В., Архипова О.В.* ..... 35

- 1.32. ИЗУЧЕНИЕ ПЕПТИДА НОВОГО СТРУКТУРНОГО КЛАССА ИЗ ЯДА МОРСКОЙ АНЕМОНЫ, МОДУЛИРУЮЩЕГО РАБОТУ КИСЛОТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИОННОГО КАНАЛА 1a ТИПА  
*Хасанов Т.А., Осмаков Д.И., Андреев Я.А., Козлов С.А.* ..... 36

## СЕКЦИЯ 2

### СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

- 2.1. ЭКСПРЕССИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫСОКОКОНСЕРВАТИВНОГО ГЕНА *Dras1*  
*Сиволюс Е.А., Зимарева Д.А., Белкина Е.Г., Лазебный О.Е., Куликов А.М.* ..... 37
- 2.2. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОВ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *BEAUVERIA BASSIANA*, ВЛИЯЮЩИХ НА ЕГО СПЕЦИФИЧНОСТЬ  
*Чемезова А.А., Майкова О.О.* ..... 38

## СЕКЦИЯ 3

### СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ, УГЛЕВОДОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

- 3.1. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СИНТЕЗУ ПРОИЗВОДНЫХ *L*-ТРИПТОФАНА ПО С2-АТОМУ ИНДОЛЬНОГО ЦИКЛА  
*Вавилов М.В., Петушков В.Н., Царькова А.С., Осипова З.М., Родионова Н.С.* ..... 39
- 3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАТЕРАЛЬНОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН ДОФХ/ДОФС ПО ДАННЫМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ  
*Веретенко И.И., Трофимов Ю.А., Ефремов Р.Г.* ..... 40
- 3.3. ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСПОРТА ГЛИКОЛИПИДОВ МЕЖДУ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ И БАКТЕРИЯМИ  
*Комарова В.А., Хайдуков С.В., Рыжов И.М., Попова И.С., Бовин Н.В., Рапопорт Е.М.* ..... 41
- 3.4. ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОФОБНЫХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ  
*Костюк К.А., Ефремов Р.Г.* ..... 42
- 3.5. СИНТЕЗ ГЛИКОКЛАСТЕРОВ, ВКЛЮЧАЮЩИХ НЕСКОЛЬКО ОСТАТКОВ ТЕТРАСАХАРИДА А (ТИП 2), И НЕОГЛИКОЛИПИДОВ НА ИХ ОСНОВЕ  
*Петракова Д.О., Рыжов И.М., Тузиков А.Б., Бовин Н.В.* ..... 43
- 3.6. СИНТЕЗ ГЕПТАСАХАРИДА А (ТИП 3) - СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА ПОДГРУППЫ КРОВИ  $A_1$   
*Савченко М.С., Рыжов И.М., Саблина М.А., Попова И.С., Тьртыш Т.В., Бовин Н.В.* ..... 45
- 3.7. СИНТЕЗ АНАЛОГОВ ЛЮЦИФЕРИНА ВЫСШИХ ГРИБОВ С УВЕЛИЧЕННОЙ СОПРЯЖЕННОЙ СИСТЕМОЙ И ДОНОРНЫМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ  
*Сильвестрова А.А., Андрианова А.А., Мышкина Н.М., Осипова З.М.* ..... 45

- 3.8. МИКРОВЕЗИКУЛЯРНЫЙ ТРАНСПОРТ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЛИКОЛИПИДОВ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ЛИПИДНЫМ ФРАГМЕНТОМ  
*Сливка Е.В., Образцова Е.А., Хайдуков С.В., Тузиков А.Б., Бовин Н.В., Рапопорт Е.М.* ..... 46
- 3.9. ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МЕМБРАНОТРОПНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ФЕНОЛОВ  
*Сохранева В.А., Юсупова Д.А., Грамматикова Н.Э., Дерябина Ю.И., Гроза Н.В.* ..... 47
- 3.10. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОНСТРУКТОВ biot-CMG(2)-Ad-DOPE И biot-CMG(2)-Av-Chole МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ С КОНТРАСТИРОВАНИЕМ  
*Шестопалова М.С., Залыгин А.В., Штыкова Э.В., Бовин Н.В., Олейников В.А.* ..... 48

#### СЕКЦИЯ 4

#### ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

- 4.1. ФЛУОРОГЕННЫЕ КРАСИТЕЛИ НА ОСНОВЕ КЕТОПРОИЗВОДНЫХ ХРОМОФОРА БЕЛКА GFP  
*Балеева Н.С., Баранов М.С.* ..... 49
- 4.2. УСТАНОВЛЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ РАВНОВЕСИЙ ЛИДОКАИНА ПРИ СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРАХ СОСТОЯНИЯ CO<sub>2</sub>  
*Белов К.В., Дышин А.А., Киселев М.Г., Крестьянинов М.А., Ходов И.А.* ..... 50
- 4.3. ХИМИЧЕСКОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ НОВОГО АЗОЛОАЗИНИЕВОВОГО КРАСИТЕЛЯ В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА  
*Бучельникова В.А., Шупова Е.В., Папонов Б.В., Бучельников А.С.* .. 51
- 4.4. ЗАВИСИМОСТЬ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA* ОТ ОЛИГОМЕРНОГО СОСТАВА  
*Ваничкин Д.А., Кудряшова Е.В.* ..... 52
- 4.5. ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПАВ С ДНК В РАСТВОРЕ  
*Габрусёнок П.В., Ролич В.И., Бакулев В.М., Касьяненко Н.А.* ..... 53
- 4.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИГАНД-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ GPCR РЕЦЕПТОРОВ МЕТОДОМ МИКРОМАСШТАБНОГО ТЕРМОФОРЕЗА  
*Дашевский Д.Е., Лугинина А.П., Хорн П.А., Шаульская В.С., Василенко Л.М., Мишин А.В.* ..... 54
- 4.7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО БИОСЕНСОРА ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НУРЕР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ТИОЛ-ВОСТАНАВЛИВАЮЩИХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СИСТЕМ В КЛЕТКАХ K562  
*Журавлев А.Д., Люблинская О.Г.* ..... 55
- 4.8. НОВЫЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КУМАРАНОНОВ  
*Зайцева Э.Р., Смирнов А.Ю.* ..... 57

4.9.	НОВЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ АНАЛОГИ ЦИТОКИНИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ <i>Зенченко А.А., Ословский В.Е., Дреничев М.С.</i> .....	57
4.10.	МИКРОМАСШТАБНЫЙ ТЕРМОФОРЕЗ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦИТОХРОМОВ P450 С АЗОЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ <i>Капранов И., Карпова М., Загрядская Ю., Охрименко И., Варакса Т., Гилеп А., Струшкевич Н., Борщевский В.</i> .....	58
4.11.	ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ АДЕНОЗИНА, СОДЕРЖАЩИХ $\alpha$ -ФЕНИЛЭТИЛЬНЫЙ ХИРАЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ <i>Козлова А.А., Дреничев М.С., Алексеев К.С.</i> .....	59
4.12.	СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ СОСТОЯНИЯ РЕЦЕПТОРА TrkA ЕГО ВНЕКЛЕТОЧНЫМ ПРИМЕМБРАННЫМ РЕГИОНОМ <i>Кот Э.Ф., Васильева Е.В., Шабалкина А.В., Гончарук С.А., Арсеньев А.С., Минеев К.С.</i> .....	60
4.13.	БЫСТРЫЙ SDS-PAGE <i>Кошкина М.К., Атрошенко Д.Л., Тишков В.И.</i> .....	61
4.14.	ДЕРЕПЛИКАЦИЯ СОЕДИНЕНИЙ-АНТИБИОТИКОВ В АКТИВНЫХ ЭКСТРАКТАХ ШТАММА <i>STREPTOMYCES SP.</i> VKM Ac-502 НА ОСНОВЕ ТЕСТИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА <i>Маренкова Е.А., Белозерова О.А., Стародумова И.П., Куджаев А.М., Гуля Е.Б.</i> .....	62
4.15.	КЛАССИФИКАЦИЯ ТОКСИНОВ ИЗ ЖИВОТНЫХ ЯДОВ ПОСРЕДСТВОМ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И МЕТОДА ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ <i>Можяева В.А., Кудрявцев Д.С., Прохоров К.А.</i> .....	63
4.16.	СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ АЛЬФА-СПИРАЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ В СМЕСЯХ ТРИФТОРЭТАНОЛА И ВОДЫ И ИХ РЕФОЛДИНГ В ЛИПИДНЫХ БИЦЕЛЛАХ <i>Мотов В.В., Кот Э.Ф., Шабалкина А.В., Гончарук С.А., Арсеньев А.С., Минеев К.С.</i> .....	64
4.17.	GFP ХРОМОФОР С ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ МЕТА-ДИМЕТИЛАМИННОЙ ГРУППОЙ КАК ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СЕНСОР ПРИСУТСТВИЯ ВОДЫ <i>Мяснянко И.Н., Соколов А.И., Баранов М.С.</i> .....	64
4.18.	ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ГЕНЕРИРОВАНИЯ РАДИКАЛОВ ПРИ УЧАСТИИ ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛИНА <i>Потапова Н.В., Касаикина О.Т.</i> .....	66

## СЕКЦИЯ 5

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЗНАВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛ И ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В КЛЕТКЕ

- 5.1. РЕЦЕПТОРЫ СМЕРТИ DR4 И DR5 ПОДВЕРГАЮТСЯ СПОНТАННОЙ И ЛИГАНД ЗАВИСИМОЙ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ НЕЗАВИСИМО ОТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ЦИТОКИНУ TRAIL  
*Артыков А.А., Яголович А.В., Долгих Д.А., Гаспарян М.Э.* ..... 67
- 5.2. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА (IR) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУТАНТНЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА  
*Гавриленкова А.А., Деев И.Е., Ганцова Е.А., [Петренко А.Г.], Бочаров Э.В., Серова О.В.* ..... 68
- 5.3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ УЗНАВАНИЯ НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА SARS-CoV-2 БЕЛКАМИ 14-3-3 ЧЕЛОВЕКА  
*Сысоев А.А., Тугаева К.В., Хокинс Д.Э., Смит Дж.Л., Бэйфилд О.В., Кер Д.С., Клычников О.И., Антсон А.А., Случанко Н.Н.* ..... 69

## СЕКЦИЯ 6

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА

- 6.1. ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ АДАПТИВНЫХ НК-КЛЕТОК CD57-  
*Алексеева Н.А., Паламарчук А.И., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И.* ..... 70
- 6.2. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВЫРАЩИВАНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НА МОДЕЛИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ  
*Булахов А.Г., Брюшкова А.А., Чудаков Д.М.* ..... 71
- 6.3. РЕАКЦИИ ЯДЕР БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА НА ВВЕДЕНИЕ АНТИГЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ  
*Дятлова А.С., Нестерко Е.Э.* ..... 72
- 6.4. ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ, ИНДУЦИРУЕМОГО У МЫШЕЙ  
*Мурова Д.Е., Сервули Е.А., Болховитина Е.Л., Федорина А.С., Сапожников А.М., Шевченко М.А.* ..... 73
- 6.5. ПОИСК ПОДХОДА К ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА БТШ70-  
БАРСТАР В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ  
*Овсяникова О.В., Алексеева Л.Г., Шульга А.А., Деев С.М., Сапожников А.М.* ..... 74
- 6.6. ПЕРЕКЛОНИРОВАНИЕ ПЛАЗМИДЫ pMSCV-F-del Casp9.IRES.GFP В pMSCV-F-del Casp9.IRES.BFP С ЦЕЛЬЮ ПРОВЕДЕНИЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ТРАНСДУКЦИИ ДВУХ ГЕНОВ В НК-КЛЕТКИ  
*Паламарчук А.И., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И.* ..... 75
- 6.7. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО ГЕМИНОМ ПВОРОТОЧНОГО СЫВОРОТОЧНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ФАГОЦИТОЗ НЕЙТРОФИЛОВ  
*Раззоренова Е.А., Горшкова Е.Н., Василенко Е.А., Василев Ч.Л.* ... 76

- 6.8. ВЛИЯНИЕ pH-МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКОГО СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А ЧЕЛОВЕКА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ  
*Чурина Т.С., Горшкова Е.Н., Василенко Е.А., Василев Ч.Л.* ..... 77

## СЕКЦИЯ 7

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

- 7.1. АКТИВАЦИЯ Nrf2-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ НИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С N-ЭТИЛТИОМОЧЕВИНОЙ  
*Амозова В.И., Ступина Т.С., Терентьев А.А., Санина Н.А., Балакина А.А.* ..... 78
- 7.2. ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФАКТОРОВ, ОПОСРЕДУЮЩИХ АНТИФИБРОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
*Бутузова Д.А., Кулебякина М.А., Басалова Н.А., Клычников О.И., Арбатский М.С., Ефименко А.Ю.* ..... 79
- 7.3. ПРОДУКЦИЯ СУЛЬФИДА ВОДОРОДА ПРИ ГОЛОДАНИИ ПО ИСТОЧНИКУ УГЛЕРОДА И ЭНЕРГИИ У БАКТЕРИЙ  
*Габова А.О., Тюленев А.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.* ..... 80
- 7.4. ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ МИШЕНЕЙ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В КОНТРОЛЬ КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОГО БАЛАНСА В ПОЧКЕ МЫШИ, С ПРИМЕНЕНИЕМ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА  
*Ганцова Е.А., Серова О.В., Деев И.Е., [Петренко А.Г.]* ..... 80
- 7.5. ПОИСК МУТАЦИЙ В ГЕНЕ БЕЛКА Kaiso, ВЛИЯЮЩИХ НА ТУМОРОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК  
*Демкина А.О., Каплун Д.С., Мазур А.М., Филонова Г.Е., Женило С.В.* ..... 82
- 7.6. ИЗМЕРЕНИЕ ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ Hoxa10 И Hoxa11 В МАТКЕ МЫШИ ПОСЛЕ РОДОВ  
*Зенов М.А., Смирнова А.С., Попов В.С., Макаревич П.И., Кулебякина М.А.* ..... 83
- 7.7. РОЛЬ БЕЛКОВ Treacle И TORVPR1 В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ рДНК ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ  
*Минина Е.П., Величко А.К., Разин С.В., Кантидзе О.Л.* ..... 84
- 7.8. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА Tet НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ Hoxa10 И Hoxa11 В СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА И В МАТКЕ МЫШИ  
*Смирнова А.С., Кулебякина М.А., Еремичев Р.Ю., Александрюшкина Н.А., Попов В.С., Макаревич П.И.* ..... 85
- 7.9. ЭРИТРОЦИТАРНАЯ МОДЕЛЬ ПЕРОКСИДНОГО ГЕМОЛИЗА: ВЫБОР ИНИЦИАТОРА  
*Соколова Е.М., Дубенская Н.А., Психа Б.Л., Нешев Н.И.* ..... 87

- 7.10. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ И ОСТЕОКОММИТИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ 7-СУТОЧНОМ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ  
*Тырина (Голикова) Е.А., Бобылёва П.И.* ..... 87
- 7.11. ВОДОРАСТВОРИМЫЙ АНАЛОГ БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА ws-Lynx1 ПОДАВЛЯЕТ РОСТ И МИГРАЦИЮ ПЕРВИЧНЫХ ЛИНИЙ ГЛИОБЛАСТОМ  
*Шлепова О.В., Бычков М.Л., Шуленко М.А., Павлюков М.С., Люкманова Е.Н.* ..... 88

## СЕКЦИЯ 8

### ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

- 8.1. МАСШТАБИРОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ALOX15 В КЛЕТКАХ *E. COLI*  
*Аксенов В.В., Шошина Н.С., Кацар М.С., Голованов А.Б., Журавлев А.М., Иванов И.В.* ..... 89
- 8.2. СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ БЕНЗИМИДАЗОЛА  
*Алексахина И.А.* ..... 91
- 8.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА И ЗОЛОТА  
*Барышев А.В., Касьяненко Н.А.* ..... 91
- 8.4. ОТРАБОТКА ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНОГО СПОСОБА СИНТЕЗА НОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЁННОГО АЛЛОПУРИНОЛА  
*Башорин А.Р., Есипов Р.С., Константинова И.Д., Фатеев И.В.* .... 92
- 8.5. ДЕТЕКЦИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА *M. TUBERCULOSIS* С ПОМОЩЬЮ БИНАРНЫХ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ ЗОНДОВ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ  
*Березовская М.Ю., Горбенко Д.А., Рубель М.С., Колпацников Д.М.* 93
- 8.6. ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК СЕЛЕЗЁНКИ СВИНЬИ КАК МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ  
*Будагова Т.Ю., Колбин И.С., Кузнецова Е.Г., Власова Н.Н., Земскова М.Ю.* ..... 94
- 8.7. СОЗДАНИЕ СПЕЦИФИЧНЫХ К ОБЩЕМУ ЛЕЙКОЦИТАРНОМУ АНТИГЕНУ CAR-T КЛЕТОК ДЛЯ МИЕЛО- И ИММУНОАБЛЯЦИИ  
*Волков Д.В., Украинская В.М., Масчан М.А., Степанов А.В.* ..... 95
- 8.8. АНАЛИЗ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ДИГИДРОФАЛАТРЕДУКТАЗЫ ДЛЯ ЛИНИЙ КЛЕТОК СНО С ГЕНОТИПОМ *dhfr*<sup>+/-</sup> u *dhfr*<sup>-/-</sup>, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/Cas9  
*Гаямова Е.А., Даянова Л.К., Ковнир С.В., Воробьёв И.И., Орлова Н.А.* ..... 96

- 8.9. ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН КАК КОМПОНЕНТ "БЕЛКОВОЙ КОРОНЫ" НАНОЧАСТИЦ И ЕГО ДЕТЕКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ  
*Горобец М.Г., Мурадова А.Г., Шарпаев А.И., Бычкова А.В. .... 97*
- 8.10. ГАЛОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ РОДОВ *HALOMONAS* И *MARINOBACTER* ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ РОССИИ И КАЗАХСТАНА И ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ  
*Ершов А.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Турова Т.П., Груздев Д.С., Назина Т.Н. .... 98*
- 8.11. ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОЦЕССА АНАЭРОБНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ НАВОЗНОГО СТОКА СВИНОКОМПЛЕКСА  
*Журавлева Е.А., Шехурдина С.В., Литти Ю.В. .... 99*
- 8.12. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НУКЛЕОЗИДОВ 2-АМИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА  
*Зорина Е.А. .... 101*
- 8.13. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДА 3-ГИДРОКСИ-6-ФТОРПИРАЗИН-2-КАРБОКСАМИДА  
*Иванов Д.К., Костромина М.А., Есипов Р.С., Константинова И.Д., Фатеев И.В. .... 101*
- 8.14. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ НАНОЧАСТИЦ В КРОВОТОКЕ  
*Иванов И.Н., Синицына А.П., Зелепукин И.В., Деев С.М. .... 102*
- 8.15. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЭКСПРЕССИИ И ОЧИСТКИ ГИБРИДНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО БИСПЕЦИФИЧНОГО БЕЛКА DR5-V-IRGD  
*Исакова А.А., Воронцова Е.В., Курбанова Л.А., Марквичева Е.А., Артыков А.А., Яголович А.В., Гаспарян М.Э. .... 103*
- 8.16. БЕЛКОВЫЙ ИНТЕРФЕЙС БАРНАЗА\*БАРСТАР ЯВЛЯЕТСЯ ЭФФЕКТИВНЫМ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕМ АКТИВНОСТИ CAR-T КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ *IN VIVO*  
*Калинин Р.С., Шипунова В.О., Черников И.В., Зенкова М.А., Шульга А.А., Деев С.М., Рубцов Ю.П., Степанов А.В., Габитов А.Г. .... 104*
- 8.17. ПОЛИМЕРНЫЕ АДРЕСНЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ФОТОТЕРМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ  
*Коваленко В.Л., Согомонян А.С., Шилова О.Н., Шипунова В.О. . 105*
- 8.18. ВЛИЯНИЕ ДВУХ ТИПОВ СУБСТРАТОВ НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДРОЖЖЕЙ *ENDOMYCES MAGNUSII*  
*Кокорева А.С., Гесслер Н.Н., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И. .... 106*

- 8.19. СУРРОГАТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУС-НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ SARS-CoV-2 ПРИ ПОМОЩИ КОНЪЮГАТА АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА 2 С ПЕРОКСИДАЗОЙ ХРЕНА И ИНТАКТНОГО РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ШИПОВИДНОГО БЕЛКА  
*Колесов Д.Э., Синегубова М.В., Даянова Л.К., Орлова Н.А., Воробьев И.И.* ..... 107
- 8.20. ДВУХСТАДИЙНАЯ ДОСТАВКА ПОЛИМЕРНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ПАРЫ БАРНАЗА\*БАРСТАР ДЛЯ АДРЕСНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ РЕЦЕПТОРА HER2  
*Комедчикова Е.Н., Шипунова В.О., Котельникова П.А., Согомонян А.С., Деев С.М.* ..... 108
- 8.21. ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОЛИЗА ГАЛАКТАНА И АРАБИНАНА В ПРИСУТСТВИИ ГОМОГЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ  
*Курьшикина М.С., Семёнова М.В.* ..... 109
- 8.22. ВЛИЯНИЕ ПОЛИКАТИОННОГО ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТА ПДАДМАХ НА СОСТОЯНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПЛЕНКАХ СЕРЕБРА  
*Матусевич О.А., Коктыш И.В., Мельникова Я.И., Пицко (Калугина) Т.С., Маскевич С.А.* ..... 110
- 8.23. ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ С/Н В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА АВТОАГРЕГАЦИЮ ФАКУЛЬТАТИВНОГО МЕТИЛОТРОФА *METHYLORUBRUM EXTORQUENS*  
*Митина Е.Р., Алексахина В.В., Пшеничникова А.Б.* ..... 111
- 8.24. ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АННЕКСИНА V, МЕЧЕННОГО FITC, ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТ  
*Новикова Н.И., Майоров С.Г., Земскова М.Ю., Грановский И.Э.* ... 112
- 8.25. НОВЫЕ ЗАЩИТНЫЕ ГРУППЫ ДЛЯ СИНТЕЗА 5'-ТИОЛ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ  
*Орешков С.Д., Брылёв В.А., Коршун В.А., Устинов А.В.* ..... 113
- 8.26. ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ ШТАММА *STREPTOMYCES TSUKUBAENSIS* FRC 53-16 - ПРОДУЦЕНТА ТАКРОЛИМУСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ И ОПТИМИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ  
*Петрова К.С., Глаголева Е.В., Джавахия В.В., Кучугурин В.А.* .... 114
- 8.27. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИ-L-ЛИЗИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КОНЪЮГАТОВ IgG-FITC, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОПЛЕНОК СЕРЕБРА  
*Пицко (Калугина) Т.С., Мельникова Я.И., Коктыш И.В., Матусевич О.А., Маскевич С.А.* ..... 115
- 8.28. СКРИНИНГ МАТЕРИАЛОВ-НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ АНАММОКС-ПРОЦЕССА *IN SITU*  
*Попова Н.М., Чеглакова В.Н., Вишнякова А.В., Литти Ю.В., Сафонов А.В.* ..... 116

- 8.29. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА ПЫЛЬЦЕВОГО АЛЛЕРГЕНА ОЛЬХИ *Aln g 1* И ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ СВЯЗЫВАТЬ ЛИПИДНЫЕ ЛИГАНДЫ  
*Потапов А.Е., Богданов И.В., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В.* 117
- 8.30. БАЛАНСИРОВКА ОТНОСИТЕЛЬНОГО УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ЦЕПЕЙ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГОНАДОТРОПИНОВ  
*Синегубова М.В., Орлова Н.А., Кочина Я.А., Воробьёв И.И.* ..... 118
- 8.31. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ ДЛЯ ДОСТАВКИ НАНОЧАСТИЦ  
*Синицына А.П., Иванов И.Н., Зелепукин И.В., Шипунова В.О., Деев С.М.* ..... 119
- 8.32. ПРИМЕНЕНИЕ 3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ ДЛЯ *IN VITRO* ЭКСПЕРИМЕНТОВ  
*Согомонян А.С., Шипунова В.О., Деев С.М.* ..... 120
- 8.33. НОВЫЕ БАКТЕРИОФАГИ СЕМЕЙСТВА *AUTOGRAPHIVIRIDAE*, ИНФИЦИРУЮЩИЕ *ACINETOBACTER BAUMANNII*  
*Тимошина О.Ю., Шнейдер М.М., Евсеев П.В., Михайлова Ю.В., Касимова А.А., Книрель Ю.А., Попова А.В., Мирошников К.А.* ... 121
- 8.34. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ДЕФЕНСИНОВ ГОРОХА И АРАХИСА  
*Фатеева С.И., Финкина Е.И., Канушкина М.Д., Овчинникова Т.В.* 122
- 8.35. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НОВЫХ ИЗОСТЕРИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ РИБАВИРИНА  
*Фролова В.Д., Чудинов М.В., Константинова И.Д., Фатеев И.В.* 123

## СЕКЦИЯ 9

### БИОМЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- 9.1. ПОЛЯРИЗОВАННЫЕ МАКРОФАГИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ АНТИ-ЭНДОМЕТРИОЗНЫЙ АГЕНТ  
*Артемова Д.А., Вишнякова П.А.* ..... 124
- 9.2. ИЗУЧЕНИЕ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА И ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ В МОДЕЛИ *IN VITRO*  
*Бирюкова В.Н., Дроздова М.Г., Толстова Т.В., Черногорцева М.В., Демина Т.С., Сажнев Н.А., Кильдеева Н.Р., Марквичева Е.А.* ..... 125
- 9.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕТРАМЕРНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ АВИДНОСТИ ТАРГЕТНЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ  
*Бутылин А.А., Фролова А.Ю., Мартынов В.И., Пахомов А.А.* .... 126
- 9.4. ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ ХИТОЗАНА В КОМПЛЕКСНОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ РАН  
*Ванюшенкова А.А., Белов А.А.* ..... 127

- 9.5. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ  $\text{Nf1}$  В МОДЕЛИ  
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО ТЯЖЕЛОЙ  
ГИПОКСИЕЙ, ПРЕДОТВРАЩАЕТ СУПРЕССИЮ  
ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ И АПОПТОЗ НЕЙРОНОВ В  
ГИППОКАМПЕ КРЫС  
*Ветровой О.В.* ..... 128
- 9.6. ИЗУЧЕНИЕ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТИ, СВЯЗАННОЙ С  
СИНДРОМОМ КОФФИНА-СИРИСА, В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ  
*DROSOPHILA MELANOGASTER*  
*Григорьев Я.А., Бусыгин С.А., Деев Р.В., Лебедева Л.А.,*  
*Шидловский Ю.В.* ..... 129
- 9.7. ТЕСТИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА ИНКАПСУЛЯЦИИ ОСТРОВКОВ  
ЛАНГЕРГАНСА В АЛЬГИНАТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ  
*Ермакова П.С., Леньшина Н.А., Конев А.Н., Батенькин М.А.,*  
*Чесноков С.А., Загайнов В.Е., Загайнова Е.В., Кашина А.В.* ..... 130
- 9.8. ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫХ ИНСУЛИНА И  
ГАНГЛИОЗИДОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА В  
ПЕЧЕНИ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-ГО  
ТИПА  
*Ильсов И.О.* ..... 131
- 9.9. ОЦЕНКА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ПАРАМЕТРОВ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ  
ТЕСТОВ У МОЛОДЫХ САМОК И САМЦОВ МЫШЕЙ СВРВ  
*Калинин М.А., Аронов Д.А., Моисеева Е.В.* ..... 132
- 9.10. ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ С  
ЛЕКАРСТВАМИ ММАЕ И ММАФ И ОЦЕНКА ИХ  
ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ПАНЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ  
ЛИНИЙ С РАЗЛИЧНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГАНГЛИОЗИДА GD2  
*Калиновский Д.В., Холоденко И.В., Гречихина М.В., Доронин И.И.,*  
*Деев С.М., Холоденко Р.В.* ..... 133
- 9.11. РАЗРАБОТКА МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ТАРГЕТНЫХ АГЕНТОВ  
НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА  
*Котельникова П.А., Шипунова В.О., Деев С.М.* ..... 134
- 9.12. СФЕРОИДЫ КАК 3D *IN VITRO* МОДЕЛИ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ  
*Кудан С.П., Кудан Е.В.* ..... 135
- 9.13. ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ЭКЗОГЕННОГО  
ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 ПРИ ОСТРОМ ПОРАЖЕНИИ ПОЧКИ  
*Курганова Э.А., Гордеева А.Е., Новосёлов В.И.* ..... 136
- 9.14. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ, pH И ЛИПИДНЫХ ЛИГАНДОВ НА  
СВОЙСТВА РАСТИТЕЛЬНЫХ АЛЛЕРГЕНОВ  
*Ларионова В.А., Финкина Е.И., Игнатова А.А., Овчинникова Т.В.* . 137
- 9.15. СОЗДАНИЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ФЕРРИТИНА И  $\text{DAR}^{\text{pin}}_9$   
ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ К РАКОВЫМ  
КЛЕТКАМ  
*Мамаева А.А., Фролова А.Ю., Какуев Д.Л., Мартынов В.И.,*  
*Пахомов А.А.* ..... 138

- 9.16. КОМПОЗИТНЫЕ МАТРИКСЫ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ ХИТОЗАНА С ОЛИГОЛАКТИДАМИ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ  
*Мамедова А.Р., Толстова Т.В., Дроздова М.Г., Демина Т.С., Попырина Т.Н., Марквичева Е.А.*..... 139
- 9.17. СОЕДИНЕНИЯ ВОДИРҮ С ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ  
*Мариевская К.А., Красильников М.С., Чистов А.А., Кориун В.А., Устинов А.В.* ..... 141
- 9.18. НАРУШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ЛИМФОЦИТАХ И ЛИПОПЕРОКСИДАЦИЯ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРКИНСОНИЗМЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ 6-ГИДРОКСИДОФАМИНОМ У КРЫС  
*Медведева В.П., Мосенцов А.А., Миронова Г.Д., Хмель Н.В., Хундерякова Н.В.* ..... 141
- 9.19. БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЛИНКЕРЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИЛАМИНА ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ КАРБОНИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
*Мелешкина Е.Г., Кориун В.А., Сапожникова К.А.* ..... 143
- 9.20. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ИОНОВ Ca<sup>2+</sup> НА Sr<sup>2+</sup> НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ СОВМЕСТИМОСТЬ ОКТАКАЛЬЦИЙ ФОСФАТА *IN VITRO*  
*Менухов В.О., Минайчев В.В., Фадеева И.С., Смирнов И.В., Тетерина А.Ю., Фадеев Р.С., Михеева П.В., Кобякова М.И., Звягина А.И., Акатов В.С.* ..... 144
- 9.21. БЛОКАДА СИСТЕМЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ НАНОЧАСТИЦАМИ ФЕРРИГИДРИТА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ДОСТАВКИ НАНОАГЕНТОВ В ОПУХОЛЬ  
*Миркасымов А.Б., Зелепукин И.В., Иванов И.Н., Джалилова Д.Ш., Деев С.М.* ..... 145
- 9.22. ВЛИЯНИЕ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И РАЗМЕРЫ МОЛЕКУЛ КОЛЛАГЕНАЗЫ ИЗ *CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM*  
*Панкова С.М., Сакибаев Ф.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.* ..... 146
- 9.23. ПОЛУЧЕНИЕ 3D МОДЕЛИ КОЖИ ПУТЕМ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ И КЕРАТИНОЦИТОВ  
*Полянская А.Ю., Павлова Е.Р., Бояринцев В.В., Трофименко А.В., Фильков Г.И., Багров Д.В., Клинов Д.В., Дурьманов М.О.* ..... 147
- 9.24. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАТУСА МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ ПО ДАННЫМ RNASEQ  
*Рабушко Е.Н., Никитин Д.М., Сунцова М.В., Сорокин М.И., Буздин А.А.* ..... 148
- 9.25. СОЗДАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛИ  
*Садыкова Э.З., Бычкова А.В., Горобец М.Г., Якунина М.Н., Хачатрян Д.С.* ..... 149

- 9.26. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ СТАРЕНИИ ЭРИТРОЦИТОВ  
*Слатинская О.В., Максимов Г.В.* ..... 150
- 9.27. НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИФЕРУЛОВЫХ И ПОЛИГЕНТИЗИНОВЫХ КИСЛОТ КАК НОВЫЕ НОСИТЕЛИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ  
*Смирнов И.В., Лисов А.В., Звонарев А.Н., Сузина Н.Е., Казаков А.С., Марквичева Е.А., Земскова М.Ю.* ..... 151
- 9.28. МУТАНТНЫЕ ФОРМЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ГИРУДИНА С УЛУЧШЕННОЙ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ  
*Софронова А.А., Семенов П.И.* ..... 152
- 9.29. АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИЕЙ ИЗМЕНЕНИЯ В ГЛУТАМАГНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ВЕНТРАЛЬНОЙ ТЕГМЕНТАРНОЙ ОБЛАСТИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РАЗВИТИЕ НИКОТИНОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ У КРЫС  
*Стратилов В.А., Ветровой О.В.* ..... 153
- 9.30. ИЗУЧЕНИЕ И СРАВНЕНИЕ pH-ЗАВИСИМЫХ СВОЙСТВ ХИМЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА EGFR И ПЕПТИДОВ pHIP  
*Сунгурова А.С., Фролова А.Ю., Пахомов А.А., Мартынов В.И.* .. 154
- 9.31. СИНТЕЗ КАТИОННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОРФИРИНОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ  
*Усанёв А.Ю., Савельева И.О., Жданова К.А., Брагина Н.А.* ..... 155
- 9.32. ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ДВУХСЛОЙНЫХ ТКАНЕВЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ  
*Фетисова В.Э., Тетерина А.Ю., Соловьёва Е.В., Комлев В.С.* ..... 156
- 9.33. ПОЛУЧЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ ГИБРИДНОЙ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА mCherry И pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ПЕПТИДА АТРАМ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ РАКА  
*Фролова А.Ю., Сунгурова А.С., Пахомов А.А., Мартынов В.И.* .. 157
- 9.34. РАЗНОНАПРАВЛЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ALOX15 ЭФФЕКТОРНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ НА ОСНОВЕ СОЕДИНЕНИЙ ИНДОЛА И ИМИДАЗОЛА  
*Шафиуллина Р.Р., Голованов А.Б., Журавлёв А.М., Иванов И.В.* .. 158
- 9.35. ТАРГЕТНАЯ ДОСТАВКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКТОВ В ГЕПАТОЦИТЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ИНДУЦИРОВАННОГО ОНКОГЕНЕЗА В ПЕЧЕНИ  
*Шаховцев Д.А., Мальцев Д.И., Кельмансон И.В., Мощенко А.А., Абакумова Т.О., Ветошева П.И., Левкина А.А., Сысоева В.А., Зацепин Т.С., Шохина А.Г., Белоусов В.В., Конрад М.* ..... 159
- 9.36. ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО АЛКАЛОЗА НА НЕЙРОЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ИОНОВ ЦИНКА  
*Шеденкова М.О., Стельмашук Е.В., Гольшиев С.А., Исаев Н.К.* .. 160

9.37.	ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧНЫЕ НАНОСТЕРЖНИ ДЛЯ ФОТОТЕРМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ <i>IN VIVO</i> <u>Шилова М.В., Прошкина Г.М., Шрамова Е.И., Котляр А.Б., Деев С.М.</u> .....	161
9.38.	ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ СКРИНИНГ МИШЕНЕЙ И ДИЗАЙН ПРАЙМЕРОВ ПРИ СОЗДАНИИ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА <u>Ширишиков Ф.В., Беспятовых Ю.А.</u> .....	162
9.39.	РАЗРАБОТКА БИОСОВМЕСТИМЫХ ДЕГРАДИРУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ В СИСТЕМЕ БИОПОЛИМЕРЫ-ФОСФАТЫ КАЛЬЦИЯ <u>Шлыков М.А., Тетерина А.Ю., Егоров А.А., Комлев В.С.</u> .....	163
9.40.	СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПЕРЕВЯЗОЧНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ РАН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТЕАЗ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА <u>Шкодзько М.И., Ванюшенкова А.А., Побережный Д.Ю., Каленов С.В., Белов А.А.</u> .....	164
9.41.	ИЗУЧЕНИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У КЛЕТОК МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА К ДЕЙСТВИЮ TRAIL- ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА В ВЫСОКОПЛОТНЫХ КУЛЬТУРАХ <u>Штатнова Д.Ю., Кобякова М.И., Ломовская Я.В., Ломовский А.И., Фадеев Р.С.</u> .....	165
9.42.	ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ АНАЛОГОВ НУКЛЕОЗИДОВ К РНК-СОДЕРЖАЩИМ ВИРУСАМ <u>Яковчук Е.В., Шустова Е.Ю., Матюгина Е.С., Хандажинская А.Л., Колпакова Е.С., Козловская Л.И.</u> .....	166
	АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ .....	167