

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

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

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

27 февраля – 4 марта 2023 г.

**Тезисы докладов
Молодежной конференции**

В данном выпуске представлены тезисы докладов Молодежной конференции XXII Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии.

Организатор: НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ

При поддержке: ООО «НПФ Синтол» ООО «Компания Хеликон»
ООО «Диаэм» ООО «МИЛЛАБ Система»
ООО «БИОГЕН-АНАЛИТИКА»

Научный руководитель школы *Ковальчук М. В.*

Программный комитет:

Председатели:

Коневега А. Л., к. ф-м. н.

Яцишина Е. Б., д. и. н.

Организационный комитет:

Председатель *Коневега А. Л.*

Заместитель председателя *Полесскова Е. В.*

Секретарь *Орлова Е. А.*

Кульминская А. А., к. б. н.

Лебедев Д. В., к. ф-м. н.

Патрушев М. В., к. б. н.

Полесскова Е. В., к. б. н.

Пчелина С. Н., д. б. н.

Саранцева С. В., д. б. н.

Сергунова К. А., к. тех. н.

Трашков А. П., к. мед. н.

Шабалин К. А., к. ф.-м. н.

Штам Т. А., к. б. н.

Яненко А. С., д. б. н.

Гулина Л. С.

Емельянов А. К.

Кульминская А. А.

Лапина И. М.

Марченко Я. Ю.

Рябова Е. В.

Потапова Т. А.

Тяпина Н. В.

Штам Т. А.

Сборник подготовили: *Каюмов М. Ю., Коневега А. Л., Лапина И. М., Полесскова Е. В.*

Публикуется в авторской редакции.

XXII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии: тезисы докладов Молодежной конференции, Санкт-Петербург, пос. Репино, 27 февраля – 4 марта 2023 г. – Гатчина: Изд-во НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, 2023. – 222 с. – URL: <https://bioschool.pnpi.nrcki.ru>. – Текст: электронный.

ISBN 978-5-86763-477-3

© НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, 2023

Дорогие коллеги!

Организационный комитет рад приветствовать участников и гостей XXII Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, которая проходит в пригороде Санкт-Петербурга на побережье Финского залива с 27 февраля по 4 марта 2023 года.

За полувековую историю Зимних школ ПИЯФ сложилась добрая традиция проведения научной недели вдали от городской суеты, в курортном районе, что позволяет объединить плодотворную работу с интересной культурной программой и неформальным общением. Неповторимую атмосферу Школы, способствующую творческому вдохновению и началу новой дружбы и новых проектов, создают неизменно высокий уровень лекций и заинтересованные слушатели: студенты старших курсов, аспиранты, а также их преподаватели, научные руководители и научные сотрудники российских и зарубежных академических учреждений.

Особое внимание на Школе по биофизике и молекулярной биологии уделяется молодому поколению ученых. Оргкомитет предоставил студентам и аспирантам российских вузов определенные финансовые привилегии, и нам приятно видеть среди участников Школы много молодых лиц.

Научную программу Школы составляют доклады приглашенных лекторов, круглые столы и Молодежная конференция, включающая в себя устные доклады и две стендовые сессии.

Мы верим, что каждый из участников и гостей Школы увезет с собой не только новые знания, но и творческое воодушевление, что всем нам удастся выполнить намеченную научную программу, инициировать новые проекты и найти интересные научные контакты.

**Тезисы докладов
Молодежной конференции**

Потенциальная онкогенность четырех новых мутаций с хромосомными перестройками

Айсин К. Н.¹, Марьясина С. С.¹, Загребин Ф. А.², Сергеев П. В.¹

¹ *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
им. Н. Н. Петрова, Санкт-Петербург, Россия*

По данным ВОЗ, рак легких, бронхов и трахеи входит в десятку наиболее частых причин смерти. С 2000 по 2019 г. количество смертей, связанных с этими формами рака, существенно возросло [1]. Данная тенденция особенно характерна для стран с высоким уровнем дохода, превосходящих страны с низким доходом по продолжительности жизни. Как известно, обнаружение онкологического заболевания на ранних стадиях повышает шансы на излечение. Для своевременной диагностики ЗНО и подбора оптимального курса лечения необходимо определять, какие мутации послужили драйвером злокачественного перерождения клеток.

Одним из распространенных типов генетических мутаций являются хромосомные перестройки, приводящие к возникновению гибридных генов и, следовательно, гибридных белков. Хрестоматийным примером такой перестройки является т. н. филадельфийская хромосома [2], в 95 % случаев приводящая к развитию хронического миелоидного лейкоза [3]. При этой мутации нестабильный участок 22-й хромосомы сливается с концом 9-й хромосомы в локусе гена *ABL1*, образуя гибридный ген *BCR-ABL1*. Продукт этого гена является конститутивно активной тирозинкиназой. Ее действие придает клетке способность делиться в отсутствие факторов роста, что приводит к избыточной пролиферации [4]. Другой пример – образование гибридного гена *CLIP1-LTK* в результате слияния хромосом 12 и 15. Продукт трансляции этого гена является онкобелком, вызывающим немелкоклеточный рак легкого [5].

Настоящая работа посвящена изучению потенциальной онкогенности четырех хромосомных перестроек, в результате которых образуются гибридные гены *BCR-PKHD*, *CLTC-RPS6*, *CDC-ATG* и *MAPRE1-DGKB*. Эти перестройки обнаружены в ходе полнотранскриптомного секвенирования тканевых эксплантов карциномы легкого, отрицательных по всем известным драйверным мутациям. В рамках настоящей работы на уровне клеточных линий проводится проверка способности указанных мутаций вызывать малигнизацию.

Работа выполняется при финансовой поддержке РНФ (грант 17-75-30027).

1. The top 10 causes of death [сайт]. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (дата обращения 12.01.2023).

2. Майборода А. А. Молекулярно-генетические основы онкогенеза // Сибирский медицинский журнал. 2013. Т. 116. № 1. С. 134–138.
3. Druker B.J. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML // *Oncogene*. 2002. V. 21. No. 56. P. 8541–8546.
4. Klein F., Feldhahn N., Müschen M. Interference of BCR–ABL1 kinase activity with antigen receptor signaling in B cell precursor leukemia cells // *Cell Cycle*. 2004. V. 3. No. 7. P. 856–858.
5. Izumi H. et al. The CLIP1–LTK fusion is an oncogenic driver in non-small-cell lung cancer // *Nature*. 2021. V. 600. No. 7888. P. 319–323.

Изучение роли белка Dora в регуляции экспрессии микроРНК в культуре клеток *Drosophila*

Акуленко Н. В.¹, Михалева Е. А.¹, Марфина С. В.^{1,2},
Корняков Д. А.², Рязанский С. С.¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва,
Россия

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

sonyamarfina@gmail.com

МикроРНК (миРНК) — это консервативные короткие некодирующие РНК многоклеточных эукариот, которые в составе рибонуклеопротеинового комплекса с белком Argonaute (Ago) связываются с комплементарными участками в мРНК-мишенях, что приводит к ингибированию их трансляции. Благодаря способности регулировать экспрессию белоккодирующих генов, миРНК вовлечены в регуляцию множества биологических процессов. Исследование механизмов регуляции экспрессии миРНК представляет не только фундаментальный интерес, но и необходимо для понимания причин развития болезней человека.

Недавно описан механизм регуляции экспрессии миРНК, названный TDMD (target-directed miRNA degradation), при котором формирование дуплекса особой структуры миРНК:мишень вызывает деградацию не мишени, а самой миРНК. При TDMD комплекс Ago с дуплексом миРНК:мишень распознается мультибелковым убиквитин-лигазным комплексом CRL, который убиквитинирует Ago, что вызывает его протеосомную деградацию, а высвободившаяся миРНК разрушается в цитоплазме [1–3]. Несмотря на консервативность и очевидную сейчас важность TDMD в регуляции миРНК, его биологические функции исследованы недостаточно.

В нашей работе мы изучаем механизм TDMD и его возможные функции в культуре клеток OSC модельного объекта *Drosophila melanogaster*. В основе нашего подхода по изучению TDMD у дрозофилы лежит выявление особенностей функционирования белка Dora, рецептора комплекса dAgo1:миРНК:РНК-мишень, который привлекает к нему CRL. С помощью методов геномного редактирования CRISPR-Cas9, иммуноокрашивания, высокопроизводительного секвенирования миРНК и мРНК, масс-спектрометрии и других мы изучили внутриклеточную локализацию Dora, его возможные белки-партнеры, набор регулируемых миРНК, а также влияние Dora на функционирование Ago1. Полученные данные позволяют нам в дальнейшем изучать биологические функции TDMD у *Drosophila*.

Работа проведена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00519).

1. Shi J. et al. // Science. 370, 6523 (2020).
2. Han C.Y. et al. // Science. 370, 6523 (2020).
3. Sheu-Gruttadauria J. et al. // Molecular Cell. 75, 6 (2019).

Роль гистондеацетилазного комплекса Rpd3 в мутационном процессе у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Алексеева Е. А.^{1,2}, Скобелева И. И.¹, Бахланова И. В.¹, Евстюхина Т. А.^{1,2},
Пешехонов В. Т.^{1,2}, Королев В. Г.^{1,2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия

alekseeva_ea@pnci.nrcki.ru

В клетках эукариот геномная ДНК находится в ядре в виде нуклеопротеинового комплекса «ДНК – белок», называемого хроматином [1, 2]. Основной единицей хроматина является нуклеосома, которая образуется в результате наматывания 147 п. о. ДНК вокруг октамера гистонов, состоящего из гетеротетрамера гистонов H3/H4 и двух димеров гистонов: H2A и H2B [3, 4].

Структура хроматина может препятствовать таким процессам, как транскрипция, репарация и репликация ДНК. Доступ к ДНК в хроматине обеспечивается за счет работы различных ремодулирующих комплексов, а также по средствам посттрансляционной модификации (ПТМ) хвостов гистонов. Одной из таких ПТМ является ацетилирование гистонов. Оно представляет собой обратимую посттрансляционную модификацию, контролируруемую различными гистонацетилтрансферазами (НАТ) и гистондеацетилазами (HDAC) [5].

Гистондеацетилазный комплекс Rpd3 участвует в репарационной сборке хроматина. Его участие обусловлено снятием ацетилирования с гистонов, что в свою очередь приводит к уплотнению нуклеосом и нормализации структуры хроматина [6].

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* HDAC Rpd3 входит в состав двух комплексов: Rpd3L и Rpd3S. Оба комплекса содержат общие субъединицы Rpd3, Sin3 и Ume1 [5].

Нами было показано, что инактивация коровых субъединиц Rpd3 и Sin3 комплекса Rpd3 приводит как к повышению, так и снижению УФ-индуцированного мутагенеза соответственно. Также было показано влияние инактивации данных субъединиц на экспрессию гена *RNR3*, что говорит о способности данного комплекса контролировать чекпойнт посредством регуляции активности киназы Rad53.

Полученные данные свидетельствуют о том, что нарушение в работе гистондеацетилазного комплекса Rpd3 приводит к мутационным событиям и сам комплекс вовлечен в контроль мутационного процесса у дрожжей *S. cerevisiae*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Курчатовского геномного центра – ПИЯФ в рамках программы развития центров геномных исследований мирового уровня по соглашению № 075-15-2019-1663.

1. Dhall A., Chatterjee C. // ACS Chem. Biol. 2011. V. 6. No. 10. P. 987–989. doi:10.1021/cb200142c
2. Tyagi M. et al. // Nucleus. 2016. V. 7. No. 4. P. 388–404. doi:10.1080/19491034.2016.1211217
3. Kobayashi W., Kurumizaka H. // Current Opinion in Structural Biology. 2019. V. 59. P.107–114. doi:10.1016/j.sbi.2019.07.011
4. Hauer M.H., Gasser S.M. // Genes & Development. V. 31. P. 2204–2221. doi:10.1101/gad.307702
5. Tao R. et al. // Mol. Cell. Biol. 2013. V. 33. No. 21. P. 4212–4224. doi:10.1128/MCB.00618-13
6. Chen X-F. et al. // Curr. Biol. 2012. V. 22. No. 1. P. 56–63. doi:10.1016/j.cub.2011.11.042

Поиск и характеристика однодоменного антитела против SARS-CoV-2

Арипов В. С., Волкова Н. В., Несмеянова В. С., Исаева А. А., Шаньшин Д. В.,
Щербаков Д. Н., Ильичев А. А.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

aripov_vs@vector.nsc.ru

SARS-CoV-2 вызвал пандемию, которая продолжает уносить жизни и представляет глобальную угрозу для здоровья населения [1]. Наряду с вакцинацией для борьбы с COVID-19 возможно использовать терапевтические противовирусные средства. Одним из перспективных подходов к лечению вирусных инфекций является терапия на основе антител [2, 3].

Задачей нашего исследования был поиск однодоменных антител, способных специфично взаимодействовать с рецепторсвязывающим доменом (RBD) поверхностного белка S SARS-CoV-2. Для достижения поставленной задачи была использована технология фагового дисплея. Использование этой технологии позволяет заменить все этапы работы после иммунизации животных и удаления селезенки простыми процедурами манипулирования с ДНК и бактериями, сокращая время получения стабильных клонов, продуцирующих антитела, с месяцев до недель и удешевляя этот процесс [4].

С помощью аффинной селекции были отобраны клоны, содержащие в своем составе наноантитела против SARS-CoV-2. Фаговые антитела были проверены с помощью ИФА на специфическое связывание с различными вариантами RBD поверхностного белка S SARS-CoV-2. В результате проверки было выявлено 12 наноантител, специфично взаимодействующих с RBD. Наиболее высокий уровень взаимодействия был показан для клона 1.3, поэтому его нуклеотидная последовательность была клонирована в составе экспрессионного вектора.

Был получен рекомбинантный белок AB_COV-2_1.3, обладающий свойствами однодоменного наноантитела против SARS-CoV-2. С помощью ИФА было проверено специфическое связывание полученного рекомбинантного белка с различными вариантами RBD поверхностного белка S SARS-CoV-2.

Также для оценки взаимодействия полученного наноантитела использовали конкурентный ИФА, по результатам которого можно сделать вывод, что полученное антитело препятствует взаимодействию RBD с ACE2.

1. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). URL: <https://www.who.int/ru/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (дата обращения: 25.12.2022).
2. Lu Q., Zhang Z., Li H. et al. Development of multivalent nanobodies blocking SARS-CoV-2 infection by targeting RBD of spike protein // J. Nanobiotechnol. 2021. V. 19. P. 1–12.

3. Zebardast A., Hosseini P., Hasanzadeh A. et al. The role of single-domain antibodies (or nanobodies) in SARS-CoV-2 neutralization // *Mol Biol Rep.* 2022. V. 49. No. 1. P. 647–656.
4. Тикунова Н. В., Морозова В. В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител // *Acta Naturae.* 2009. № 3. С. 22–31.

Наноразмерные комплексы на основе изолята сывороточных белков молока и хитозана как пищевые системы доставки липосомальной формы омега-3 полиненасыщенных жирных кислот и куркумина: структура и свойства

Балакина Е. С.^{1,2}, Комарова А. П.^{1,2}, Чеботарёв С. А.¹, Зеликина Д. В.¹

¹ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

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

balakinakaterina1999@gmail.com

В настоящее время профилактика наиболее распространенных неинфекционных заболеваний (сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, сахарного диабета 2-го типа, онкологии), а также поддержка иммунной системы человека в борьбе с инфекционными заболеваниями (Covid 19) являются одними из приоритетных целей в области разработки функциональных продуктов питания для персонализированной диетотерапии [1, 2].

Такие продукты питания должны содержать ингредиенты, которые оказывают биологически значимое и положительное влияние на метаболические процессы в организме человека. Состав таких ингредиентов должен включать определенные биологически активные вещества, так называемые нутрицевтики, которые обладают, например, антиоксидантным, противодиабетическим или противораковым действием. Среди них особый интерес представляют такие гидрофобные нутрицевтики, как растительный антиоксидант – куркумин, а также незаменимые длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (омега-3 и омега-6 ПНЖК) [2–4].

Для получения их водорастворимой на 100 % формы было отработано совместное инкапсулирование этих нутрицевтиков сначала липосомами фосфатидилхолина (> 90 %), а затем комплексами пищевых биополимеров. Комбинацией физико-химических методов было показано, что полученные супрамолекулярные комплексные частицы обладали следующими важными для биоусвоения нутрицевтиков свойствами: наноразмерами (< 600 нм); высокой инкапсулирующей способностью (> 80 %) по отношению к липосомам; защитной способностью по отношению к окислению ПНЖК (70 %) и деградации куркумина (> 50 %) при хранении в неблагоприятных условиях (свет, комнатная температура), а также уникальными свойствами в пищеварительном тракте *in vitro*: мукоадгезивностью покрытия хитозана, частично гидролизующегося пепсином в желудке, и большей биодоступностью инкапсулированных нутрицевтиков из ферментативно гидролизованного комплекса в тонком кишечнике.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 21-76-00045 (<https://rscf.ru/project/21-76-00045/>).

1. Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года (Распоряжение Правительства Российской Федерации от 29.06.2016 г. № 1364-р.).
2. Szabó Z., Marosvölgyi T., Szabó É., Bai P., Figler M., Verzár Z. The potential beneficial effect of EPA and DHA supplementation managing cytokine storm in coronavirus disease // *Frontiers in Physiology*. – 2020. – 11.– P. 752.
3. Tamrakar V., Arora Ch. Curcuma caesia: present status and future prospect as herbal drug // *Progressive Agriculture*. – 2019. –19 (2). – P. 258–261.
4. Patel A., Desai S.S., Mane V.K., Enman J., Rova U., Christakopoulos P., Matsakas L. Futuristic food fortification with a balanced ratio of dietary ω -3/ ω -6 omega fatty acids for the prevention of lifestyle diseases // *Trends in Food Science and Technology*. – 2022. – 120. – P. 140–153.

Исследование влияния размера участка пар оснований, опосредованных серебром, на стабильность дуплексов олигонуклеотидов

Барышев А. В., Соколов П. А., Касьяненко Н. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

andry-barash@mail.ru

После открытия двойной цепи ДНК ученые не переставали исследовать возможности ее изменения для получения новых или изменения уже существующих свойств ДНК для расширения возможностей ее применения. Одним из подобных изменений ДНК является замена уотсон-криковских пар оснований на другие, например опосредованные металлом, пары [1]. В данной работе изучаются опосредованные серебром пары оснований «цитозин – цитозин». Было показано, что данная пара оснований имеет как высокую термическую, так и высокую химическую стабильность [2], что в дальнейшем может позволить использовать подобные элементы структуры в ДНК-нанотехнологиях. Кроме того, в работе [3] была показана высокая специфичность образования подобных пар цитозинов, опосредованных серебром, которая может быть использована, с одной стороны, для обнаружения и нейтрализации ионов серебра в различных источниках воды, а с другой – для обнаружения ошибок или полиморфизмов в последовательностях нуклеотидов. Таким образом, данная тема исследований является актуальной, а ее результаты затем могут быть использованы в новых областях наук.

В данной работе проводилось исследование набора олигонуклеотидов, у которых в середине находился регион, богатый цитозинами (их количество варьировалось от 8 до 16), который будет участвовать в опосредованных серебром парах оснований, а по краям – комплементарные участки. Это было сделано для проверки формирования дуплекса в зависимости от длины участка цитозинов, а также изучения их стабильности в присутствии различного количества ионов серебра. Для этого использовались методы плавления и гель-электрофореза. Было показано формирование двух фракций дуплексов с переходом между ними при изменении количества ионов серебра в системе.

1. Katz S. The reversible reaction of Hg (II) and double-stranded polynucleotides a step-function theory and its significance // BBA – Biochimica et Biophysica Acta. 1963. No. C (68).
2. Swasey S.M., Gwinn E.G. Silver-mediated base pairings: Towards dynamic DNA nanostructures with enhanced chemical and thermal stability // New Journal of Physics. 2016. No. 4 (18).

3. Torigoe H. et al. Thermodynamic and structural properties of the specific binding between Ag⁺ ion and C:C mismatched base pair in duplex DNA to form C-Ag-C metal-mediated base pair // *Biochimie*. 2012. No. 11 (94).

Киназная активность LRRK2 влияет на активность лизосомных гидролаз в первичной культуре макрофагов пациентов с болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене GBA

Башарова К. С.¹, Безрукова А. И.¹, Изюмченко А. Д.¹, Байдакова Г. В.⁴, Милюхина И. В.^{2,3}, Захарова Е. Ю.⁴, Пчелина С. Н.^{1,2}, Усенко Т. С.^{1,2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

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

³ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва, Россия

kbasharova@yandex.ru

Введение. Показано, что ингибирование киназной активности, богатой лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2), приводит к увеличению активности глюкоцереброзидазы GCase у пациентов с болезнью Паркинсона (БП), ассоциированной с мутациями в гене GBA (GBA-БП), являющимися фактором высокого риска БП в гомозиготном или в компаунд-гетерозиготном состояниях, приводящими к развитию болезни Гоше (БГ) [1].

Цель работы – оценка влияния ингибитора LRRK2 MLi-2 на активность лизосомных гидролаз и уровень их субстратов в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с дисфункцией GCase (GBA-БП, БГ) и в контроле.

Материалы и методы. Активность гидролаз (альфа-галактозидаза (GLA), кислая сфингомиелиназа (ASMase), кислая альфа-глюкозидаза (GAA), галактозилцереброзидазы (GALC), GCase), уровень их субстратов (глоботриаозилсфингозин (LysoGb3), сфингомиелин (LysoSM), гексозилсфингозин (HexSph)) оценивали высокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемной масс-спектрометрией в первичной культуре макрофагов, культивируемых без и в присутствии MLi-2, у 5 пациентов с GBA-БП, 2 пациентов с БГ и 6 индивидуумов контрольной группы.

Результаты. Показано увеличение активности GCase, GAA, GALC, GLA и тенденция к снижению уровня LysoSM в первичной культуре макрофагов пациентов с GBA-БП в присутствии MLi-2 по сравнению с культивированием без ($p = 0,031$, $p = 0,047$, $p = 0,031$, $p = 0,047$, $p = 0,059$ соответственно). У пациентов с БГ, напротив, выявлена тенденция к снижению активности GAA и повышению уровня LysoSM в первичной культуре макрофагов в присутствии MLi-2 по сравнению с отсутствием MLi-2 ($p = 0,063$, $p = 0,058$ соответственно). Статистически значимых различий в контроле не выявлено ($p > 0,05$).

Выводы. Ингибирование киназной активности LRRK2 ведет к увеличению активности GAA, GALC, GLA, помимо GCase, и к снижению уровня LysoSM в

первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA-БП. Эффект характерен для пациентов с GBA-БП, но не пациентов с БГ.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-25-00501.

1. Ysselstein D., Nguyen M., Young T.J., Severino A., Schwake M., Merchant K., Krainc D. LRRK2 kinase activity regulates lysosomal glucocerebrosidase in neurons derived from Parkinson's disease patients // Nat. Commun. 2019 Dec 5; 10 (1): 5570.

Создание плазмидной конструкции для продукции коротких пептидов в бактериальных клетках

Безгина М. Д.¹, Бондарев С. А.^{1,2}, Журавлева Г. А.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологий, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

Bezgina.ma@yandex.ru

Короткие пептиды широко применяются в фармакологической, косметической и пищевой промышленности [1]. Получать короткие пептиды можно химическим синтезом, ферментативным гидролизом, а также с помощью рекомбинантного производства. Недостатками химического синтеза являются высокая стоимость, возможность рацемизации и токсичное производство. С помощью ферментативного синтеза можно получить только пептиды, последовательности которых содержатся в природных белках [2]. Продукция рекомбинантных пептидов в клетках бактерий имеет такие преимущества, как воспроизводимость, биосовместимость, экологичность, а также перспективы для промышленного внедрения.

Мы разработали новую конструкцию для продукции пептидов в клетках бактерий. За основу был взят вектор pMAL-c2, который позволяет сверхпродуцировать белок MBP в клетках бактерий [3]. MBP является белком, используемым для создания химерных конструкций при продукции рекомбинантных белков в клетках бактерий. В плазмиду мы добавили участок, кодирующий 12 гистидинов, что позволяет очистить белок с помощью аффинной хроматографии. В конструкции также содержатся сайты для специфического гидролиза XhoI и HindIII для интеграции кодирующей последовательности пептида интереса, чтобы он образовывал единую рамку считывания с MBP-His12. Мы провели несколько экспериментов по сверхпродукции разных конструкций с последующей очисткой. Это позволило оценить количество вырабатываемого белка, слитого с пептидом. С 1 л объема бактериальной культуры нам удалось наработать 30–55 мг белка.

Таким образом, полученную нами конструкцию можно использовать в качестве вектора для создания рекомбинантных плазмид для продукции коротких пептидов в клетках бактерий *Escherichia coli*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-74-10042.

1. Hamley I.W. Small bioactive peptides for biomaterials design and therapeutics // Chemical Reviews. 2017, 117 (24): 14015–14041.
2. Daliri E.B., Oh D.H., Lee B.H. Bioactive Peptides // Foods. 2017, 6 (5): 32.

3. Center R.J., Kobe B., Wilson K.A., Teh T., Howlett G.J., Kemp B.E., Pountourios P. Crystallization of a trimeric human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain fragment as a chimera with maltose-binding protein // *Protein Sci.* 1998, 7: 1612–1619.

Анализ транскриптома клеток черной субстанции головного мозга мышей с МФТП-индуцированной моделью паркинсонизма и с дисфункцией фермента глюкоцереброзидазы

*Безрукова А. И.¹, Усенко Т. С.^{1,2}, Башарова К. С.¹, Николаев М. А.^{1,2},
Емельянов А. К.^{1,2}, Милюхина И. В.³, Руденок М. М.⁴, Шадрина М. И.⁴,
Сломинский П. А.⁴, Пчелина С. Н.^{1,2}*

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

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

³ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва, Россия

bz.nastya96@gmail.com

Введение. Молекулярные механизмы болезни Паркинсона (БП), ассоциированной с мутациями в гене *GBA* (*GBA*-БП), кодирующем фермент глюкоцереброзидазу (*GCase*), сегодня остаются неизвестными.

Цель работы заключалась в анализе транскриптома клеток черной субстанции (ЧС) головного мозга мышей с (МФТП)-индуцированной (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) моделью паркинсонизма и с дисфункцией фермента *GCase*.

Материалы и методы. Анализ дифференциальной экспрессии генов проведен в клетках ЧС с использованием пакета DESeq2 в среде R в 4 группах мышей, разделенных в зависимости от введенного препарата: раствор хлорида натрия (NaCl, контроль), МФТП, кондуритол-бета-эпоксид (СВЕ), сочетанное введение МФТП и СВЕ (МФТП/СВЕ). Валидация дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) проводилась в лимфоцитах периферической крови пациентов с *GBA*-БП, БП, бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA* (*GBA*-носители) и контроле методом количественной ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. В группе мышей с СВЕ, по сравнению с группой мышей с МФТП, было выявлено 4 ДЭГ; в группе мышей с МФТП, по сравнению с контролем, 10 ДЭГ; в группе мышей с МФТП/СВЕ, по сравнению с контролем, 6 ДЭГ. ДЭГ, выявленные в группе мышей с МФТП/СВЕ, по сравнению с контролем, вовлечены в процессы, связанные с возбудимостью нейронов, а также связаны с нарушением везикулярного транспорта и аутофагией, которые рассматриваются как ключевое звено в патогенезе БП [1, 2]. Валидационное исследование подтвердило изменение экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию аутофагии и транспорт [3, 4], таких как *SGK1* у пациентов с *GBA*-БП, по сравнению с пациентами с БП ($p = 0,056$), и *ARL4D* у пациентов с *GBA*-БП и у

GBA-носителей, по сравнению с пациентами с БП ($p < 0,0001$) и с контролем ($p < 0,05$).

Заключение. Анализ транскриптома клеток ЧС головного мозга мышей и валидационное исследование выявили различия в паттернах экспрессии генов, связанных с аутофагией и везикулярным транспортом при БП, ассоциированной с дисфункцией GCase.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения» (регистрационный номер 121060200125-2).

1. Hou X., Watzlawik J.O., Fiesel F.C. et al. Autophagy in Parkinson's Disease // Journal of Molecular Biology, 2020. – V. 432, No. 8. – P. 2651–2672.
2. Singh P.K., Muqit M.M.K. Parkinson's: A Disease of Aberrant Vesicle Trafficking // Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2020. – V. 36. – P. 237–264.
3. Liu W., Wang X., Liu Z. et al. SGK1 inhibition induces autophagy-dependent apoptosis via the mTOR-Foxo3a pathway // Br. J. Cancer, 2017. – V. 117. – P. 1139–1153.
4. Katayama T., Imaizumi K., Yoneda T., Taniguchi M. et al. Role of ARF4L in recycling between endosomes and the plasma membrane // Cellular and Molecular Neurobiology, 2004. – V. 24, No. 1. – P. 137–147.

Степень метилирования геномной ДНК клеток периферической крови при болезни Паркинсона

Белых Е. А.¹, Лавринова А. О.¹, Журавлев А. С.¹, Тюрин А. А.²,
Милюхина И. В.^{2,3}, Беркович О. А.², Пчелина С. Н.^{1,2}, Емельянов А. К.^{1,2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

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

³ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

evgene.ya@yandex.ru

Показано, что при болезни Паркинсона (БП) белок альфа-синуклеин накапливается и агрегирует в дофаминергических нейронах черной субстанции головного мозга. Было обнаружено, что метилирование регуляторных областей гена альфа-синуклеина (*SNCA*) влияет на его экспрессию [1, 2]. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано влияние Л-ДОФА-содержащих препаратов на степень метилирования геномной ДНК [3].

Целью исследования явилась оценка уровня глобального метилирования геномной ДНК клеток периферической крови пациентов с БП и контроля. В данное исследование было включено 48 пациентов с БП (средний возраст – $65,9 \pm 8,9$ года, средний возраст начала заболевания – $63,7 \pm 8,3$ года), не принимающих Л-ДОФА-содержащие препараты, и 49 индивидуумов контрольной группы (средний возраст – $60,6 \pm 7,6$ года). Уровень глобального метилирования геномной ДНК в указанных группах в лимфоцитарной клеточной фракции и клетках CD45+ периферической крови был оценен с использованием метода ИФА (Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Epigentek, США)). Статистические расчеты были выполнены с использованием программы SPSS 21.0. Данные представлены в виде медианы (мин. – макс.), %.

Показано гипометилирование геномной ДНК в клетках периферической крови у пациентов с БП по сравнению с группой контроля (2,09 (0,08–8,06) и 3,03 (0,81–5,94) соответственно; $p = 0,014$). При сравнении индивидуумов женского пола было выявлено снижение степени метилирования геномной ДНК у пациентов с БП по сравнению с контролем (1,69 (0,14–6,62) и 3,03 (0,81–5,94) соответственно; $p = 0,013$). Не обнаружено статистически значимых различий при сравнении степени метилирования геномной ДНК в клетках CD45+ пациентов с БП и контроля (2,65 (0,47–8,12) и 2,32 (1,18–5,69) соответственно; $p > 0,05$).

Из полученных данных можно предположить, что развитие БП сопровождается изменением уровня глобального метилирования геномной ДНК клеток периферической крови пациентов.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме:
«Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально
значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения»
(регистрационный номер 121060200125-2).

1. Jowaed A., Schmitt I., Kaut O., Wüllner U. Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains // J. Neurosci. 2010 May 5; 30 (18): 6355–9.
2. Tan Y.Y., Wu L., Zhao Z.B., Wang Y., Xiao Q., Liu J., Wang G., Ma J.F., Chen S.D. Methylation of α -synuclein and leucine-rich repeat kinase 2 in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients // Parkinsonism Relat. Disord. 2014 Mar; 20 (3): 308–13.
3. Schmitt I., Kaut O., Khazneh H., de Boni L., Ahmad A., Berg D., Klein C., Fröhlich H., Wüllner U. L-dopa increases α -synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients *in vivo* and *in vitro* // Mov. Disord. 2015 Nov; 30 (13): 1794–801.

Получение и характеристика фоторина – нового белкового ингибитора металлопротеаз из энтомопатогенной бактерии *Photorhabdus laumondii*

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

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

igorqetu@mail.ru

Бактериальные пары «протеаза – белковый ингибитор» являются перспективной моделью для исследований *in vivo* фундаментальных принципов регуляции протеолиза. Одной из таких пар являются протеализинподобные протеазы (ППП) и эмфориноподобные ингибиторы (ЭПИ), принадлежащие к семействам M4 и I104 (по базе данных MEROPS) соответственно [1]. Предполагается, что ППП и ЭПИ принимают участие в межбактериальной конкуренции, а также во взаимодействии бактерий с высшими организмами и в патогенезе. Однако прямых данных о биологической роли этих белков нет. В качестве модели для изучения биологических функций пары ППП и ЭПИ, а также механизмов регуляции активности протеазы ингибитором перспективной представляется энтомопатогенная бактерия *Photorhabdus laumondii subsp. laumondii* ТТ01 (ТТ01). Эта бактерия имеет сложный жизненный цикл, являясь и симбионтом нематод, и патогеном насекомых, что дает уникальную возможность для исследования регуляции протеолиза при различных типах взаимодействия «бактерия – хозяин» [2].

В геномах бактерий рода *Photorhabdus*, в том числе у ТТ01, за геном ППП, протеазы S (PrtS), следует ген, который кодирует гипотетический белок, гомологичный ЭПИ. PrtS была охарактеризована ранее для разных представителей рода [3]. Предполагается, что этот фермент участвует в патогенезе. Данных об ЭПИ у *Photorhabdus* в настоящее время нет.

Нами был впервые клонирован и экспрессирован в клетках *Escherichia coli* ген ЭПИ из ТТ01. Рекомбинантный белок, названный фоторином (Phin), был очищен и охарактеризован. Получены поликлональные антитела к Phin. Показано, что Phin является сильным конкурентным, медленно связывающимся ингибитором PrtS ($K_i = 210 \pm 10$ пМ), а также что Phin накапливается в клетках ТТ01.

Таким образом, нами впервые продемонстрировано, что ген ЭПИ у бактерий рода *Photorhabdus* является функциональным, и, следовательно, ТТ01 может быть использована для исследования принципов регуляции протеолитической активности белковыми ингибиторами на модели пары «ППП – ЭПИ».

1. Chukhontseva K.N. et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* 169 (2021).
2. Clarke D.J. // *Cell. Microbiol.* 10, 11 (2008).
3. Held K.G. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 23 (2007).

Разработка сенсора для детекции бактериальных и вирусных патогенов с использованием бинарных дезоксирибозимов

Березовская М. Ю., Бобков Г. А., Амие М., Рубель М. С.

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

berezovskaya@scamt-itmo.ru

Ранняя диагностика инфекционных заболеваний крайне необходима для своевременного назначения терапии и предотвращения острых эпидемиологических ситуаций. Диагностические системы, существующие на сегодняшний день, не всегда могут предоставить быстрый и точный результат с использованием доступного оборудования, так как в своем большинстве они требуют либо долгого времени, либо высококвалифицированного персонала, либо дорогостоящих приборов.

Детекция нуклеиновых кислот – один из современных методов диагностики заболеваний, в частности патогенных организмов, так как зачастую эти методы менее время- и ресурсозатратные, чем классические диагностические способы. Релевантным решением данной проблемы может быть внедрение диагностических систем point-of-care для детекции нуклеиновых кислот на основе дезоксирибозимов.

В данной работе были использованы бинарные дезоксирибозимы для детекции бактериальных и вирусных патогенов *Herpes Simplex 4* (вирус Эпштейна – Барр), *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*. Данная структура представляет собой две олигонуклеотидные цепи, в которые входят аналитсвязывающее плечо, комплементарно связывающееся с целевой ДНК-последовательностью, репортерное плечо, связывающееся с флуоресцентным субстратом, и каталитический кор, изменяющий субстрат для увеличения флуоресценции [1, 2]. В качестве предварительного варианта накопления продукта используется изотермическая амплификация LAMP (loop-mediated isothermal amplification) [3].

В результате работы с помощью бинарных дезоксирибозимов были обнаружены патогенные организмы. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Тесла через 30 мин инкубации при 55 °С.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-75-10073.

1. Mokany E., Bone S.M., Young P.E., Doan T.B., Todd A.V. (2010). MNAszymes, a versatile new class of nucleic acid enzymes that can function as biosensors and molecular switches // *Journal of the American Chemical Society*, 132 (3), 1051–1059.
2. Kolpashchikov D.M. (2007). A binary deoxyribozyme for nucleic acid analysis // *Chem. Bio. Chem.*, 8 (17), 2039–2042.

3. Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L., Morita K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases // *Reviews in Medical Virology*, 18 (6), 407–421.

Подбор и проверка ингибиторов неструктурных белков RdRp и 3CL-Pro из SARS-CoV-2

Биджиева М. С.^{1,2}, Толичева О. А.², Виноградова Д. С.², Борушко Н. В.², Швецов А. В.^{1,2}, Петухов М. Г.², Шмидт А. Е.², Шалджян А. А.³, Егоров В. В.^{3,4}, Коневега А. Л.^{1,2,5}

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

² НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

³ Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

bidzhieva_ms@pnpi.nrcki.ru

Пандемия инфекции COVID-19, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2, затронула миллионы людей и до сих пор остается одной из основных проблем общественного здравоохранения. На сегодняшний день актуальной задачей является разработка противовирусных препаратов и протоколов лечения больных.

Потенциально эффективная стратегия борьбы с вирусом заключается в подборе ингибиторов функциональных белков, играющих важную роль в его жизненном цикле [1, 2]. Для реализации данного подхода в кратчайшие сроки оптимальным представляется поиск подходящих ингибиторов из числа зарегистрированных лекарственных препаратов, прошедших все необходимые доклинические и клинические исследования.

В качестве основных объектов исследования данного проекта выбраны два неструктурных белка SARS-CoV-2, выполняющие ключевые функции на начальных этапах развития вируса в клетке: основная протеаза коронавируса Nsp5 (3CL-Pro) и РНК-зависимая РНК-полимераза Nsp12 (RdRp) [3, 4]. При помощи комбинации методов компьютерного моделирования было отобрано более 200 соединений из базы данных ZINC (всего 4 178 соединений), которые являлись потенциальными ингибиторами вышеупомянутых белков-мишеней. Из них были выбраны 14 наиболее распространенных и легкодоступных препаратов.

Для Nsp5 и Nsp12 разработаны протоколы наработки вирусных белков в бактериальных клетках, выделения и очистки, а также подтверждена их функциональная активность. Был проведен анализ взаимодействия подобранных препаратов с протеазой и полимеразой и анализ ингибирующего действия этих соединений в экспериментах *in vitro*.

Данная работа в будущем может стать основой для новых или аналогичных исследований, направленных на борьбу с распространением вируса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-04-60491 «Вирусы».

1. Kumar S. et al. A multi-targeted approach to identify potential flavonoids against three targets in the SARS-CoV-2 life cycle // Computers in Biology and Medicine. Elsevier Ltd, 2022. Vol. 142.
2. Malone B. et al. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design // Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nature Research, 2022. Vol. 23, No. 1. P. 21–39.
3. V'kovski P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 // Nature Reviews Microbiology. Nature Research, 2021. Vol. 19, No. 3. P. 155–170.
4. Grum-Tokars V. et al. Evaluating the 3C-like protease activity of SARS-Coronavirus: Recommendations for standardized assays for drug discovery // Virus Research. Elsevier, 2008. Vol. 133, No. 1. P. 63–73.

Получение монокристаллов ГТФ-связывающего фактора YsxC из *Staphylococcus aureus* для рентгеноструктурных исследований

Биктимиров А. Д.¹, Исламов Д. Р.¹, Валидов Ш. З.¹, Юсупов М. М.²,
Усачев К. С.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии,
Илькирш-Граффенштаден, Франция

biktimirov.artyom@gmail.com

Тревожный рост числа новых устойчивых к антибиотикам штаммов патогенных бактерий создает необходимость в разработке более эффективных антибактериальных препаратов для терапевтического использования [1]. Одной из таких бактерий является *Staphylococcus aureus* – возбудитель широкого спектра инфекционных заболеваний. Определение геномной последовательности ряда патогенных микроорганизмов [2] открыло возможности для разработки новых высокоселективных соединений, блокирующих функциональную активность белков, которые являются существенными для выживания клетки. Именно поэтому изучение структуры белков является одним из значимых направлений борьбы с патогенными микроорганизмами.

С этой целью в качестве объекта исследований был выбран ГТФ-связывающий белковый фактор YsxC из патогенной бактерии *Staphylococcus aureus*. В работе [3] для бактерии *Bacillus subtilis* было показано, что делеция гена целевого белка приводит к потере 6 белков в составе большой субъединицы рибосомы. Эта функциональная особенность указывает на значимость белка YsxC в процессе биосинтеза и обуславливает актуальность его структурных исследований.

В рамках данной работы была создана плазмидная конструкция с геном целевого белка. Подобраны условия экспрессии в *Escherichia coli*, а также оптимизированы буферные условия для этапов очистки белка методами аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Методом малоуглового рентгеновского излучения была получена электронная плотность, наблюдаемый вид которой указывает на то, что белковая молекула в растворе находится в форме мономера. Методом диффузии водяных паров в висячей капле получены монокристаллы белка YsxC из *S. aureus*, для которых был произведен сбор дифракционных данных с разрешением 3 Å. Оптимизация условий кристаллизации и криопротекции позволила улучшить разрешение до 2 Å. Таким образом, определена пространственная группа кристалла $P32_1$ и параметры элементарной ячейки: $a = 55,942 \text{ \AA}$; $b = 55,942 \text{ \AA}$; $c = 107,112 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$.

Полученные данные будут использованы для определения пространственной структуры белка YsxC.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20034).

1. Chambers H.F., Deleo F.R. // Nat. Rev. Microbiol. 2009. V. 7 No. 9. P. 629. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
2. Cole S., Brosch R., Parkhill J. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // Nature. 1998. V. 393. P. 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>
3. Ni X., Davis J.H. *et al.* YphC and YsxC GTPases assist the maturation of the central protuberance, GTPase associated region and functional core of the 50S ribosomal subunit // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. No. 17. P. 8442–8455. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw678>

Изучение механизмов фармакологической модуляции NMDA-рецепторов *in vitro*

Бойков С. И.

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

sergei-boickov@mail.ru

Исследование механизмов действия препаратов на ионные каналы является актуальной задачей в нейробиологии и биофизике. Благодаря изучению потенциальных мишеней действия агентов повышается возможность уменьшения действия побочных эффектов у имеющихся и разрабатываемых препаратов в клинике.

NMDA-рецепторы (NMDAR) – ионные каналы возбуждающей синаптической передачи. Дисфункции связаны с развитием нейродегенеративных заболеваний, эпилепсии, нейропатической боли и др. [1]. Ранее показано, что трициклические антидепрессанты (ТСА) имеют 2 механизма действия на NMDAR: потенциал- и кальций-зависимость [2, 3]. Ca^{2+} -зависимость действия ТСА на нейроны представляет собой интерес, т. к. существуют потенциальные препараты (KBR, литий, этанол, холестерин), действующие на Ca^{2+} -зависимую десенситизацию (CDD) [4].

Эксперименты выполнены на первичной культуре нейронов головного мозга крыс, регистрировались токи методом локальной фиксации потенциала на фоне активации рецепторов совместно с блокаторами в различных диапазонах концентраций.

Показано, что действие ТСА на NMDAR модулируется нутриентами, в частности этанолом и холестерином. Эффект амитриптилина (ATL) на NMDAR ослабевает в присутствии уже 0,03 % этанола, а также при значительном дефиците холестерина в мембранах клеток. Впервые объяснен механизм этих эффектов через влияние этанола и холестерина на CDD в NMDAR через натрий-кальциевый обменник (NCX).

Нами исследовано влияние различных концентраций лития ($[\text{Li}^+]$) на ингибирование ТСА токов через NMDAR. Показано, что Li^+ в терапевтических концентрациях 0,5-1 мМ вызывает повышение IC_{50} ATL в 10 раз для Ca^{2+} -зависимого ингибирования NMDAR. Ca^{2+} -зависимое взаимодействие между Li^+ и ATL может быть обусловлено их конкуренцией за одну и ту же молекулярную мишень. Таким образом, малые концентрации Li^+ могут ослаблять эффект ATL при комбинированной терапии. Данные свидетельствуют о том, что Li^+ и ATL могут усиливать CDD NMDAR за счет ингибирования NCX.

Работа выполнена при поддержке РФФ № 21-15-00403.

1. Zhou et al. // *Neuropharmacology*, 74, 69–75 (2013).
2. Stepanenko et al. // *Scientific Reports*, 9 (1): 19454 (2019).
3. Stepanenko et al. // *Front. Pharmacol.*, 12: 815368 (2022).
4. Sibarov et al. // *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 355 (3): 484–95 (2015).

Биохимическая характеристика активности полиморфных вариантов праймазы-полимеразы PrimPol человека

Болдинова Е. О., Манукян А. А., Белова Я. Г., Макарова А. В.

НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва, Россия

lizaboldinova@yandex.ru

Праймаза-полимераза PrimPol человека, впервые выделенная в 2013 году, относится к суперсемейству архей-эукариотических праймаз (АЭП). PrimPol обладает одновременно ДНК-праймазной и ДНК-полимеразной активностями и участвует в репликации поврежденной ДНК посредством реинициации синтеза ДНК на поврежденных участках и транслезионного синтеза, играя важную роль в поддержании стабильности генома [1–3]. В клетках человека был обнаружен ряд полиморфных вариантов PrimPol, однако их каталитические свойства и возможное участие в патогенезе заболеваний не были исследованы.

В данной работе была проведена биохимическая характеристика активности полиморфного варианта PrimPol с заменой V102A (MAF 0,04–0,1 %), статистически достоверно связанного с повышенной частотой рака шейки матки, и 4 редких полиморфизмов (Q48E, Q48R, D114E, L115M), затрагивающих активный центр фермента.

Тестирование ДНК-полимеразной активности полученных вариантов PrimPol проводили с помощью постановки реакций удлинения праймера. Было показано, что все варианты PrimPol, затрагивающие аминокислоты в активном центре белка, обладали сниженной ДНК-полимеразной активностью, что выражалось в значительном падении эффективности удлинения праймера и сокращении длины продуктов синтеза (падении процессивности). Ослабление активности наиболее ярко заметно при использовании ионов Mg^{2+} в качестве кофактора – основного иона металла-кофактора для ДНК-полимераз. Также наблюдалось снижение ДНК-праймазной активности, о которой судили по эффективности образования тройного комплекса PrimPol: ДНК-субстрат: ДНК-продукт. Нарушение активности усиливалось в ряду L115M > Q48E и Q48R > V102A > D114E вплоть до полной потери каталитической активности.

Таким образом, все исследованные полиморфные и редкие варианты PrimPol, затрагивающие активный центр фермента, характеризуются сниженной каталитической активностью, что может вносить вклад в патогенез онкологических заболеваний.

Работа была поддержана грантом РФФ № 22-24-20150.

1. García-Gómez S. et al. (2013). PrimPol, an Archaic Primase/Polymerase Operating in Human Cells // *Molecular Cell*, 52 (4), 541–553. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.025>
2. Kobayashi K. et al. (2016). Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleosides // *Cell Cycle*, 15 (15), 1997–2008. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1191711>
3. Makarova A.V. et al. (2018). *In vitro* lesion bypass by human PrimPol // *DNA Repair*, 70. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.07.009>

Разработка и получение критически значимых ферментов для генетических технологий. Phi29-ДНК-полимераза

Борисова А. А., Евтеева М. А., Гуницева Н. М.

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

annab59188@gmail.com

Анализ генома микроорганизмов является все более важной научной областью, которая дает данные для клинической диагностики, филогенетического анализа, эпидемиологических исследований и изучения организации и эволюции генома. Наличие эффективных инструментов для амплификации последовательностей генома является обязательным условием для его успешного анализа. Наиболее широко используемым методом амплификации является полимеразная цепная реакция (ПЦР), для которой существует множество конкретных протоколов для различных задач. Однако обычно ПЦР дает относительно короткие ампликоны и зависит от конкретных последовательностей праймеров. Поскольку качество анализа генома повышается с увеличением длины генерируемых последовательностей, наиболее выгодными являются полимеразы, позволяющие амплифицировать целые геномы [1, 2]. Phi29-ДНК-полимераза обладает несколькими свойствами, такими как замещение цепи, корректирующая активность и образование очень длинных продуктов синтеза ($\geq 70\ 000$ пар нуклеотидов), что делает ее наиболее подходящей для эффективной амплификации кольцевых молекул ДНК из сложных биологических образцов.

В нашей лаборатории найден, получен и успешно тестируется ряд phi29-ДНК-полимераз. На первых этапах проверки определяется оптимальная рабочая концентрация полученных полимераз для успешной амплификации кольцевой матрицы, затем – определение температурного диапазона работы полимераз.

На данный момент в нашей лаборатории имеется ряд уже охарактеризованных полимераз, далее планируется ряд работ с тестированием их активности в присутствии их «родных» SSB-белков.

1. Nilsson M. et al. Analyzing genes using closing and replicating circles // Trends in biotechnology. V. 24. No. 2. P. 83–88 (2006).
2. Gresham D., Dunham M.J., Botstein D. Comparing whole genomes using DNA microarrays // Nature Reviews Genetics. V. 9. No. 4. P. 291–302 (2008).

Делись, бактерия, большая и маленькая!

Ведяйкин А. Д., Голофеева Д. М., Румянцева Н. А.

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

misterkotlin@gmail.com

Клеточное деление – одно из обязательных свойств живой материи. Даже если клетка не делится, это вовсе не означает, что это надолго и тем более хорошо для клетки. Бактериальные клетки тоже делятся. От деления зависит очень многое: если бактерия делится слишком медленно, ее потомство обгонят конкуренты или убьют враги – бактериофаги; напротив, в некоторых условиях слишком быстро делиться опасно, например в стрессовых условиях (в присутствии антибиотиков) [1].

У бактерий существует несколько механизмов деления. Наиболее известный и распространенный – деление, основанное на активности дивисомы [2]. Дивисома – это комплекс из нескольких десятков белков, которые строят перегородку между будущими дочерними клетками и таким образом осуществляют деление. В различных бактериях набор белков дивисомы может достаточно сильно различаться. Крайне важно, что белки дивисомы считаются перспективными мишенями для антибиотиков, так как контролируют важнейший процесс деления. Описано множество соединений, ингибирующих бактериальное деление [3], и не за горами появление новых антибиотиков с таким механизмом действия. Кроме деления, основанного на активности дивисомы, некоторые бактерии используют альтернативные механизмы деления.

Более подробно с данной темой вы сможете познакомиться во время нашего доклада, посвященного основам и многообразию механизмов деления бактерий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (грант президента МК-1345.2022.1.4).

1. Zou J., Peng B., Qu J., Zheng J. Are Bacterial Persisters Dormant Cells Only? // *Front. Microbiol.* 2021. 12: p. 708580.
2. Du S., Lutkenhaus J. Assembly and activation of the *Escherichia coli* divisome // *Mol. Microbiol.* 2017. 105 (2): p. 177–187.
3. Kusuma K.D., Payne M., Ung A.T., Bottomley A.L., Harry E.J. FtsZ as an Antibacterial Target: Status and Guidelines for Progressing This Avenue // *ACS Infect. Dis.* 2019. 5 (8): p. 1279–1294.

Потенциал вируса миксомы кроликов в современной терапии злокачественных новообразований

*Володина С. И.¹, Исаева А. С.^{1,2}, Порозова Н. О.¹, Колесник В. В.^{1,2},
Титов И. А.³, Юрков С. Г.³, Живодеров С. П.³, Малоголовкин А. С.^{1,4}*

¹ *Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова, Москва, Россия*

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

³ *Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, п. Вольгинский, Владимирская обл., Россия*

⁴ *Научно-технологический университет «Сириус», пгт. Сириус, Краснодарский край, Россия*

soff.minkoff@gmail.com

Современная терапия злокачественных новообразований обладает большим перечнем подходов. Наряду с классическими методами (химиотерапия, радиотерапия, хирургическое удаление) применяется активация иммунного ответа на раковые клетки (иммунотерапия), но подход не действует, если на поверхности клетки нет рецептора, на который направлена терапия [1].

Проблемы лечения опухолей могут быть решены применением онколитиков. Онколитики – это генетически модифицированные или природные ослабленные вирусы, способные разрушить раковые клетки и активировать иммунную систему пациента, не повреждая здоровые клетки. В настоящее время уделяется внимание семейству *Poxviridae*. Один из представителей семейства – вирус миксомы кроликов (MYXV). Некоторые характеристики MYXV делают его перспективным онколитиком [2–6].

Нами проверена онколитическая активность MYXV (изолят В-82) на раковых клеточных линиях В16F10, MCF7, SK-Mel, HepG2. Для сравнения проведен анализ вируса везикулярного стоматита (VSV Indiana). ЦПД и накопление вируса анализировали методами микроскопического анализа, РТ-ПЦР и титрованием по TCID₅₀. Для контроля РТ-ПЦР получена плаزمид, содержащая фрагмент гена *SERP2*, который используется для детекции вируса [7]. Метаболические изменения в клетках, вызванные инфекцией, анализировали проведением МТТ-теста. Процент выживаемости клеток через 72 ч после заражения в среднем составлял 10–30 % от контрольных значений. Полученные данные подтверждают накопление и онколитическую активность MYXV на культурах клеток.

Нами проведено полногеномное секвенирование MYXV изолята В-82 на платформе DNBSEQ [8]. Далее запланировано получение рекомбинантного

МУХV с усиленной онколитической активностью. В качестве области рекомбинации выбран участок M061R/M062R, не кодирующий гены, необходимые для размножения вируса.

Работа выполнена при поддержке Программы академического лидерства «Приоритет 2030», предложенной ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет).

1. Baxevanis C.N., Perez S.A. Papamichail M. Cancer immunotherapy // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 46 (4) (2009).
2. Taxonomy of Viruses ICTV. URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> Origin and Evolution of Viruses / ed. E. Domingo, C.R. Parrish, J.J. Holland. 2nd ed. Academic Press. P. 431–446 (2008).
3. Pisklakova A., McKenzie B., Zemp F. et al. M011L-deficient oncolytic myxoma virus induces apoptosis in brain tumor-initiating cells and enhances survival in a novel immunocompetent mouse model of glioblastoma // Neuro Oncol. 18 (8) (2016).
4. Lun X., Alain T., Zemp F.J. et al. Myxoma Virus Virotherapy for Glioma in Immunocompetent Animal Models: Optimizing Administration Routes and Synergy with Rapamycin // Cancer Res. 70 (2) (2010).
5. Liu J., Wennier S., McFadden G. The immunoregulatory properties of oncolytic myxoma virus and their implications in therapeutics // Microbes Infect. 12 (14–15) (2010).
6. Zemp F.J., Lun X., McKenzie B.A. et al. Treating brain tumor-initiating cells using a combination of myxoma virus and rapamycin // Neuro Oncol. 15 (7) (2013).
7. Albini S., Sigrist B., Güttinger R. et al. Development and validation of a Myxoma virus real-time polymerase chain reaction assay // J. Vet. Diagn. Invest. 24 (1) (2012).
8. Rao J., Peng L., Liang X. et al. Performance of copy number variants detection based on whole-genome sequencing by DNBSEQ platforms // BMC Bioinformatics 21, 518 (2020).

Синтетические кортикотропины и ГАМК-рецепторная система клеток головного мозга крысы – прямые и отсроченные эффекты

Вьюнова Т. В., Шевченко К. В., Андреева Л. А., Мясоедов Н. Ф.

НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва, Россия

vyunovatv@img.msk.ru

Воздействие неожиданных и неблагоприятных сил (стрессовых факторов) вызывает в организме различные реакции, необходимые для повышения вероятности выживания в новых условиях. Неспособность сформировать адаптацию и справиться со стрессом приводит к развитию различного рода физиологических, психологических и когнитивных расстройств, включая депрессию и тревогу. Основные центральные эффекторы системы стресса в значительной степени взаимосвязаны и включают, помимо прочего, пептиды, полученные из проопиомеланокортина. Ряд коротких синтетических биологически активных пептидов, полученных из адренкортикотропного гормона (АКТГ), также относят к указанному выше семейству.

Нами были синтезированы обогащенные С-концевым PGP кортикотропины: АСТН(4-7)PGP, АСТН(6-9)PGP и АСТН(7-10)PGP, а также тетрапептид Pro-Gly-Pro-Leu. Все указанные пептиды являются биологически активными, что было показано в поведенческих тестах, а также при анализе изменений транскриптома клеток головного мозга подопытных животных. Мы проанализировали способность этих пептидов влиять на ГАМК-рецепторную систему клеток головного мозга крыс в норме (аллостерическое влияние), а также в норме и после острого соматосенсорного стресса (отставленные во времени эффекты).

Все изученные пептиды влияли на связывание [³H]-ГАМК по-своему. Отсроченный эффект стресса либо предварительного введения каждого из изученных пептидов на связывание [³H]-ГАМК был различным для его специфических сайтов с высокой и низкой аффинностью. Сам стресс, а также стресс и пептиды вместе взятые вызывали снижение связывания [³H]-ГАМК в его низкоаффинном сайте и не влияли на высокоаффинный сайт. По-видимому, регуляторный эффект действия исследуемых пептидов на ГАМК-рецепторную систему клеток головного мозга не всегда является следствием прямого аллостерического влияния пептида на рецептор, а может быть опосредован отставленными во времени биохимическими изменениями в функционально связанных группах клеток-мишеней.

рН-зависимая модификация аптамера AS1411 к белку нуклеолину

Габрусёнок П. В., Соколов П. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

p.v.gabrusenok@gmail.com

Адресная доставка противораковых препаратов в определенные ткани и клетки является важнейшей и до конца не решенной проблемой, стоящей перед медициной. Эту проблему могут решить ДНК-аптамеры к специфичным для раковых клеток белкам [1]. Иммуногенность и множественные побочные реакции могут быть снижены за счет тонкой подстройки активности аптамера под среду в раковых тканях. Важным маркером раковых тканей является нарушение в них кислотности, что можно использовать для регуляции аффинности аптамера к белкам-мишеням. В данной работе показан способ, позволяющий модулировать активность аптамера AS1411 к белку нуклеолину [2] в зависимости от рН-среды. В здоровых клетках нуклеолин обнаруживается преимущественно в ядре, в то время как в раковых клетках он присутствует на клеточной стенке и в цитоплазме [3]. Данное свойство позволяет использовать нуклеолин в качестве маркера для точечной доставки терапевтических средств в раковые ткани [4, 5]. Представленный здесь метод заключается в добавлении к нуклеотидной последовательности аптамера некоторой регуляторной последовательности, меняющей сродство аптамера к мишени в определенном диапазоне рН. Данный подход был ранее апробирован на примере аптамера к аденозинтрифосфату (АТФ) [6]. Данный подход был усовершенствован, и продемонстрирована применимость метода разработки рН-чувствительного аптасерсора, позволяющего исключить использование целевого белка из экспериментов *in vitro* в случае с консервативными аптамерами (такими как AS1411).

Исходный аптамер AS1411 был дополнен интерферирующим с последовательностью аптамера участком, который за исключением одной пары А·G комплементарен к его концевому участку. Понижение рН приводит к протонированию пары А·G, при этом стабильность дуплекса возрастает [7]. Повышение стабильности дуплекса уменьшает фракцию функциональных аптамеров, и наоборот. Оценку стабильности дуплекса проводили методом конкурентного связывания сигнальных олигонуклеотидов с интерферирующим участком. В случае отсутствия гибридизации интерферирующего участка и участка аптамера дополненная последовательность AS1411 принимает «рабочую» конформацию аналогично тому, как это происходит для исходного аптамера AS1411 (показано методом спектрофотометрического плавления).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-25-00302.

1. Ireson C.R., Kelland L.R. Discovery and development of anticancer aptamers // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006. V. 5. No. 12. P. 2957–2962.
2. Bie L. et al. Insights into the binding mode of AS1411 aptamer to nucleolin // *Front. Mol. Biosci. Frontiers Media S.A.* 2022. V. 9.
3. Mongelard F., Bouvet P. Nucleolin: a multiFACeTed protein // *Trends Cell Biol. Trends Cell Biol.* 2007. V. 17. No. 2. P. 80–86.
4. Mosafer J. et al. Study and evaluation of nucleolin-targeted delivery of magnetic PLGA-PEG nanospheres loaded with doxorubicin to C6 glioma cells compared with low nucleolin-expressing L929 cells // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. Elsevier Ltd.* 2016. V. 72. P. 123–133.
5. Brignole C. et al. Cell surface Nucleolin represents a novel cellular target for neuroblastoma therapy // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. BioMed Central Ltd.* 2021. V. 40. No. 1. P. 1–13.
6. Thompson I.A.P. et al. Rational design of aptamer switches with programmable pH response // *Nature Communications*. 2020. V. 11. No. 1. P. 1–7.
7. Lee J.A., Derosa M.C. A pH-driven DNA switch based on the A+·G mispair // *Chemical Communications. The Royal Society of Chemistry*. 2010. V. 46. No. 3. P. 418–420.

Изучение механизмов активации рецептора инсулина (IR) с использованием мутантных форм рецептора

Гавриленкова А. А.^{1,2}, Деев И. Е.², Бочаров Э. В.², Серова О. В.²

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

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

gavrilenkova.aa@phystech.edu

Рецепторные тирозинкиназы (RTKs) играют ключевую роль в процессах развития, дифференцировки, пролиферации и миграции клеток [1]. В отличие от других рецепторных тирозинкиназ представители семейства рецептора инсулина в неактивном состоянии образуют димеры [2]. На данный момент точные механизмы конформационных изменений при активации рецепторов семейства рецептора инсулина полностью не изучены. Предполагается, что в неактивном состоянии ТМ-домены рецептора инсулина находятся в конформации, препятствующей взаимодействию цитоплазматических частей молекулы [3]. При связывании лиганда конформация рецептора меняется, внутриклеточные тирозинкиназные домены сближаются и фосфорилируют друг друга, вызывая клеточный ответ.

Для изучения механизмов активации рецептора инсулина (IR) нами были получены плазмиды, кодирующие мутантные формы рецептора, содержащие двойные и одиночные замены в ТМ-домене. Далее мутантные формы рецептора инсулина экспрессировали в клетках HEK293, клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота с антителами к общей и фосфорилированной форме IR. В результате мы показали, что мутации F956E-S957R, I960E-G961R не влияли на характер активации рецептора. Замены I951E-F952R, I951E и F952R приводили к фосфорилированию рецептора в отсутствие лиганда, в отличие от рецептора дикого типа, который фосфорилируется только в присутствии инсулина.

Нами было установлено, что автофосфорилирование рецептора IR с заменами I951E-F952R; I951E и F952R в отсутствие инсулина приводит к активации внутриклеточных сигнальных белков IRS-1 и ERK. Это свидетельствует о том, что данные замены в трансмембранном домене IR, вероятно, приводят к образованию функционально активного димера рецептора в отсутствие лиганда.

Таким образом, трансмембранный домен играет важную роль в активации рецептора инсулина, и даже точечные аминокислотные замены в его

последовательности могут привести к образованию функционально активного димера.

Исследования поддержаны Российским научным фондом (грант № 19-74-30014).

1. Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases // Cell. 2010, 141 (7): 1117–34.
2. De Meyts P. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? // Trends Biochem. Sci. 2008, 33, 376–384.
3. Bocharov E.V., Sharonov G.V., Bocharova O.V., Pavlov K.V. Conformational transitions and interactions underlying the function of membrane embedded receptor protein kinases // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2017, 1859 (9 Pt A), 1417–1429.

Структурные исследования комплекса фактора созревания рибосомы P (RimP) с 30S-субъединицей из *Staphylococcus aureus*

Гараева Н. С.^{1,2}, Бикмуллин А. Г.¹, Фатхуллин Б. Ф.³, Валидов Ш. З.²,
Юсупов М. М.^{2,3}, Усачев К. С.²

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

³ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

natalia_pavlova5@mail.ru

Staphylococcus aureus является одним из основных патогенов человека, он относится к числу наиболее известных причин внутрибольничных бактериальных инфекций. *S. aureus* способен быстро приобретать резистентность к антибиотикам. Эта способность подтверждает необходимость разработки новых противомикробных агентов, которые будут замедлять или останавливать синтез и выделение его факторов патогенности, то есть будут действовать против макромолекулярного комплекса, осуществляющего синтез белка в клетке – рибосомы.

Биогенез рибосомы – это жестко регулируемый многоступенчатый процесс, в котором участвует ряд белковых факторов. Их специфические и переходные взаимодействия с зарождающимися пре-рРНК и рибосомными белками необходимы для сборки рибосомных частиц. Даже небольшие дефекты в биогенезе рибосомы ведут к ошибкам в трансляции и вызывают тяжелые фенотипы с тяжелыми нарушениями до гибели клеток. К факторам данного ряда относят RimP (Ribosomematuration factor) – фактор созревания рибосомы P. RimP связывается с несозревшей 30S-субъединицей, стабилизируя конформацию рРНК, тем самым обеспечивает правильное созревание рибосом.

В рамках данной работы нами были подобраны и оптимизированы условия экспрессии белка RimP из *S. aureus*, установлена трехмерная структура белка RimP в растворе методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения, а также определено положение белка RimP относительно рибосомного белка s12, с которым он связывается на рибосоме, путем введения парамагнитных меток MTSL к тиольным группам цистеинов и измерения расстояния между ними методами спектроскопии ЭПР. На основе криоэлектронной микроскопии получена структура комплекса 30S-субъединицы рибосомы *S. aureus* с белком RimP с разрешением 4,6 Å (по критерию FSC = 0,143) для целой частицы 30S и 4,2 Å для тела 30S.

Исследования выполнены за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

1. Poonam B. et al. // *Biotech.* 9 (2019), 127.
2. Khusainov I. et al. // *Nucleic Acids Research.* 44 (2016), 10491.
3. Maksimova E. et al. // *Microorganisms.* 10 (2022), 747.

Действие GANT61 на опухолевые клетки в сочетании с протонным или гамма-облучением

Гарина А. В.^{1, 2, 3}, Волницкий А. В.^{1, 2}, Бурдаков В. С.^{1, 2},
Чан Н. Х.^{1, 3}, Амерканов Д. А.^{1, 2}, Пак Ф. А.^{1, 2}, Лебедев Д. В.^{1, 2},
Коневега А. Л.^{1, 2, 3}, Штам Т. А.^{1, 2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

garina_av@nrci.ru

Протонная терапия используется для лечения многих видов злокачественных опухолей. Благодаря свойствам протонов можно облучать опухоли, труднодоступные для хирургического вмешательства. Протонная терапия обладает принципиальным клиническим преимуществом перед обычной фотонной терапией, связанным с характеристиками распределения глубинной поглощенной дозы протонов [1].

Глиомы – это инвазивные, быстро прогрессирующие опухоли головного мозга, которые плохо поддаются стандартной терапии. Злокачественная трансформация связана с потерей клеточной дифференцировки. Возможной причиной этого процесса является активация механизмов, поддерживающих стволоподобные свойства клеток. Показано, что сигнальный путь Sonic Hedgehog является одним из таких механизмов [2]. Поэтому растет интерес к ингибированию пути Sonic Hedgehog в сочетании с лучевой терапией [3].

Целью нашего исследования было изучение потенциала ингибитора GANT61 в качестве радиосенсибилизатора и сравнение потенциальной разницы между протонным облучением и гамма-облучением. Опухолевые клетки предварительно инкубировали с GANT61 и облучали градуированными дозами 0,5–6 Гр протонами на пике Брэгга на синхроциклотроне СЦ-1000 (энергия 200 МэВ) НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ. Клетки также облучали дозами 2–6 Гр с использованием ⁶⁰Со-источника γ -лучей «Исследователь». В другой группе экспериментов злокачественные клетки сначала облучали, затем добавляли ингибитор, чтобы продемонстрировать его аддитивный эффект. Чувствительность к излучению определяли с помощью MTS-теста и анализа колоний.

Применение ингибитора GANT61 имело слабый радиосенсибилизирующий эффект при данных типах облучения, а наблюдаемый аддитивный эффект может быть объяснен биологическим влиянием GANT61 на клеточный цикл опухолевых клеток.

*Работа выполнена в рамках государственного задания
(регистрационный номер 121060200127-6).*

1. Mohan R., Grosshans D. // Adv. Drug. Deliv. 109 (2017).
2. Dahmane N. et al. // Development. 128, 24 (2001).
3. Chiang M.F. et al. // Exp. Biol. Med. 240, 3 (2015).

Выделение и очистка белка EttA из патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* для структурных исследований

Гималетдинова А. Э.¹, Биктимиров А. Д.¹, Кучаев Е. С.¹, Валидов Ш. З.¹,
Юсупов М. М.², Усачев К. С.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии,
Илькирш-Граффенштаден, Франция

gimaletdinova_2001@mail.ru

Белки АТФ-связывающей кассеты F (ABC-F) придают устойчивость бактериям к нескольким классам клинически важных антибиотиков посредством защиты рибосом. Гены устойчивости к антибиотикам семейства ABC-F были обнаружены в многочисленных геномах и плазмидных ДНК патогенов. В совокупности они опосредуют устойчивость к более широкому спектру противомикробных агентов, чем любая другая группа белков устойчивости, и играют важную роль в клинически значимой лекарственной устойчивости патогенных бактерий. Одним из подобных белков является энергозависимый белок-переключатель трансляции A (EttA) [1, 2].

Претранслокационный рибосомный комплекс (PRE) существует в спонтанном равновесии между двумя глобальными конформационными состояниями, называемыми макросостояниями 1 и 2 (MS-I и MS-II). Это равновесие играет центральную роль в перемещении связанных мРНК и тРНК на заключительном этапе цикла элонгации. Переход от MS-I к MS-II включает вращение против часовой стрелки малой рибосомной субъединицы относительно большой рибосомной субъединицы. Это вращение связано с изменением конфигурации тРНК, связанных с рибосомой, что переводит их в гибридное состояние. Переход от состояния MS-I к MS-II осуществляется с помощью универсально-консервативного фактора трансляции EF-G, необходимого для эффективной транслокации во время цикла элонгации. АТФ-связанная форма EttA связывается с PRE-комплексом в E-сайте рибосомы, взаимодействуя с белком L1 и тРНК в P-сайте, и таким образом смещает равновесие в сторону состояния MS-I. В результате EttA ограничивает динамику компонент PRE-комплекса и снижает уровень трансляции [3].

Данная работа посвящена получению образца белка EttA патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* для структурных исследований методом рентгеноструктурного анализа. Структурный ген белка EttA из *S. aureus* был клонирован в экспрессионный вектор pet28a. Для экспрессии был использован штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Белок последовательно очищали методом аффинной хроматографии и гель-фильтрации. В результате был получен

образец белка EttA из *S. aureus* с концентрацией 20 мг/мл, стабильный при температуре 22 °С, который будет в дальнейшем использован для поиска условий кристаллизации методом диффузии водяных паров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20034).

1. Boël G., Smith P.C., Ning W. et al. The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2014. V. 21. No. 2.
2. Krishnan A., Burroughs A.M., Iyer L.M., Aravind L. Comprehensive classification of ABC ATPases and their functional radiation in nucleoprotein dynamics and biological conflict systems // *Nucleic Acids Research*. 2020. V. 1. doi:10.1093/nar/gkaa726
3. Ero R., Kumar V., Su W., Gao Y.-G. Ribosome protection by ABC-F proteins – Molecular mechanism and potential drug design // *Protein Science*. 2019. V. 28. No. 684. P. 684–693.

Анализ транскриптомных профилей листьев маслины обыкновенной (*Olea europaea*) у сортов с разной устойчивостью к промораживанию

Гладышева-Азгари М. В.¹, Цюпка С. Ю.², Цюпка В. А.², Слободова Н. В.¹, Булыгина Е. С.¹, Цыганкова С. В.¹, Шарко Ф. С.¹, Митрофанова И. В.²

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия*

² *Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Россия*

marglader@gmail.com

Маслина обыкновенная – культурное древесное растение, широко используемое в сельском хозяйстве в целях получения масла, богатого полезными нутриентами. На южном берегу Крыма в коллекции Никитского ботанического сада (НБС) находятся сорта, различающиеся по устойчивости к промораживанию. Среди них для исследования были отобраны три холодоустойчивых и три теплолюбивых сорта. Для них была выстроена схема эксперимента с отбором листьев и контролируемым промораживанием до максимальной температуры в $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ с дальнейшим подъемом температуры до контрольной точки. Образцы листьев были собраны на разных стадиях промораживания и восстановления и зафиксированы в стабилизаторе РНК. В ходе работы были получены баркодированные RNA-Seq-библиотеки, которые были секвенированы на приборе NovaSeq 6000 (Illumina, США). Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили с помощью программного пакета DESeq2. Анализ обогащения геной онтологии для дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) производился с помощью ShinyGO с использованием баз Biological Process (BP), Cellular Component (CC), Molecular Function (MF) и базы KEGG. Анализ генных путей был выполнен с помощью R-пакета GAGE на основе базы данных путей KEGG.

При сравнении ДЭГ между сортами и стадиями промораживания были обнаружены различные закономерности изменения количества ДЭГ и их представленности. На большинстве стадий отбора распределение сортов по кластерам в соответствии с их теплолюбивостью/холодоустойчивостью неравномерно: при анализе главных компонент кластеры либо смешиваются, либо данные дробятся на большее число кластеров. Единственным исключением является финальная точка восстановления, где данные можно разделить на два кластера по исследуемому признаку. Таким образом, несмотря на одинаковый конечный результат, начальная адаптация к резким заморозкам различается у сортов оливы без учета принадлежности к холодоустойчивым или теплолюбивым сортам.

Структурные исследования ГТФ-связывающего белка YsxC из *Staphylococcus aureus* методами ЯМР высокого разрешения

Глазырин М. С.^{1,2}, Рябов С. А.^{1,2}, Биктимиров А. Д.^{1,2}, Бикмуллин А. Г.¹,
Валидов Ш. З.², Гараева Н. С.^{1,2}, Юсупов М. М.^{2,3}, Усачев К. С.²

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

³ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

glazyri16m@gmail.com

Проблема устойчивости патогенных микроорганизмов к антибиотикам на данный момент стоит достаточно остро [1]. К опасным и распространенным патогенам относится золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), некоторые штаммы которого обладают множественной устойчивостью к антибиотикам (MRSA, VRSA) [2]. Этот микроорганизм чаще всего является возбудителем целого ряда инфекций сердечно-сосудистой системы [3].

Воздействовать на устойчивую к антибиотикам бактерию можно, влияя на ее белоксинтезирующий аппарат, основой которого является рибосома [4]. Биогенез рибосомы представляет собой строго определенный по последовательности событий многоступенчатый процесс, регулируемый белковыми факторами сборки, обеспечивающими сборку рибосомных субъединиц и связывание рибосомных белков. Так, белок YsxC *S. aureus* за счет гидролиза ГТФ до ГДФ способствует связыванию белков на поверхности рибосомальной 50S-субъединицы. Делеция гена *usxC* летальна для клеток *S. aureus* [6]. Таким образом, белок YsxC выполняет энергетическую и структурную функции, отвечающие за формирование рибосомы и, как следствие, за жизнедеятельность клетки. Поскольку наличие белка YsxC жизненно необходимо для клеток *S. aureus*, разработка ингибиторов, направленных на него, может дать возможность для создания новых антистафилококковых препаратов, что, в свою очередь, требует проведения структурных исследований как самого белка, так и локализации его на рибосоме.

Объектом наших исследований стал белок YsxC патогенного организма *S. aureus*. В данной работе нами были подобраны и оптимизированы условия экспрессии на минимальной среде M9, меченного по изотопам ¹⁵N белка YsxC для исследования методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения, также были зарегистрированы двумерные и трехмерные спектры ЯМР.

Исследования выполнены за счет РФФИ № 21-74-20034.

1. Subramaniam G. // The Indian Journal of Pediatrics. 87, 2020, 937.
2. Wilson D. // Nature Reviews Microbiology. 12, 2014, 35.
3. Воробьева Л. Л. // Цифровая наука. 2, 2021, 4.
4. Спирин А. С. // Соросовский образовательный журнал. 11, 1998, 65.
5. Cooper E. // BMC Microbiology. 9, 2009, 12.

Новый белковый ингибитор металлопротеаз из *Xenorhabdus nematophila*

Гольдин И. В., Чухонцева К. Н., Бердышев И. М., Демидюк И. В.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

goldinasveta@yandex.ru

Протеализинподобные протеазы (ППП) – группа цинковых металлопротеаз из семейства M4. В геномах бактерий гены ППП колокализированы с генами эмфориноподобных ингибиторов (ЭПИ), подавляющих активность ППП [1]. Однако у некоторых представителей рода *Xenorhabdus*, имеющих гены ППП, гены ЭПИ отсутствуют. Их место занимают гены гипотетических белков, гомологичных пропептидам ППП. Поскольку известно, что пропептиды протеаз играют роль внутримолекулярных ингибиторов [2], мы предположили, что эти гипотетические белки *Xenorhabdus* являются ингибиторами ППП.

Для проверки этого предположения ген гипотетического белка из *X. nematophila* ATCC19061 был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli*. Рекомбинантный белок, названный ксеноприном (Xin), был получен в электрофоретически гомогенном виде с помощью катионообменной и гельпроникающей хроматографии. Молекулярная масса Xin, определенная методом масс-спектрометрии, составила 9019,5 Да, что соответствует расчетной массе кодируемого геном пептида (9150,2 Да) без N-концевого остатка метионина (131,2 Да). Ингибирующее действие Xin было изучено по отношению к протеализину и термолизину – металлопротеазе семейства M4, не являющейся ППП, с использованием флуорогенного субстрата с внутренним тушением флуоресценции 2-аминобензоил-Arg-Ser-Val-Ile-Lys(ϵ -2,4-динитрофенил) [3, 4]. Было показано, что Xin является сильным неконкурентным ингибитором протеализина ($K_i = 6 \pm 2$ нМ), однако не способен подавлять активность термолизина.

Таким образом, Xin является селективным ингибитором ППП, а произошедшая у бактерий рода *Xenorhabdus* замена гена ЭПИ на ген ингибитора, гомологичного пропептидам ППП, по-видимому, свидетельствует о необходимости ассоциации ППП с ингибитором для реализации биологических функций.

Важно подчеркнуть, что Xin является первым обнаруженным пропептидподобным белковым ингибитором металлопротеаз. Ранее такие ингибиторы были известны только для сериновых и цистеиновых протеаз.

1. Chukhontseva K.N. et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* 169 (2021).
2. Demidyuk I.V. et al. // *Biomol. Concepts.* 1, 3–4 (2010).
3. Karaseva M.A. et al. // *Sci. Rep.* 9, 1 (2019).
4. Berdyshev I.M., Karaseva M.A., Demidyuk I.V. // *Bio. Protoc.* 12, 19 (2022).

Выяснение свойств белков FtsZ микоплазм

Голофеева Д. М., Румянцева Н. А., Ведяйкин А. Д.

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

golofeevad@gmail.com

Бактерии класса *Mollicutes* (микоплазмы) являются минимальными клетками, способными к росту на искусственной питательной среде [1]. Многие микоплазмы живут и размножаются в клетках эукариот, являясь опасными патогенами. Многие отличает микоплазм от других известных видов бактерий: микоплазмы не имеют клеточной стенки, их геном сильно редуцирован, метаболические пути и другие процессы значительно упрощены. Именно поэтому молекулярные механизмы, обеспечивающие многие базовые процессы, протекающие на протяжении жизненного цикла данных клеток, представляют значительный интерес для исследования, в их числе и механизм деления. При этом белки-участники процесса деления бактериальной клетки считаются перспективными мишенями для антимикробных препаратов [2].

Деление представителей большинства изученных видов бактерий начинается со сборки Z-кольца, формируемого полимерами белка FtsZ в сайте деления [3]. Данный белок управляет работой молекулярной машины – дивисомы, которая осуществляет синтез клеточной стенки между дочерними клетками. Гены, кодирующие компоненты дивисомы, в основном располагаются в пределах кластера *dcw* (Division and Cell Wall). Данный кластер у микоплазм сильно редуцирован, однако ген-гомолог *ftsZ* представлен в кластере *dcw* многих микоплазм. При этом до сих пор неизвестно, формирует ли белок FtsZ в клетках микоплазм структуры из полимеров, а следовательно, неясно, какую именно роль белок FtsZ играет в жизненном цикле микоплазм.

В данной работе рассмотрены свойства белков FtsZ фитопатогена *Acholeplasma laidlawii* и патогена птиц *Mycoplasma gallisepticum*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 22-24-00085.

1. Борхсениус С. Н., Чернова О. А., Чернов В. М., Вишняков И. Е. Микоплазмы в биологии и медицине начала XXI века. СПб.: Наука, 2016. 333 с.
2. Naclerio G.A., Sintim H.O. Multiple ways to kill bacteria via inhibiting novel cell wall or membrane targets // *Future Medicinal Chemistry*. 2020. No. 13 (12). P. 1253–1279.
3. Haeusser D.P., Margolin W. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring // *Nature Reviews Microbiology*. 2016. V. 14. No. 5. P. 305–319.

**Разработка хемилюминесцентного сенсора
на основе пероксидазоподобных дезоксирибозимов
для детекции нуклеиновых кислот**

*Горбенко Д. А., Филатов П. В., Палехова А. В., Афанасьева А. В.,
Березовская М. Ю., Дададжанов Д. Р.*

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

gorbenko@scamt-itmo.ru

На сегодняшний день остро стоит проблема создания диагностических тестов для развивающихся стран и ограниченных условий тестирования, которые должны удовлетворять критериям Всемирной организации здравоохранения ASSURED [1]. Их можно резюмировать следующим образом:

- 1) чувствительные,
- 2) специфичные,
- 3) удобные для пользователя,
- 4) быстрые,
- 5) надежные,
- 6) не требующие оборудования и доставляемые конечным пользователям.

Однако доступный коммерческий аппарат для детекции определенных нуклеиновых кислот (НК), а не белковых фракций на месте оказания медицинской помощи приобрести невозможно.

Детекция НК носит важный клинический смысл: во-первых, является более специфичной и точной; во-вторых, выявляет многие заболевания на ранней стадии в отсутствие каких-либо симптомов; в-третьих, предполагает детекцию не только патогенных нуклеиновых кислот, но и распознавание генетических мутаций.

Таким образом, проблема, на решение которой направлена данная работа, – это разработка методики по детекции образцов НК и интеграция их в существующие системы регистрации сигнала для условий на месте оказания медицинской помощи (так называемая диагностика point-of-care).

В представленном исследовании использована комбинация последних разработок химической технологии для распознавания нуклеиновых кислот, а также поиска одонуклеотидных замен. Была разработана пероксидазоподобная мультикомпонентная система (PxDm) [2]. Данная структура представляет собой два аналитсвязывающих плеча, иммобилизованных вокруг общей короткой ДНК-платформы. При гибридизации с целевым аналитом следует связывание гемина пероксидазоподобным дезоксирибозимом с образованием биокатализатора генерации

хемилюминесценции в присутствии H_2O_2 и люминола. В качестве целевой последовательности был выбран участок РНК патогенного микроорганизма *Staphylococcus aureus*.

Предложенная система используется в комбинации с микрофлюидным чипом, внедренным в компактный высокоточный счетчик фотонов H11890 (Hamamatsu) [3]. В перспективе данная разработка может использоваться в больницах и при последующей минитюаризации – на дому.

1. Kettler H., White K., Hawkes S. UNICEF/UNDP/World Bank/WHO (2004).
2. Gorbenko D.A., Shkodenko L.A. et al. // Chem. Com. 58, 36 (2022).
3. Sapunova A., Dadadzhanov D. et al. // Proc. SPIE 12131, Nanophotonics IX, 1213104 (2022).

Структурные исследования нуклеоидассоциированных белков методом малоуглового рентгеновского рассеяния

Гордиенко А. М.^{1,2}, Штыкова Э. В.², Петухов М. В.^{2,3}, Дадинова Л. А.²

¹ *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
физический факультет, Москва, Россия*

² *Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография
и фотоника» РАН, Москва, Россия*

³ *Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва,
Россия*

alex.gor99@mail.ru

Устойчивость бактерий к антибактериальным препаратам является масштабной угрозой, затрагивающей здоровье людей по всему миру [1]. Важнейшую роль в защите геномной ДНК выполняют специфические нуклеоид-ассоциированные белки. Они необходимы для связывания и защиты ДНК в бактериальных клетках в различных стрессовых состояниях. Одними из самых распространенных нуклеоидассоциированных белков, выделяющихся в стационарной фазе роста бактерий, являются интеграционный фактор хозяина (IHf) [2] и ферритиноподобный ДНК-связывающий белок (Dps) [3]. Актуальность работы обусловлена необходимостью ответа на многие нерешенные вопросы, затрагиваемые в вопросах устойчивости бактерий к антибиотикам, что особенно важно в практическом применении результатов.

Целью научного исследования являлось изучение структурных особенностей нуклеоид-ассоциированных бактериальных белков в различных условиях, сопровождаемых стрессовыми воздействиями. При использовании комбинации методов малоуглового рентгеновского рассеяния с аномальным малоугловым рентгеновским рассеянием были изучены подробные характеристики различных стадий образования ионов железа во внутренней полости белка Dps, а также исследована структура геном-ассоциированного белка IHf в условиях, близких к физиологическим.

Из анализа данных аномального малоуглового рентгеновского рассеяния (АМУРР) белка Dps в растворе, нагруженном железом, было показано, что атомы железа образуют компактную структуру во внутренней полости белка Dps и заполнение внутренней полости белка происходит неравномерно. Структура геном-ассоциированного белка IHf была исследована методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Были определены основные структурные характеристики белка, и также был изучен процесс олигомеризации белка в растворе. Полученные результаты демонстрируют современные возможности МУРР и компьютерного моделирования на основе экспериментальных данных в исследованиях структуры сложных белковых объектов и могут быть

использованы для дальнейших работ в области биосинтеза частиц и практического применения в нанобиотехнологиях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 18-74-10071.

1. Wolf S.G., Frenkiel D. et al. // Nature. 400, 83–85 (1999).
2. Dame R.T. // Mol. Microbiol. 56, 858–870 (2020).
3. Dadinova L.A., Chesnokov Yu.M. et al. // FEBS Lett. 593 (12), 1360–1371 (2019).
doi:10.1002/1873-3468.13439

Влияние терморубина на цикл элонгации прокариотической трансляции

Грачев А. А.^{1,2}, Толичева О. А.¹, Полесскова Е. В.^{1,2}, Коневега А. Л.^{1,2,3}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

grachev_aa@npfi.nrcki.ru

Биосинтез белка, проходящий на рибосомах с вовлечением большого количества белков и молекул РНК, – это сложноорганизованный многостадийный процесс, критически важный для жизнедеятельности организмов. Для прокариотической клетки нарушение любого из этапов синтеза может оказаться фатальным, поэтому система трансляции является мишенью для многих антибактериальных препаратов [1]. При этом повсеместное применение антибиотиков, зачастую излишнее, приводит к снижению их терапевтической эффективности вследствие развития и распространения устойчивых штаммов бактерий. Поэтому поиск новых природных и синтетических соединений с антибактериальной активностью, а также объяснение их механизмов действия являются одной из наиболее актуальных задач науки о жизни.

Терморубин – низкомолекулярный метаболит *Thermoactinomyces antibioticus*, нарушающий функционирование системы биосинтеза белка как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [2]. Впервые он был описан более 50 лет назад [3], но его точный молекулярный механизм действия до сих пор неизвестен.

Целью данной работы являлось изучение влияния терморубина на скорость и эффективность реакций цикла элонгации бактериального синтеза белка. С использованием реконструированной *in vitro*-системы трансляции *Escherichia coli* мы показали, что добавление терморубина негативно влияет на цикл элонгации. Для терморубинсодержащих рибосомных комплексов было продемонстрировано снижение скорости аккомодации аминоацил-тРНК в А-сайт, снижение эффективности образования первой пептидной связи и повышение скорости транслокации пептидил-тРНК из А-айта в Р-сайт. Также показано, что связывание терморубина снижает сродство пептидил-тРНК к А-сайту рибосомы. Суммируя с тем, что терморубин вызывает изменение положения оснований А1913 и С1914 23S рРНК, участвующих во взаимодействии между рибосомой и тРНК [4], можно предположить, что механизм действия данного антибиотика связан с нарушением метастабильного взаимодействия тРНК и А-сайта транслирующей рибосомы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00278).

1. Arenz S., Wilson D.N. Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition // Cold spring harbor perspectives in medicine. – 2016. – V. 6. – No. 9. – P. a025361.
2. Pirali G. et al. Inhibition of peptide chain initiation in *Escherichia coli* by thermorubin // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis. – 1974. – V. 366. – No. 3. – P. 310–318.
3. Craveri R. et al. Thermorubin, a new antibiotic from a thermoactinomycete // Clin. Med. Winnetka, Ill. – 1964. – V. 71. – No. 3. – P. 511–521.
4. Bulkley D., Johnson F., Steitz T.A. The antibiotic thermorubin inhibits protein synthesis by binding to inter-subunit bridge B2a of the ribosome // Journal of Molecular Biology. – 2012. – V. 416. – No. 4. – P. 571–578.

**Избирательное нарушение кальциевой сигнализации
как основа селективной уязвимости нейронов в пациентспецифичных
моделях полиглутаминовых нейродегенеративных заболеваний**

Грехнёв Д. А.¹, Новикова Ю. В.¹, Ошколова А.¹, Крисанова А. В.¹,
Беликова Л. Д.^{2, 3}, Ключников С. А.^{1, 4}, Лебедева О. С.²,
Казначеева Е. В.¹, Вигонт В. А.¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
им. акад. Ю. М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Научный центр неврологии, Москва, Россия

dima.grehnyov@yandex.ru

Разные нейродегенеративные заболевания характеризуются уникальным паттерном гибели нейронов. Однако вопрос, почему при определенном заболевании одни нейроны массово гибнут, а другие остаются практически не вовлеченными в нейродегенерацию, остается открытым.

Наша лаборатория на протяжении многих лет занимается изучением кальциевой сигнализации в норме и при патологиях и в настоящий момент разрабатывает кальциевую гипотезу селективной уязвимости нейронов [1–6]. Благодаря использованию пациент-специфичных моделей, полученных на основе технологии направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в разные типы нейронов, кальциевая гипотеза получила новый импульс развития. Используя методы пэтч-кламп в конфигурации регистрации токов со всей плазматической мембраны клетки и флуоресцентный кальциевый имиджинг, мы охарактеризовали потенциал- и депоуправляемые токи кальция в нейронах с разной степенью уязвимости у пациентов с болезнью Хантингтона (БХ) и спиноцеребеллярной атаксией 17-го типа (СЦА17). Мы показали выраженное увеличение потенциал- и депоуправляемого входа кальция в ГАМК-ергических нейронах пациентов с БХ и СЦА17, для которых, согласно клиническим данным, характерна массовая гибель указанных нейронов. Напротив, в дофаминергических нейронах, гибель которых нехарактерна для пациентов с БХ и СЦА17, мы не наблюдали выраженных нарушений депоуправляемого входа кальция.

Таким образом, нарушение депоуправляемого входа кальция, вероятно, может лежать в основе избирательной гибели нейронов при БХ и СЦА17.

Работа поддержана грантами РНФ № 22-14-00218 и Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1075 от 28 сентября 2021 г., 415/21–23).

1. Nekrasov E.D., Vigont V.A. et al. Manifestation of Huntington's Disease Pathology in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons // *Mol. Neurodegener.* 2016 11: 27.
2. Vigont V., Nekrasov E. et al. Patient-Specific iPSC-Based Models of Huntington's Disease as a Tool to Study Store-Operated Calcium Entry Drug Targeting // *Front. Pharmacol.* 2018 9: 696.
3. Vigont V.A., Grekhnev D.A. et al. STIM2 Mediates Excessive Store-Operated Calcium Entry in Patient-Specific iPSC-Derived Neurons Modeling a Juvenile Form of Huntington's Disease // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021 9: 625231.
4. Grekhnev D.A., Kaznachejeva E.V., Vigont V.A. Patient-Specific iPSCs-Based Models of Neurodegenerative Diseases: Focus on Aberrant Calcium Signaling // *Int. J. Mol. Sci.* 2022 23: 624.
5. Grekhnev D.A., Novikova I.V. et al. Dithiadiazole Derivative 3-(4-Nitrophenyl)-5-Phenyl-3H-1,2,3,4-Dithiadiazole-2-Oxide – Novel Modulator of Store-Operated Calcium Entry // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022 626: 38–43.
6. Grekhnev D.A., Kruchinina A.A. et al. The Mystery of EVP4593: Perspectives of the Quinazoline-Derived Compound in the Treatment of Huntington's Disease and Other Human Pathologies // *Int. J. Mol. Sci.* 2022 23: 15724.

Нарушение возрастной динамики развития гиппокампа крыс после фебрильных судорог

Грифлюк А. В., Постникова Т. Ю., Зайцев А. В.

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

Griflyuk.AI@mail.ru

Фебрильные судороги (ФС) – неврологическое нарушение раннего возраста [1], когда идут процессы созревания нервной системы [2, 3]. ФС могут привести к нарушениям развития мозга и, в частности, гиппокампа – одной из наиболее уязвимых структур при данной патологии [4].

Цель – изучение морфофункциональных изменений в гиппокампе крыс после ФС.

Самцы крыс Вистар в возрасте 10 дней подвергались воздействию высокой температуры окружающего воздуха, что приводило к повышению температуры тела и развитию ФС. Контрольная группа – животные, которые на аналогичное время были отлучены от самки. На гистологических срезах (20 мкм) мозга животных двух возрастных групп (12 и 21 день) непрямым иммуногистохимическим методом определяли экспрессию кислого глиального фибриллярного белка (GFAP) в гиппокампе. На переживающих срезах (400 мкм) мозга животных трех возрастных групп (12, 21 и 55 дней) были изучены параметры долговременной синаптической потенциации (ДВП).

У животных в возрасте 12 дней ДВП нестабильна, что характерно для данного возраста. У животных после ФС в возрасте 21 дня и 55 дней ДВП достоверно снижена по сравнению с контрольной группой. Также у животных экспериментальной группы в возрасте 21 дня ДВП нестабильна, т. е. ход кривой ДВП после стимуляции такой же, как у животных в возрасте 12 дней. У животных после ФС в возрасте 12 дней процент площади, занимаемой GFAP-положительными объектами, не отличается от значений контрольной группы. Но к 21 дню жизни у контрольных животных данное значение увеличивается, что связано с морфологическими изменениями астроцитов в период развития нервной системы. При этом у экспериментальных животных площадь, занимаемая GFAP-положительными объектами, меньше, чем у контрольных животных.

Таким образом, ФС вызывают задержку функционального созревания гиппокампа. У крыс в возрасте 21 дня характеристики ДВП такие же, как у животных в возрасте 12 дней. Эти изменения сопровождаются замедлением морфологического развития астроцитов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-25-00143.

1. Leung A.K.C., Hon K.L., Leung T.N.H. Febrile Seizures: an Overview // *Drugs in Context*. 2018. No. 7. P. 1–12.
2. Isomura Y., Kato N. Action Potential–Induced Dendritic Calcium Dynamics Correlated with Synaptic Plasticity in Developing Hippocampal Pyramidal Cells // *J. Neurophysiol.* 1999. No. 82. P. 1993–1999.
3. Catalani A. et al. Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactive Astrocytes in Developing Rat Hippocampus // *Mechanisms of Ageing and Development*. 2002. No. 123. P. 481–490.
4. Dubé C. et al. Cognitive Dysfunction after Experimental Febrile Seizures // *Experimental Neurology*. 2009. 215 (1). P. 167–177.

Влияние анакинры на когнитивные и психоэмоциональные нарушения у крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии

Грязнова М. О., Дёмина А. В., Шварц А. П., Зайцев А. В.

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

Russanarino@gmail.com

Введение. Эпилепсия – неврологическое заболевание, сопровождаемое снижением когнитивных функций и психоэмоциональными расстройствами [1, 2]. Выявлено, что противовоспалительная терапия может частично подавлять развитие эпилепсии [3].

Цель. Оценить влияние противовоспалительной терапии в период эпилептогенеза на когнитивные и психоэмоциональные нарушения и экспрессию генов-маркеров нейровоспаления в мозге крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии.

Материалы и методы. Исследование проводилось на 7-недельных самцах крыс Вистар. В латентный период эпилептогенеза крысам ежедневно вводился рекомбинантный антагонист рецептора IL-1 («Анакинра», 100 мг/кг). Оценивали выживаемость, динамику набора веса, проводили тесты «открытое поле», «лабиринт Барнса», тест предпочтения раствора сахарозы, тест на условно-рефлекторное замирание. Оценивалась экспрессия генов *Aif1* и *Nlrp3* в дорзальном гиппокампе мозга крыс.

Результаты. Выживаемость крыс составила 60 % вне зависимости от наличия терапии. Применение анакинры не повлияло на динамику веса, двигательную гиперактивность крыс (тест «открытое поле»), ослабление пространственной памяти («лабиринт Барнса»), но скорректировало нарушение долговременной памяти в тесте на условно-рефлекторное замирание и проявление ангедонии в тесте предпочтения раствора сахарозы.

Обнаружена разница между уровнем относительной экспрессии генов *Aif1* и *Nlrp3* у экспериментальной и контрольной групп, но не у группы, получавшей лечение.

Выводы. Терапия анакинрой приводит к снижению ангедонии в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии, а также способствует сохранению долговременной памяти, но не влияет на нарушения пространственной. Таким образом, противовоспалительная терапия в латентный период эпилептогенеза частично подавляет когнитивные и психоэмоциональные нарушения, сопутствующие эпилепсии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-15-00430.

1. Stafstrom C.E., Carmant L. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists // *Cold Spring Harb. Lab. Press* 5 (6), a022426 (2015).
2. Holmes G.L. Cognitive impairment in Epilepsy: The Role of Network Abnormalities // *Epileptic Disord.* 17 (2), 101–116 (2015).
3. Dyomina A.V et al. Anakinra Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection, and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy // *Pharmaceuticals* 13 (11), 340 (2020). doi:10.3390/ph13110340

Поиск новых РНК-управляемых нуклеаз на основе анализа (мета)геномных данных, получение доказательств их функциональности

Гуницева Н. М., Евтеева М. А., Борисова А. А.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

natgunitseva@gmail.com

Система CRISPR-Cas представляет собой врожденную адаптивную иммунную систему бактерий и архей. Эта иммунная система помогает им противостоять инвазии фагов и чужеродной ДНК. Благодаря многочисленным преимуществам, таким как простота использования, низкая стоимость, высокая эффективность, хорошая точность и широкий спектр приложений, система CRISPR-Cas стала наиболее используемой технологией редактирования генома [1]. Данная система обеспечивает надежную платформу для генетических манипуляций, которая имеет большой потенциал для различных применений в биотехнологии и медицине [2]. На сегодняшний день неизвестно универсально пригодных систем CRISPR-Cas для решения различных задач биоинженерии. В этой связи поиск новых инструментов редактирования генома и изучение их свойств является актуальной задачей.

В нашей лаборатории был найден, получен и успешно тестируется ряд РНК-управляемых нуклеаз различных семейств, включая РНК-управляемые РНК-нуклеазы. Благодаря биоинформатическому анализу (мета)геномных данных были найдены CRISPR-локусы, содержащие последовательности предполагаемых нуклеаз и соответствующих направляющих РНК. После выделения и очистки белков проводилась оценка их активности в различном диапазоне температур, исследовалось влияние различных катионов на их активность, проводилось исследование кинетики расщепления матрицы. После оценки эффективности нуклеаз и подбора оптимальных условий для их работы *in vitro* все полученные нуклеазы тестируются на возможность внесения изменений в геном клеток человека, в том числе внесение делеций в различные участки генома клеток HEK293T. Дальнейшее тестирование успешно прошедших отбор нуклеаз планируется выполнить на растениях и рыбах, что позволит увеличить область дальнейшего применения новых нуклеаз. Также тестируемые РНК-управляемые РНК-нуклеазы могут быть использованы при создании тест-систем и редактировании растений.

Технология CRISPR-Cas действительно является удобным и относительно простым в использовании инструментом редактирования, имеющим широкий спектр потенциальных применений, но в то же время

существует ряд нерешенных проблем, таких как off-target-эффекты, которые требуют тщательного исследования и решения.

1. Huang Y.Y. et al. Development of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Technology for Potential Clinical Applications // World Journal of Clinical Cases. 2022. V. 10. No. 18. P. 5934.
2. Jedrzejczyk D. et al. CRISPR-Cas12a Nucleases Function with Structurally Engineered crRNAs–Synthetic tracrRNA. 2021.

Роль тиоредоксинредуктазы в ответе плюрипотентных стволовых клеток человека на окислительный стресс различной интенсивности

Гурьев Н. А.^{1,2}, Иванова Ю. С.¹, Пуговкина Н. А.¹, Люблинская О. Г.¹

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

guriev.nik.and@gmail.com

Проокислительный сдвиг редокс-баланса, обычно определяемый термином «окислительный стресс», может вызывать различные эффекты в клетках в зависимости от его интенсивности. Чрезмерное накопление активных форм кислорода («окислительный дистресс») может вызвать повреждение ДНК, липидов и белков. Физиологический окислительный стимул («окислительный эустресс»), в свою очередь, регулирует внутриклеточный редокс-сигналинг [1]. Системы антиоксидантной защиты играют критическую роль в поддержании редокс-гомеостаза клеток, однако значение различных антиоксидантных путей в ответе плюрипотентных клеток на окислительный дистресс/эустресс остается малоизученным.

В этом исследовании мы оценили вклад антиоксидантных путей, контролируемых тиоредоксинредуктазой (TrxR), в поддержание редокс-гомеостаза индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и их дифференцированных клеток-потомков в базальных условиях, а также под действием окислительного стресса различной интенсивности. Для оценки эффективности работы антиоксидантных систем был использован генетически кодируемый биосенсор перекиси водорода HyPer [2]. Анализируя уровень окисления биосенсора в присутствии ингибиторов TrxR (ауранофин и Trt-1) с использованием разработанной в лаборатории проточно-цитометрической методики [3], мы показали, что дисфункция TrxR-зависимых ферментных систем приводит к нецитотоксическому нарушению тиолдисульфидного метаболизма как в плюрипотентных, так и в дифференцированных клетках в базальных условиях. Кроме того, используя HyPer для количественного определения внутриклеточной концентрации перекиси в клетках, подвергшихся действию внешнего окислительного стресса, мы продемонстрировали, что TrxR-зависимые пути в обеих протестированных клеточных линиях вносят вклад в работу антиоксидантных систем лишь в случае низких окислительных нагрузок, тем самым играя преимущественную роль в обеспечении ответа на физиологические редокс-стимулы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-74-20178.

1. Sies H., Berndt C., Jones D.P. Oxidative stress // *Annu. Rev. Biochem.* 2017; 86: 715–748.
2. Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A. et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nat. Methods.* 2006; 3: 281–286.
3. Zenin V., Ivanova J., Pugovkina N. et al. Resistance to H₂O₂-induced oxidative stress in human cells of different phenotypes // *Redox. Biol.* 2022; 50.

Влияние белка Rnq1 на агрегацию нуклеопоринов различных видов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*

Данилов Л. Г.¹, Антонова Е. Ю.², Трубицина Н. П.¹,
Рогоза Т. М.^{1,3}, Журавлева Г. А.^{1,4}, Бондарев С. А.^{1,4}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

lavrentydanilov@gmail.com

Ядерный поровый комплекс состоит из более чем 30 различных белков и является сложной структурой, центральная часть которой содержит белки из двух функциональных групп, а именно: структурные белки поры и белки, формирующие селективный фильтр в центре поры [1]. Ко второй группе относят нуклеопорины, которые содержат фенилаланин-глициновые повторы. Для таких нуклеопоринов описаны примеры формирования амилоидных агрегатов, среди них белок человека NUP58 [2] и дрожжевой белок Nup100 [3].

После идентификации амилоидных свойств белка NUP58 в нашей лаборатории был поставлен вопрос о широте распространения этого явления. С помощью биоинформатического анализа мы идентифицировали амилоидогенные последовательности в дрожжевых белках Nup49 и Nup57, а также Nsp1 и Nup159 и их ортологах. Важно отметить, что подобные участки мы нашли только в белках, которые располагаются непосредственно в канале ядерной поры и участвуют в образовании селективного барьера. В ходе последующих экспериментальных проверок в модельных системах нам удалось описать три потенциальных амилоида. К ним относятся Nup58 *Taeniopygia guttata*, Nup98 *Drosophila melanogaster* и Nup98 *Schizosaccharomyces pombe*.

Дрожжевой фактор [*PIN*⁺] является прионной формой белка Rnq1. Агрегаты данного белка могут выступать в роли матриц для инициации процесса изменения конформации и образования фибрилл для других амилоидов. Возможно, что агрегаты Rnq1 могут иницировать процесс агрегации нуклеопоринов.

В нашей работе мы проанализировали влияние приона [*PIN*⁺] на агрегацию нуклеопоринов других видов в дрожжевой системе. Нами было показано, что наличие фактора [*PIN*⁺] не приводит к увеличению возникновения частоты агрегатов для нуклеопоринов Nup58 *Taeniopygia guttata*, Nup98 *Drosophila*

melanogaster и Nup98 *Schizosaccharomyces pombe*. В то же время мы можем наблюдать увеличение частоты агрегации двух дрожжевых нуклеопоринов – Nup100 и Nsp1.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-24-00186.

1. Ed H., Martin B. Towards understanding nuclear pore complex architecture and dynamics in the age of integrative structural analysis // *Current Opinion in Cell Biology*. 2015. V. 34. P. 31–38.
2. Danilov L.G. et. al. The human NUP58 nucleoporin can form amyloids *in vitro* and *in vivo* // *Biomedicines*. 2021. V. 9. P. 1451.
3. Halfmann R., Wright J.J.R., Alberti S., Lindquist S., Rexach M. Prion formation by a yeast GLFG nucleoporin // *Prion*. 2012. V. 6. No. 4. P. 391.

Нарушение структуры гематоэнцефалического барьера у крыс разных возрастов с пренатальной гипергомоцистеинемией

Деттерер А. С., Яковлев А. В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

anna.detterer@gmail.com

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) – патологическое состояние, вызванное избыточным содержанием в крови гомоцистеина – серосодержащей аминокислоты [1]. Повышенное содержание гомоцистеина в кровяном русле индуцирует эндотелиальную дисфункцию в гистогематических барьерах. Целью данной работы стал анализ влияния пренатальной гипергомоцистеинемии на функцию ГЭБ, а также сравнительный анализ в двух возрастных группах. Для оценки проницаемости ГЭБ определили экстравазацию альбумина в ткани головного мозга с использованием красителя Evans blue (ЕВ, 2 мл/кг) [2]. Определение содержания красителя в гомогенате мозжечка животного осуществляли спектрофотометрически (620 нм) с использованием планшетного ИФА-ридера Multiscan FS (Thermo scientific, США) по калибровочным кривым. Анализ экспериментальных данных показал, что в контрольных условиях после внутривенного введения ЕВ не отмечалось выхода красителя за пределы церебральных сосудов. Концентрация ЕВ в гомогенате клеток мозжечка контрольной группы животных в возрасте 1,5 мес. составляла $0,1 \pm 0,04$ мкг/мг ткани ($N = 11$). Предварительное введение гомоцистеин-тиолактона вызывало увеличение проницаемости ГЭБ, и концентрация ЕВ составляла $0,4 \pm 0,2$ мкг/мг ткани ($N = 9$; $p < 0,05$). В условиях пренатальной ГГЦ и в тканях мозга потомства наблюдалось нарушение проницаемости ГЭБ [3], и содержание ЕВ в тканях мозжечка составляло $0,6 \pm 0,09$ мкг/мг ткани ($N = 8$; $p < 0,05$). В то же время у крыс экспериментальной группы в возрасте 6 мес. наблюдалось восстановление проницаемости ГЭБ, концентрация ЕВ в гомогенате мозжечка составляла $0,14 \pm 0,01$ мкг/мл ($N = 6$, $p > 0,05$) относительно контроля.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что гомоцистеин и его производные оказывают негативное влияние на проницаемость гематоэнцефалического барьера крыс в пренатальный период развития.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета («Приоритет-2030»).

1. Ansari R. et al. // J. Clin. Neurol. V. 10. No. 4. (2014).
2. Wang H.L., Lai T.W. // Sci. Rep. V. 4. No. 1. (2014).
3. Yakovlev A.V. et al. // BioNanoSci. V. 8. Iss. 1. P. 304–309 (2018).

Изменение свойств глутаматергической передачи в гиппокампе крыс в различные фазы литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии

Диеспиров Г. П., Постникова Т. Ю., Зайцев А. В.

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

diespirov.gp@yandex.ru

Эпилептический статус (ЭС) запускает множество патологических изменений в мозге, которые в дальнейшем могут приводить к развитию эпилепсии [1, 2]. Наиболее часто при височной эпилепсии (ВЭ) страдает гиппокамп, ответственный за консолидацию памяти [3, 4]. Однако механизмы этих нарушений до сих пор мало изучены [5].

Нами была поставлена цель исследовать свойства глутаматергической передачи в гиппокампе крыс на разных этапах литий-пилокарпиновой модели ВЭ.

У крыс Вистар в возрасте 21 дня индуцировали ЭС: до введения пилокарпина (30 мг/кг) за одни сутки вводили LiCl (127 мг/кг), за полчаса – метилскополомин (1 мг/кг) (литий-пилокарпиновая модель ВЭ). Электрофизиологические исследования проводили через 1 день после ЭС (острая фаза), 3 и 7 дней (латентная фаза) и через 30 дней (хроническая фаза) после ЭС. Регистрацию полевых ответов осуществляли в лучистом слое поля СА1. Для каждого среза определяли эффективность синаптической нейротрансмиссии и величину кратковременной фасилитации. Методом пэтч-кламп изучались частота и средняя амплитуда спонтанных событий на нейронах поля СА1.

В острой фазе модели синаптическая нейротрансмиссия значительно снижалась на первые сутки после ЭС ($t = 2,77$; $p < 0,01$). В латентной фазе нейротрансмиссия была снижена только к седьмому дню после ЭС ($F_{2,76} = 3,58$; $p < 0,05$). Изменений в величине кратковременной фасилитации в острую и хроническую фазу выявлено не было ($F_{1,204} = 0,47$; $p = 0,93$ и $F_{2,240} = 0,18$; $p = 0,84$). В хронической фазе происходит ослабление синаптической нейротрансмиссии ($t = 2,19$; $p < 0,05$). Регистрация спонтанных событий на пирамидных нейронах через 30 дней после ВЭ выявила повышение частоты спайкования клеток на 118 % ($t = 2,5$; $p = 0,02$), но амплитуда ответов не изменялась ($t = 0,60$; $p = 0,56$).

Полученные данные свидетельствуют о комплексе изменений в глутаматергической системе гиппокампа после ЭС. Эти данные могут помочь в разработке рациональной терапии предотвращения эпилептогенеза и эпилепсии.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-15-00430.

1. Fordington S., Manford M. (2020) A review of seizures and epilepsy following traumatic brain injury // *J. Neurol.*, 267, 3105–3111, doi:10.1007/s00415-020-09926-w
2. Goldberg E.M., Coulter D.A. (2013) Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction // *Nat. Rev. Neurosci.*, 14, 337–49, doi:10.1038/nrn3482
3. Thom, M. (2014) Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 40, 520–543, doi:10.1111/nan.12150
4. Bliss T.V.P., Collingridge G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus // *Nature*, 361, 31–39, doi:10.1038/361031a0
5. Zaitsev A.V., Amakhin D.V., Dyomina A.V., Zakharova M.V., Ergina J.L., Postnikova T.Y., Diespirov G.P., Magazanik L.G. (2021) Synaptic Dysfunction in Epilepsy // *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 57, 542–563, doi:10.1134/S002209302103008X

Стратегия белкового дизайна для структурных исследований пептидного GPCR

Дмитриева Д. А., Смирнова Е. А., Садова А. А., Мишин А. В.

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, лаборатория структурной биологии рецепторов, сопряженных с G белком, Долгопрудный, Россия

dmitrieva.da@phystech.edu

Рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), представляют наибольшую и разнообразную группу мембранных рецепторов в эукариотических организмах. Белки GPCR принимают участие в обширном спектре физиологических процессов и являются мишенью для трети всех существующих лекарств [1], поэтому изучение структурных свойств GPCR является острой необходимостью. Объектом исследования является пептидный GPCR, принимающий участие в воспалительных процессах. Несмотря на быстрый прогресс, произошедший в структурной биологии в последние годы, получение структурных данных рецепторов, сопряженных с G-белком, по-прежнему затруднено из-за их низкой стабильности и конформационной подвижности. Успех в получении трехмерной структуры мембранных белков требует наработки монодисперсных образцов с улучшенной термо- и конформационной стабильностью и выходом белка более 0,2–0,5 мг на 1 л клеточной культуры [2].

Для получения белка, пригодного для кристаллизационных тестов, были разработаны и охарактеризованы генно-инженерные конструкции с небольшими водорастворимыми белками-партнерами, способствующими формированию кристаллизационных контактов [3]. Для повышения уровня экспрессии, выхода и термостабильности рецептора в аминокислотную последовательность вводились точечные мутации, предсказанные методом машинного обучения на основе данных о последовательностях и структурах GPCR [4]. В конструкцию вводились сигнальная последовательность гемагглютинаина для облегчения транслокации рецептора в мембрану эндоплазматического ретикулума, FLAG- и HIS-таг – для обнаружения белка антителами и очистки на аффинной смоле. Лучшие конструкции показали увеличение уровней экспрессии рецептора на поверхности клеток Sf9, его выхода по сравнению с диким типом, повышенную термостабильность в комплексе рецептора с молекулами-антагонистами.

Разработка генетических конструкций является одним из важнейших этапов структурной биологии GPCR и требует больших усилий по поиску и характеристике кристаллизационных конструкций.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-10036.

1. Sriram K., Insel P.A. // *Molecular Pharmacology*. 93 (2018).
2. Ishchenko A., Abola E.E. et al. *Protein Crystallography // Methods in Molecular Biology*. 1607 (2017).
3. Chun E., Thompson A. et al. // *Structure*. 20, 6 (2012).
4. Popov P., Peng Y. et al. // *eLife*. 7: e34729 (2018).

Влияние экстраклеточных везикул жировой ткани на экспрессию генов метаболизма холестерина в макрофагах человека

*Драчева К. В.^{1,2}, Побожева И. А.^{1,2}, Анисимова К. А.², Гараева Л. А.¹,
Хамид З. М.², Баландов С. Г.², Василевский Д. И.², Штам Т. А.¹,
Пчелина С. Н.^{1,2}, Мирошникова В. В.^{1,2}*

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

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

dracheva_kv@pnpi.nrcki.ru

Введение. Ожирение сопровождается дисфункцией жировой ткани (ЖТ) [1] и последующими изменениями биогенеза и состава секретлируемых экстраклеточных везикул (ЭВ), что может играть ключевую роль в развитии сопутствующих патологий [2, 3]. Мы предположили, что ЭВ, секретлируемые ЖТ при ожирении, могут влиять на накопление липидов макрофагами интимы артерий, способствуя прогрессированию атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

Целью исследования явилось изучение влияния ЭВ ЖТ на экспрессию генов метаболизма холестерина в первичной культуре макрофагов человека.

Материалы и методы. В экспериментах были использованы пулированные образцы ЭВ, полученных при культивировании эксплантов подкожной и висцеральной ЖТ (ПЖТ и ВЖТ) пациентов:

- 1) с ожирением и сахарным диабетом 2-го типа (СД2) ($n = 26$),
- 2) с ожирением без СД2 ($n = 27$),
- 3) без ожирения ($n = 15$).

ЭВ ЖТ были охарактеризованы такими методами, как: вестерн-блот, анализ траектории наночастиц (НТА), криоэлектронная микроскопия. Макрофаги, полученные при дифференцировке моноцитов периферической крови здоровых доноров в течение 5 сут, культивировали в присутствии ЭВ ЖТ еще 24 ч. Уровень мРНК генов в макрофагах оценивали методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Уровень мРНК генов – транспортеров холестерина – *ABCA1* и *ABCG1* в макрофагах был значительно выше в случае инкубации с ЭВ ЖТ пациентов с СД2. Экспрессия гена *ABCA1* повышалась при воздействии всех типов ЭВ ВЖТ. При этом на экспрессию генов транскрипционных факторов эффекты ЭВ ЖТ были противоположные: уровень мРНК гена *LXRβ (NR1H2)* повышался, а уровень мРНК генов *LXRα (NR1H3)*, как и *PPARG*, снижался при добавлении ЭВ ВЖТ пациентов с ожирением без СД2 и любых ЭВ пациентов с СД2.

Выводы. ЭВ, секретируемые ПЖТ и ВЖТ при ожирении и СД2, модулируют экспрессию генов метаболизма холестерина в макрофагах человека.

1. Longo M. et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications // International Journal of Molecular Sciences. 2019. V. 20. No. 9. P. 2358.
2. Deng Z. et al. Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance // Diabetes. 2009. V. 58. No. 11. P. 2498–2505.
3. Ferrante S.C. et al. Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease // Pediatric Research. 2015. V. 77. No. 3. P. 447–454.

**Роль жидкокристаллических липидных систем
в современной биоинженерии: от кристаллизации мембранных белков
до адресной доставки лекарственных препаратов**

Дронова Е. А.¹, Рижиков Ю. Л.^{1,2}, Горделий В. И.³

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

² *Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия*

³ *Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Grenoble, France*

dronova.ea@phystech.edu

Известно, что некоторые липиды в присутствии воды образуют липидно-кубическую фазу (lipid cubic phase, LCP) – вязкую гелеобразную периодическую структуру – липидный бислой, пронизанный разветвленной системой непересекающихся водных каналов [1]. LCP является мембранным миметиком, т. е. средой, имеющей существенные структурные сходства с биологической мембраной. Поэтому LCP лежит в основе *in meso*-метода кристаллизации, подходящего как для мембранных, так и для растворимых белков и сложных комплексов [2].

LCP также нашла применение в качестве матрицы для доставки лекарств. Благодаря своей бинарной природе LCP подходит для инкапсулирования и сохранения биоактивности препаратов как с гидрофильным действующим веществом (ДВ), так и с гидрофобным. В первом случае молекулы ДВ располагаются внутри водных каналов, а их высвобождение является контролируемым диффузионным процессом с небольшими (6–8 ч) характерными временами протекания [3]. Во втором случае молекулы встраиваются в бислой, а за выделение ДВ отвечает деградация матрицы за счет липолиза с большими характерными временами (до 24 ч) [4].

Из-за чрезвычайной вязкости LCP-матриц применение препаратов на их основе возможно только локально, на слизистых оболочках, например в качестве местных анестетиков или антибиотиков [5]. Для инъекционного или перорального способов применения используются наночастицы, изготавливаемые из LCP-гелей, – кубосомы [6]. При помощи полимерных добавок можно влиять на физические и химические свойства матрицы. LCP-гели и кубосомы на основе биосовместимых липидов и амфифильных полимеров являются универсальным инструментом при разработке адресной терапии различных заболеваний, а также потенциально могут применяться при создании вакцин на основе мембранных белков патогенных микроорганизмов, в том числе для борьбы с такими заболеваниями, как COVID-19.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (договор 075-03-2022-107, проект FSMG-2021–0002).

1. Luzzati V., Tardieu A., Gulik-Krzywicki T. et al. Structure of the Cubic Phases of Lipid–Water Systems // *Nature*. 220: 485–488 (1968).
2. Caffrey M. A comprehensive review of the lipid cubic phase or in meso method for crystallizing membrane and soluble proteins and complexes // *Acta Cryst.* F71: 3–18 (2015).
3. Negrini R., Mezzenga R. Diffusion, molecular separation, and drug delivery from lipid mesophases with tunable water channels // *Langmuir*. 28 (47): 16455–62 (2012). doi:10.1021/la303833s. Erratum in: *Langmuir*. 29 (4): 1327 (2013).
4. Dully M., Brasnett C., Djeghader A., Seddon A., Neilan J., Murray D., Butler J., Soulimane T., Hudson S.P. Modulating the release of pharmaceuticals from lipid cubic phases using a lipase inhibitor // *J. Colloid Interface Sci.* 573: 176–192 (2020). doi:10.1016/j.jcis.2020.04.015
5. Shah J.C., Sadhale Y., Chilukuri D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2–3): 229–50 (2001). doi:10.1016/s0169-409x(01)00108-9
6. Barauskas J., Johnsson M., Joabsson F, Tiberg F. Cubic phase nanoparticles (Cubosome): principles for controlling size, structure, and stability // *Langmuir*. 21 (6): 2569–77 (2005). doi:10.1021/la047590p

Направленное получение делеций в геноме с использованием новых нуклеаз CRISPR–Cas12a

Евтеева М. А., Гуницева Н. М., Борисова А. А.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

evteevamarta@gmail.com

Белки CRISPR–Cas12a (Cpf1) – это РНК-управляемые ДНК-нуклеазы, которые связывают и разрезают ДНК как компоненты бактериальной адаптивной иммунной системы. Как и CRISPR–Cas9, Cas12a используется в качестве мощного инструмента редактирования генома, основанного на его способности вносить двухцепочечные разрывы в ДНК-матрицу [1]. Однако системы CRISPR–Cas12a становятся все более привлекательным инструментом редактирования генома для клеточной инженерии благодаря своим широким возможностям редактирования по сравнению с аналогами CRISPR–Cas9 [2].

В нашей лаборатории найдены, получены и успешно протестированы две новые РНК-управляемые ДНК-нуклеазы подтипа V-A. Здесь мы демонстрируем новые нуклеазы из *Ruminococcus bromii* sp. и *Bacteroidaceae*, которые способны эффективно осуществлять направленный гидролиз ДНК-матриц, используя 5'-YYN PAM-последовательности в относительно широком диапазоне температур от 20 до 42 °C. По сравнению с *Acidaminococcus* sp. (AsCas12a) полученные нами нуклеазы способны более эффективно разрезать ДНК в условиях *in vitro*. Также мы показываем, что кодоноптоимизированная для человека нуклеаза активна в культуре клеток HEK293T и может применяться для эффективного внесения делеций в геном. Учитывая его полезные свойства, этот фермент демонстрирует потенциал для использования в клинических и биотехнологических приложениях в области редактирования генома.

1. Chen J.S. et al. CRISPR-Cas12a Target Binding Unleashes Indiscriminate Single-Stranded DNase Activity // Science. V. 360. No. 6387. P. 436–439 (2018).
2. Jedrzejczyk D. et al. CRISPR-Cas12a Nucleases Function with Structurally Engineered crRNAs–Synthetic trAcrRNA (2022).

Влияние лазерной биопечати на функциональное состояние клеток

Жигарков В. С.¹, Гросфельд Э. В.^{1,2}, Александров А. И.²,
Минаев Н. В.¹, Юсупов В. И.¹

¹ Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН,
Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, Москва, Россия

vzhigarkov@gmail.com

На основе лазерно-индуцированного прямого переноса вещества LIFT развилась технология лазерной биопечати [1] клеток млекопитающих [2] и микробов [3]. Это позволяет, например, создавать тканеинженерные конструкты в качестве эквивалентов органов и тканей, а также разрабатывать биокатализаторы [4] и биосенсоры [5].

Процесс лазерной биопечати осуществляется с поверхности прозрачной пластины с тонким металлическим покрытием, на которое нанесен слой геля с биологическим материалом. В результате локального лазерного нагрева происходит перенос микрокапли геля на приемную среду. Лазерная биопечать обладает целым рядом преимуществ, заключающихся в высокой скорости печати, точности и стабильности переноса [6]. Однако существуют и негативные явления, которые необходимо свести к минимуму.

Цель работы состоит в исследовании эффектов лазерной биопечати с помощью проточной цитофлуориметрии [7]. Проведены расчеты доз энергии и импульсного температурного нагрева, которым подвергаются клетки. Оценены эффекты прямого импульсного лазерного облучения и импульсный нагрев дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

Экспериментально установлено, что клетки в слое геля испытывают воздействие лазерного излучения 0,1–6 Дж/см². При этом показано, что такой уровень облучения сам по себе не влияет на жизнеспособность клеток. Выявлено, что ~ 5 % клеток нагревается до высоких температур, что подтверждается гибелью соответствующей популяции клеток при биопечати. Это сопровождается эффектом почти полного затемнения внутриклеточного зеленого флуоресцентного белка, также наблюдаемого в ответ на тепловой шок. Обнаружен не наблюдавшийся ранее эффект значительного увеличения проницаемости мембран у перенесенных живых клеток.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках исполнения работ по государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части доработки системы для биопечати, гранта РНФ № 20-14-00286 в части оптимизации процесса лазерной биопечати.

1. Serra P. et al. // *Adv. Mater. Technol.* 2019. V. 4. No. 1. P. 1–33.
2. Derakhshanfar S. et al. // *Bioact. Mater.* 2018. V. 3. No. 2. P. 144–156.
3. Saygili E. et al. // *Bioprinting*. Elsevier B.V. 2020. V. 18. P. e00071.
4. Qian F. et al. // *Nano Lett.* 2019. V. 19. No. 9. P. 5829–5835.
5. Adeniran A. et al. // *FEMS Yeast Res.* 2015. V. 15. No. 1. P. 1–15.
6. Yusupov V. et al. // *Int. J. Bioprinting.* 2020. V. 6. No. 3. P. 1–16.
7. Grosfeld E.V. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. No. 17. P. 9823.

Аутосомно-доминантная болезнь Паркинсона, вызванная вариантом р.Е46К в гене SNCA

Журавлев А. С.¹, Сенкевич К. А.², Белецкая М. В.², Милюхина И. В.³,
Тимофеева А. А.², Емельянов А. К.^{1,2}, Пчелина С. Н.^{1,2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

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

³ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

rigold988@mail.ru

В настоящее время считается, что ключевым звеном в патогенезе болезни Паркинсона (БП) является олигомеризация α -синуклеина в дофаминергических нейронах черной субстанции головного мозга. На сегодняшний день известно, что гетерозиготные мультипликации (дупликации или трипликации), как и пять обнаруженных миссенс-мутаций гена *SNCA*, являются патогенными (р.Аla30Pro, р.Glu46Lys, р.Gly51Asp, р.Аla53-Glu и р.Аla53Thr) [1].

В данной работе было выполнено таргетное секвенирование гена *SNCA* с использованием массового параллельного секвенирования на приборе Illumina NovaSeq 6000 SP PE100 497 пациентов с БП и 401 индивидуума контрольной группы, сопоставимых по полу и возрасту. Работа проводилась совместно с Первым Санкт-Петербургским государственным медицинским университетом им. акад. И. П. Павлова и Институтом мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН. Клиническая значимость вариантов оценивалась с использованием базы данных ClinVar [2]. Подтверждение клинически значимой мутации проводилось с использованием секвенирования по Сенгеру на приборе «Нанофор-05» (Синтол, Россия) и праймеров, описанных ранее [3].

В результате проведенного исследования в группе пациентов с БП был обнаружен носитель гетерозиготного патогенного варианта р.Е46К гена *SNCA*, связанного с повышением агрегации фибрилл и развитием ранней формы БП. Иных патогенных вариантов в группе пациентов с БП и в контроле обнаружено не было. Следует отметить, что БП у пациента характеризовалась медленным развитием моторных симптомов и хорошим ответом на прием «Леводопы». У родственников по материнской линии БП сопровождалась ранней смертью. Насколько нам известно, это третье обнаруженное семейство с подобной мутацией в гене *SNCA*.

Таким образом, в результате исследования обнаружена третья семья в мире с мутацией Е46К гена *SNCA*.

1. Lunati A. et al. // Rev. Neurol. (Paris). 174, 9 (2018).
2. Melissa J.L. et al. // Nucleic Acids Research. 46, D1 (2018).
3. Zarranz et al. // Ann. Neurol. 55, 2 (2004).

Биофизический подход в создании пищевых ингредиентов XXI века

Зеликина Д. В.¹, Чеботарёв С. А.¹, Балакина Е. С.^{1,2}, Комарова А. П.^{1,2}

¹ Институт биохимической физики. им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

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

dusman.05@mail.ru

Данные доказательной медицины свидетельствуют о том, что дефицит в организме человека ряда биологически активных веществ (БАВ) может привести к развитию различных хронических неинфекционных заболеваний (сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, сахарного диабета 2-го типа, онкологии) [1–3]. Общепризнанной стратегией в профилактике этих заболеваний является обогащение пищевых продуктов незаменимыми БАВ в их адекватном количестве [1–5]. Однако гидрофобная природа большинства БАВ, а также быстрая потеря их биологической активности в неблагоприятных условиях окружающей среды в процессах пищевых производств и хранения препятствуют их широкомасштабному введению в состав пищевых продуктов, а также являются причиной низкого уровня усвоения в организме человека.

Сегодня, обладая знанием структуры и физико-химических свойств БАВ различной природы, а также основных макронутриентов пищевых систем, таких как белки и полисахариды, возможно целенаправленное молекулярное конструирование пищевых ингредиентов нового поколения, в которых биополимеры будут выполнять роль нано- или микроконтейнеров для доставки незаменимых БАВ, обладающих ярко выраженным профилактическим действием.

В докладе будут рассмотрены теоретические и практические основы разработки таких ингредиентов с заранее заданными свойствами (растворимость в водной среде, высокая инкапсулирующая способность по отношению к БАВ, пролонгированная стабильность БАВ при хранении, возможность регулирования уровня и места высвобождения БАВ в желудочно-кишечном тракте). Кроме того, на основании данных комбинации высокоточных физико-химических методов (ЭПР; ТЭМ; ИК-спектроскопии; лазерного светорассеяния в электрофоретическом, динамическом и статическом режимах; спектрофотометрии) будет представлен анализ структурных и термодинамических факторов, влияющих на формирование и свойства биополимерных систем пероральной доставки БАВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 21-76-00045, <https://rscf.ru/project/21-76-00045/>.

1. Ahmmed M.K., Ahmmed F., Tian H., Carne A., Bekhit A.E.D. Marine omega-3 (n-3) phospholipids: A comprehensive review of their properties, sources, bioavailability, and relation to brain health // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020. 19. P. 64–123.
2. Kunnumakkara A.B., Bordoloi D., Padmavathi G., Monisha J. et al. Curcumin, the golden nutraceutical: Multitargeting for multiple chronic diseases // *British Journal of Pharmacology*. 2017. 174. P. 1325–1348.
3. Delfanian M., Sahari M.A. Improving functionality, bioavailability, nutraceutical and sensory attributes of fortified foods using phenolics-loaded nanocarriers as natural ingredients // *Food Research International*. 2020. 137. P. 109555.
4. Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года (Распоряжение Правительства Российской Федерации от 29.06.2016 г. № 1364-р.).
5. ГОСТ Р 55577-2013. Продукты пищевые специализированные и функциональные. Информация об отличительных признаках и эффективности.

Универсальный прогностический маркер для опухолей основных локализаций

Ибрагимова М. К.^{1,2}, Литвяков Н. В.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального
исследовательского медицинского центра РАН, Томск, Россия

² Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

itmk1805@yandex.ru

В 2022 году в статье Hanahan D. [1] было позиционировано новое свойство опухоли – разблокировка фенотипической пластичности, в том числе в плане пластичности основной массы опухолевых клеток и их дедифференцировке до опухолевых стволовых клеток.

Были проведены исследования генетических механизмов, участвующих на всех этих этапах, которые включают гены стволовости (ГС) и WNT-сигналинга. Приобретение способности опухолевых клеток к дедифференцировке обусловлено эктопической экспрессией ГС (44 гена), входение и выход из дормантного состояния зависит от активности 15 генов WNT-сигналинга [2–4]. Исходя из этого, было выдвинуто предположение, что CNA и уровень экспрессии данных генов могут быть универсальным прогностическим маркером для опухолей разных локализаций.

Выполнено исследование универсальности прогностической значимости генных сигнатур на основе амплификаций и экспрессии ГС и экспрессии генов WNT. Показано, что наличие в опухоли 2 и более амплификаций ГС является неблагоприятным прогностическим маркером в отношении общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования для рака молочной железы, легкого, желудка, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и колоректального рака (по данным TCGA ($\log_{\text{rank}} p_{\text{val}} = 10^{-10}$ – 10^{-3})).

На основе 12-генной сигнатуры, включающей 6 генов WNT (*APC*, *GSK3B*, *WNT6*, *WNT9B*, *AXIN1*, *VANGL2*) и 6 ГС (*FZD6*, *CCNF*, *MYC*, *SNAI2*, *FZD9*, *SOX8*), установлена прогностическая значимость в отношении выживаемости без прогрессирования для 16 локализаций. При высоком уровне экспрессии генов медиана выживаемости без прогрессирования была в 2–4 раза ниже ($\log_{\text{rank}} p_{\text{val}} = 10^{-5}$ – 10^{-3}). Для 3 локализаций достигнута 100%-ная выживаемость без прогрессирования при благоприятном исходе. Для 8 локализаций при благоприятном исходе медиана выживаемости не достигнута.

Таким образом, сочетание маркеров ГС и WNT-сигналинга оказалось наиболее эффективным в отношении прогноза для основных локализаций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 29.09.2021 № 075-15-2021-1073) и гранта РФФИ № 21-15-00243.

1. Hanahan D. // Cancer Discov., 12, 1 (2022).
2. Litviakov N.V., Ibragimova M.K. et al. // Oncotarget, 11, 21 (2020).
3. Litviakov N.V., Ibragimova M.K. et al. // Siberian Journal of Oncology, 19, 3 (2020).
4. Ibragimova M.K., Tsyganov M.M. et al. // Int. J. Mol. Sci., 23, 13906 (2022).

Анализ состояния клеток семенников у мутанта *sws*¹ *Drosophila melanogaster*

Иванова Е. А., Рябова Е. В., Саранцева С. В.

НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

ivanova_ea@pnpi.nrcki.ru

Фосфатидилхолин является одним из наиболее распространенных фосфолипидов в клетке, который расщепляется различными видами фосфолипаз до лизофосфатидилолина или глицерофосфохолина. Одним из таких ферментов является пататинподобная фосфолипаза 6, кодируемая геном *PNPLA6*, который является эволюционно-консервативным. Его ортолог у плодовой мушки *Drosophila melanogaster* – ген *swiss cheese* (*sws*). Потеря его функции у дрозофилы приводит к образованию многочисленных полостей и глиальных аберрантных структур вокруг аксонов в мозге, что вызывает преждевременную гибель особей [1, 2]. Было показано [3], что, помимо нервной системы, ген *sws* экспрессируется и в репродуктивной системе самцов: в семявыносящем протоке, вторичных клетках придаточных желез и в клетках зрелых цист семенников. К тому же у мух, мутантных по данному гену, были отмечены уменьшение времени ухаживания за самкой и снижение скорости движения сперматозоидов.

Данная работа была направлена на анализ состояния клеток семенников у самцов, мутантных по гену *sws* (*sws*¹). В ходе работы было показано, что данная мутация затрагивает один из важнейших процессов сперматогенеза – индивидуализацию сперматид, также у мутантов нарушается целостность гематотестикулярного барьера в цистах ранних и поздних сперматид. Методом ПЦР в реальном времени у линии дикого типа было показано, что экспрессия гена *sws* происходит на завершающих стадиях сперматогенеза.

Таким образом, в данной работе мы показали, что возникающие у мутантов нарушения в сперматогенезе приводят к уменьшению количества зрелых сперматозоидов и, как следствие, снижению их плодовитости.

1. Ryabova E.V. et al. // *Cells*, 10 (3) (2021).
2. Melentev P.A. et al. // *IJMS*, 22 (15) (2021).
3. Melentev P.A. et al. // *Insects*, 13 (1) (2022).

Внеклеточная ДНК: связующее звено между процессами биоминерализации и образованием биопленок планктонной культуры *V. cereus*

Иванова Л. А.^{1,2}, Забродская Я. А.¹, Егоров В. В.^{1,2},
Лебедев Д. В.¹, Кульминская А. А.^{1,2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия

Ivanova_la@pnpi.nrcki.ru

Биоминерализация – явление минералообразования живыми организмами, широко распространенное в природе. В ходе метаболических реакций различные бактерии индуцируют осаждение карбоната кальция в почве и горных породах или образуют инкрустированные биопленки, закупоривающие мочевые катетеры, что создает значительные проблемы в клинической практике [1]. Исследования механизмов биоминерализации важны для решения клинических задач по торможению кристаллизации кальцита, а также для применения новых технологий восстановления бетонных конструкций, обеспечивающих целостность пористых сред, гидравлический контроль и восстановление окружающей среды [2–4]. Несмотря на обширные исследования в области биоминерализации, до сих пор не показана роль отдельных макромолекулярных компонент внеклеточного матрикса (ВКМ) в этом процессе, хотя оба этих процесса проходят в бактериальном сообществе параллельно, влияя друг на друга.

В настоящей работе с помощью ряда физических методов: МУРН, МУРР, СЭМ, РФА и ИК-спектроскопии – была показана эволюция структуры образованных преципитатов CaCO₃ бактерией *Bacillus cereus* на разных стадиях формирования ВКМ в планктонной культуре. С использованием микроскопических методов: световой, атомно-силовой и конфокальной микроскопии со специфическими флуоресцентными красителями – был подробно показан процесс образования нерастворимых осадков CaCO₃, а также роль отдельных компонентов ВКМ (внеклеточной ДНК, амилоидов и полисахаридов) в процессе кристаллизации биогенных минералов. Ключевая роль ДНК-компоненты ВКМ в процессе биоминерализации *V. cereus* была показана в эксперименте с ДНКазой I.

Работа выполнена при финансовой поддержке Курчатовского геномного центра – ПИЯФ в рамках программы развития центров генетических исследований мирового уровня, соглашение № 075-15-2019-1663.

1. Yuan F., Huang Z., Yang T. et al. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in catheter-associated urinary tract infections // Urol. Int. 105: 354–361 (2021).

2. Dhami N.K., Reddy M.S., Mukherjee A. Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages // *Front. Microbiol.* 5 (2014).
3. Le Métayer-Levrel G., Castanier S., Oriol G. et al. Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony // *Sediment. Geol.* 126: 25–34 (1999).
4. De Muynck W., De Belie N., Verstraete W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review // *Ecol. Eng.* 36: 118–136 (2010).

Создание модели летальной бактериальной инфекции в *C. elegans* для тестирования новых антибиотиков и антимикробных пептидов *in vivo*

Калганова А. И.¹, Елисеев И. Е.²

¹ Санкт-Петербургский национальный исследовательский

Академический университет им. Ж. И. Алферова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

eliseevie@gmail.com

Неразумное и чрезмерное применение антибиотиков в терапии привело к возникновению патогенных микроорганизмов с множественной лекарственной резистентностью. Существующие платформы для открытия новых противомикробных препаратов имеют низкую производительность и не позволяют оценить цитотоксичность. Измерение антимикробной активности препаратов производят *in vitro* в культурах возбудителей, но такие тесты позволяют учитывать только прямое убийство бактерий без специфических взаимодействий внутри организма [1, 2]. В этой работе мы демонстрируем практическое применение нематоды *C. elegans* в качестве системы для скрининга лекарств против бактерий *in vivo*.

Нами были разработаны лабораторные протоколы заражения нематод патогенными микроорганизмами, в частности *P. aeruginosa* [3]. Наиболее интересным штаммом, формирующим тестовую летальную инфекцию у *C. elegans*, оказался *P. aeruginosa* Ps1 [4]. Для используемого штамма показано формирование биопленки при культивировании *in vitro* и *in vivo*. Кинетику продолжающейся инфекции анализировали путем составления кривых выживания инфицированных нематод в 384-луночных планшетах в течение одной недели после прямого контакта на чашке с возбудителем. Для оценки «живой / мертвый» использовался метод прямого наблюдения [5].

На базе разработанной платформы было показано действие ряда антибиотиков и антимикробного пептида. Также был замечен интересный формат социального взаимодействия нематод при переходе от твердой питательной среды к жидкой.

Далее мы планируем исследовать комбинацию колистина и танатина в разработанной модели *in vivo* [6]. Ожидается, что эта синергия может быть более выраженной, поскольку в системе *in vivo* могут наблюдаться альтернативные механизмы действия, не связанные с непосредственным уничтожением бактерий.

1. Powell J.R., Frederick M. // *Methods in Molecular Biology*. 2008. V. 415. P. 403–427.
2. Balla K.M., Troemel E.R. // *Cellular Microbiology*. 2013. V. 15. Iss. 8. P. 1313–1322.
3. Moy T.I. et al. // *ACS Chemical Biology*. 2009. V. 4. No. 7. P. 527–533.

4. Tan M.W., Mahajan-Miklos S., Ausubel F.M. // Proc. of the National Academy of Sciences. 1999. V. 96. No. 2. P. 715–720.
5. Moy T.I. et al. // Proc. of the National Academy of Sciences. 2006. V. 103. No. 27. P. 10414–10419.
6. Zharkova M.S. et al. // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2019. V. 9. P. 128.

Разработка тест-системы детекции вируса Nipah на основе CRISPR/Cas12a платформы DETECTR

Капитонова М. А.^{1,2}, Волков А. А.^{1,3}, Долгова А. С.¹

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, Germany

kapitonova.marin@gmail.com

В настоящее время CRISPR/Cas-системы находят широкое применение в различных диагностических платформах, например DETECTR с использованием белка Cas12a [1]. Принцип работы данного метода заключается в способности белка Cas12a к трансактивности. Комплекс Cas белка с гидовой РНК при комплементарном связывании части гРНК с целевой последовательностью дцДНК активирует нуклеазную активность. При этом нуклеаза расщепляет не только целевую дцДНК, но и оцДНК, находящиеся в растворе. Так, в качестве оцДНК в раствор можно добавить зонды, меченные флуорофором и гасителем. При их расщеплении появляется флуоресцентный сигнал, по которому можно судить о наличии в растворе дцДНК. Чувствительность данных методов без амплификации составляет $6 \cdot 10^5$ копий/мкл [2]. При сочетании с амплификацией удается достичь предела детекции 10 копий/мкл [3]. Особо перспективной является возможность совмещения Cas-детекции с изотермической амплификацией в одной пробирке [4–6].

Вирус Nipah (семейство *Paramyxoviridae*, род *Henipavirus*) способен заражать людей и домашний скот, вызывая неврологические и респираторные симптомы, летальность оценивается в 40–70 %. Вспышки заражения вирусом Nipah происходят в Южной и Юго-Восточной Азии. В настоящий момент не существует эффективного лечения данного заболевания, а диагностика проводится дорогостоящими и трудоемкими методами RT-PCR и ИФА, из чего возникает необходимость создания простой и быстрой тест-системы.

Целью данной работы является разработка системы детекции вируса Nipah на основе DETECTR. В ходе работы подобраны последовательности гидовых РНК, оптимальные концентрации Cas12a и гРНК составили 100нМ. Выбрано несколько подходящих флуоресцентных зондов с флуорофорами FAM и HEX. Подобрана оптимальная температура реакции, исследовано влияние предварительной инкубации на чувствительность системы. Лимит детекции без амплификации оценен в 10^6 – 10^7 копий/мкл. В дальнейшем планируется увеличение чувствительности системы, совмещение DETECTR с изотермической амплификацией.

Работа выполнена при поддержке государственной программы Российской Федерации «Обеспечение химической и биологической безопасности Российской Федерации».

1. Волков А. А., Долгова А. С., Дедков В. Г. // Инфекция и иммунитет, 12 (1) 9–20 (2022).
2. Huyke D.A. et al. // bioRxiv 2022.01.31.478567 (2022).
3. Broughton J.P. et al. // Nature Biotechnology, 38, 870–874 (2020).
4. Ding X. et al. // Nature Communications, 11, 4711 (2020).
5. Kham-Kjing N. et al. // Diagnostics, 12, 1524 (2022).
6. Dai B. et al. // Front. Microbiol., 13, 858247 (2022).
7. Aditi, Shariff M. // Epidemiology and Infection, 147, e95, 1–6 (2019).

Взаимосвязь соотношения sFlt1/PlGF с прегестационными заболеваниями матери и лабораторными показателями во время беременности – новые факторы риска для развития преэклампсии

Карпова Н. С., Дмитренко О. П.

*Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии,
Москва, Россия*

nataliakarpova.sp@gmail.com

Среди гипертензивных нарушений беременности особое место занимает преэклампсия как одна из основных причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. Она характеризуется впервые возникшей артериальной гипертензией ($> 140/90$ мм рт. ст.) и протеинурией (> 300 мг/24 ч или отношение белка к креатинину 30 мг/ммоль) после 20-й недели беременности [1]. Патогенным фактором развития заболевания и его уникальным биомаркером является дисбаланс антиангиогенных и ангиогенных белков: уровень растворимой fms-подобной тирозинкиназы-1 (sFlt1) увеличивается, а плацентарного фактора роста (PlGF) снижается [2]. Повышение соотношения sFlt1/PlGF > 38 приводит к патологическим изменениям, типичным для преэклампсии: отслойке [3], гипоксии [4], ишемической болезни плаценты [5], плацентарным сосудистым поражениям [6], окислительному стрессу [7, 8], стрессу эндоплазматического ретикулума [4] и сенсibilизации эндотелия матери [4]. Оценка соотношения sflt1/PlGF позволяет осуществлять краткосрочный прогноз развития патологии и при sflt1/PlGF $> 85(110)$ может служить обоснованием для госпитализации [9].

С помощью анализа литературы нами было обнаружено, что некоторые прегестационные заболевания матери и лабораторные показатели связаны с повышением соотношения sFlt1/PlGF. К ним относятся: более низкие уровни IgG, альбумина, C4 и более высокие уровни свободных легких цепей иммуноглобулина, C-реактивного белка, бета-2-микроглобулина, общее периферическое сопротивление крови, фталатов в крови, а также COVID-19, острая жировая дистрофия печени беременных, перинатальная кардиомиопатия, аберрантная функция миокарда и индекс чувствительности яичников. Взаимосвязь sFlt1/PlGF с ВИЧ, острым коронарным синдромом, функционированием сердечно-сосудистой системы матери на 19–23 неделях беременности, уровнями гормонов щитовидной железы, диабетом и раком остаются противоречивыми (результаты готовятся к публикации). Эти данные требуют дальнейшего подтверждения в исследованиях «случай – контроль».

1. ACOG Committee on Obstetric Practice. ACOG Practice Bulletin-Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists // *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, vol. 77, no. 1, 2002, pp. 67–75, doi:[https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(02\)80002-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(02)80002-9)
2. Kluijvers A., Biesbroek A., Visser W. et al. Angiogenic imbalance in pre-eclampsia and fetal growth restriction: enhanced soluble Fms-like tyrosine kinase-1 binding or diminished production of placental growth factor? // *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 2022, doi:[10.1002/uog.26088](https://doi.org/10.1002/uog.26088)
3. Signore C. et al. Circulating Angiogenic Factors and Placental Abruption // *Obstet. Gynecol.*, vol. 108, no. 2, 2006, pp. 338–44, <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000216014.72503.09>
4. Charnock-Jones D.S. Placental Hypoxia, Endoplasmic Reticulum Stress and Maternal Endothelial Sensitisation by sFLT1 in Pre-Eclampsia // *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 114, 2016, pp. 81–85, <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.07.004>
5. Johnson K.M. et al. Angiogenic Factors and Prediction for Ischemic Placental Disease in Future Pregnancies // *Pregnancy Hypertension*, vol. 25, 2021, pp. 12–17, <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2021.05.011>
6. Baltajian K. et al. Placental Lesions of Vascular Insufficiency Are Associated with Anti-Angiogenic State in Women with Preeclampsia // *Hypertension in Pregnancy*, vol. 33, no. 4, 2014, pp. 427–39, <https://doi.org/10.3109/10641955.2014.926914>
7. Anto E.O. et al. Early Gestational Profiling of Oxidative Stress and Angiogenic Growth Mediators as Predictive, Preventive and Personalised (3P) Medical Approach to Identify Suboptimal Health Pregnant Mothers Likely to Develop Preeclampsia // *EPMA J.*, vol. 12, no. 4, 2021, pp. 517–34, <https://doi.org/10.1007/s13167-021-00258-x>
8. Li H. et al. Hypoxia-Induced Increase in Soluble Flt-1 Production Correlates with Enhanced Oxidative Stress in Trophoblast Cells from the Human Placenta // *Placenta*, vol. 26, no. 2–3, 2005, pp. 210–17, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.05.004>
9. Sroka D., Verlohren S. Short Term Prediction of Preeclampsia // *Maternal-Fetal Med.*, vol. 3, no. 2, 2021, pp. 107–15, <https://doi.org/10.1097/fm9.0000000000000097>

Влияние различных доз мРНК-ЛНЧ-вакцин на нейровоспаление у BALB/c-мышей

Киршина А. С., Казакова А. А., Решетников В. В.

*Научный центр трансляционной медицины
Научно-технологического университета «Сириус»,
пгт. Сириус, Краснодарский край, Россия*

kirshina.as@talantiuspech@mail.ru

мРНК-вакцины показали высокую эффективность при борьбе с COVID-19 [1, 2]. Известно, что ЛНЧ (липидные наночастицы – наиболее используемая система внутриклеточной доставки мРНК-вакцин) и молекулы мРНК обладают адъювантными свойствами [3–6], но в некоторых случаях воспаление может приводить к нежелательным эффектам. Было показано, что ЛНЧ приводят к сильному воспалительному ответу в месте введения, имеют широкий профиль биораспределения и обнаруживаются после введения во многих тканях организма, в том числе в головном мозге [7, 8]. Влияние мРНК-ЛНЧ на воспалительные процессы, развивающиеся в головном мозге, изучено недостаточно.

Целью исследования была оценка экспрессии маркеров нейровоспаления (Tnfa, Il1β, Gfar, Aif1) в префронтальной коре и гипоталамусе мышей после внутримышечного введения различных доз мРНК-ЛНЧ (0, 5, 10, 20 мкг мРНК), экспрессирующих люциферазу светлячка, через 4, 8 и 30 ч.

Показано, что мРНК-ЛНЧ-вакцины в дозе 10–20 мкг мРНК способны усиливать экспрессию Aif1 (ген-маркер активации микроглии) в гипоталамусе через 8 ч после вакцинации, но не после 30 ч. Признаки активации микроглии могут быть как свидетельством прямого прохождения мРНК-ЛНЧ через гематоэнцефалический барьер и запуска процессов нейровоспаления, так и следствием усиления периферического воспаления. Уровень экспрессии Gfar, Il1β, Tnfa в экспериментальных группах варьировался в различных временных точках в гипоталамусе. Отсутствие значимых эффектов на экспрессию Il1β и Tnfa между группами может быть связано с тем, что пик активации экспрессии этих генов уже пройден. Отсутствие значимого влияния мРНК-ЛНЧ-вакцин на экспрессию маркеров нейровоспаления в префронтальной коре указывают на то, что гипоталамус может являться сенсором периферического воспаления и реагировать на провоспалительные сигналы более активно, чем префронтальная кора.

Согласно полученным результатам мРНК-ЛНЧ-вакцины могут индуцировать нейровоспаление в определенных временных промежутках дозо- и регионзависимым образом.

1. Baden L.R. et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine // *N. Engl. J. Med.* 2021; 384 (5): 403–16.
2. Polack F.P. et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine // *N. Engl. J. Med.* 2020; 383 (27): 2603–15.
3. Kon E., Elia U., Peer D. Principles for designing an optimal mRNA lipid nanoparticle vaccine // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2022; 73: 329–36.
4. Parhiz H. et al. Added to pre-existing inflammation, mRNA-lipid nanoparticles induce inflammation exacerbation (IE) // *J. Control Release.* 2022; 344: 50–61.
5. Mu X., Hur S. Immunogenicity of *in vitro*-transcribed RNA // *Acc. Chem. Res.* 2021; 54 (21): 4012–23.
6. Heil F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8 // *Science.* 2004; 303 (5663): 1526–9.
7. Ndeupen S. et al. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory // *Science.* 2021; 24 (12): 103479.
8. Trougakos I.P. et al. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis // *Trends Mol. Med.* 2022; 28 (7): 542–54.

Получение каталитически неактивных эффекторов системы CRISPR Cas12d

*Климко В. В., Арсениев А. Н., Селькова П. А.,
Васильева А. А., Ходорковский М. А.*

*Научно-исследовательский комплекс «Нанобиотехнологии»
Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

valierii.klimko@mail.ru

CRISPR/Cas-системы – это системы адаптивного иммунитета бактерий и архей CRISPR/Cas. Состоят они из CRISPR-кассет, содержащих информацию о чужеродных ДНК/РНК-фрагментах, и генов, кодирующих эффекторный белок данной системы [1]. Подобные системы дают возможность целевого редактирования генов и являются удобным инструментом для использования в различных генно-инженерных задачах [2, 3]. Например, они могут быть использованы для внесения точечных специфичных мутаций, вставки новых ДНК-фрагментов и иных генетических модификаций. Одно из применений – использование модифицированных эффекторных CRISPR/Cas-белков. Такие каталитически неактивные CRISPR/Cas-белки, также называемые dCas (d – dead), имеют мутации в генетической последовательности функционального нуклеазного домена, что приводит к потере способности к интерференции чужеродных ДНК/РНК-фрагментов. Подобные каталитически неактивные CRISPR/Cas-белки могут быть эффективно использованы для регулирования репликации и экспрессии генов [4], так как связываются с ДНК-мишенью и препятствуют движению РНК-полимеразы.

Целью данной работы являлось получение и характеристика каталитически неактивных эффекторов системы CRISPR/Cas12d, принадлежащей к CRISPR-системам V-типа. Особенностью данной системы является то, что она обладает одним RuvC-нуклеазным доменом, разрезающим обе нити ДНК, небольшой спейсерной последовательностью 18 н. п. и уникальной некодирующей скаут-РНК [5]. В результате работы были получены нативный белок, а также мутантные белки, в нуклеазный домен которых была внесена мутация, приводящая к потере каталитической активности. Всего было сделано два мутантных белка dCas12d: D827A и E913A. Данная система может быть использована для регуляции репликации и экспрессии генов, расширив спектр применения CRISPR/Cas-систем.

1. Barrangou R., Fremaux C. et al. // Science. 315 (5819): 1709–12 (2007).
2. Shmakov S., Abudayyeh O.O., Makarova K.S., Koonin E.V. et al. // Mol. Cell. 60 (3): 385–97 (2015).

3. Nussenzweig P.M., Marraffini L.A. // *Annu. Rev. Genet.* 54: 93–120 (2020).
4. Karvelis T., Bigelyte G. et al. // *Nucleic Acids Res.* 48 (9): 5016–5023 (2020).
5. Harrington L.B., Ma E., Doudna J.A. et al. // *Mol. Cell.* 79 (3): 416–424.e5 (2020).

**Метагеномика *Apis mellifera* Северного Кавказа:
микробный состав, индикаторные виды, потенциальные патогены**

Козлова А. Д.¹, Федоров Д. Е.², Изотова А. О.¹,
Виноградова Е. Н.^{1,3}, Кочетова Э. С.¹, Тоцаков С. В.¹

¹ Курчатовский геномный центр Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Бактериальный состав кишечника пчел *Apis mellifera* является важным фактором, определяющим жизнеспособность и продуктивность колонии [1]. По литературным данным, коровый состав микробиоты кишечника пчел является постоянным [2], однако в зависимости от места обитания, рациона питания и факторов окружающей среды может наблюдаться вариабельность [3].

В рамках данной работы при помощи *shotgun*-метагеномики и профилирования сообществ по гену 16S рРНК был проведен анализ состава микробиома *Apis mellifera*, отобранных в высокогорных пасеках респ. Северная Осетия – Алания с целью провести сравнительный анализ корового состава микробных сообществ в зависимости от местообитания и выявить потенциально энтомопатогенные микроорганизмы в составе микробиоты.

Гипотеза о различиях состава микробиоты в зависимости от местообитания проверялась при помощи пермутационного многомерного дисперсионного анализа состава сообществ в различных экспериментальных группах. Результаты анализа показали отсутствие достоверных различий состава микробиоты у пчел, отобранных в разных ущельях и на разной высоте. Однако у некоторых особей в экспериментальных группах был выявлен нестандартный состав микробиоты, что дало возможность предположить, что данные пчелы подвержены инфекции.

Для проверки данного предположения на биоматериале пчел, имеющих в составе кишечника потенциальные патогены, было проведено *shotgun*-секвенирование. Анализ полученных данных проводился двумя методами:

- 1) сборкой, биннингом и таксономической классификацией MAG,
- 2) реконструкцией полноразмерных генов рРНК при помощи phyloflash.

Оба подхода показали присутствие энтомопатогенных микроорганизмов *Serratia marcescens* и представителей рода *Pantoea* в кишечнике двух пчел из пяти проанализированных. В составе микробного сообщества трех других пчел также наблюдалось доминирование родов, отдельные представители которых являются патогенами насекомых. Возможно, эти микроорганизмы представляют собой неописанные патогенные штаммы. С целью подтверждения данного

предположения были проведены gene calling и функциональная аннотация полученных бинов для поиска генов, кодирующих потенциальные энтомотоксины.

Полученные результаты предполагают, что состав микробиоты может служить достоверным диагностическим признаком жизнеспособности пчелиных колоний, а доминирующие в составе метагенома MAG могут представлять собой интерес как новые, неописанные патогенные штаммы.

1. Raymann K., Moran N.A. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers // *Current Opinion in Insect Science*. 2018. V. 26. P. 97–104.
2. Kešnerová L. et al. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut // *PLoS Biology*. 2017. V. 15. No. 12. P. E2003467.
3. Kešnerová L. et al. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer // *The ISME Journal*. 2020. V. 14. No. 3. P. 801–814.

Рациональный дизайн минимальных функционирующих копий генов *USH2A*, *DFNB31* и *ABCA4* для заместительной генной терапии наследственных заболеваний сетчатки

Колесник В. В.^{1,2}, Исаева А. С.^{1,2}, Володина С. И.¹,
Порозова Н. О.¹, Малоголовкин А. С.^{1,3}

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

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

³ Научно-технологический университет «Сириус», пгт. Сириус, Краснодарский край, Россия

kolesnik_v_v@staff.sechenov.ru

По данным портала NIH, зарегистрировано более 209 клинических испытаний генной терапии на основе рекомбинантных AAV [1]. На стадии исследования и разработки находятся еще сотни проектов.

Большая часть всей разработки генотерапевтических препаратов приходится на препараты для терапии наследственных глазных патологий. На расцвет исследований в этой области повлияло одобрение FDA «Люкстурны» – первого препарата для генной терапии врожденного амавроза Лебера второго типа, созданного на основе AAV2 [2, 3].

AAV стали предпочтительным вектором для генной терапии *in vivo* из-за низкой иммуногенности, широкого тропизма и высокой безопасности.

Данное исследование направлено на усовершенствование подходов заместительной генной терапии наследственных офтальмологических патологий. Учитывая ограниченную емкость AAV-вектора (4,7 kb) мы приняли решение смоделировать и испытать новые варианты минимальных функционирующих копий генов, которые в нативной своей форме превышают паковую емкость современных AAV-векторов. Мишенями для данной терапии выбраны неизлечимые патологии, связанные с нарушением функции работы белков, кодирующиеся генами *USH2A*, *DFNB31* и *ABCA4* [4].

Нами был проведен структурный анализ этих генов, анализ мутационного ландшафта генов, выбраны мутированные регионы, имеющие подтвержденную связь с патологическим состоянием на основе базы данных ClinVar. Проведена функциональная аннотация доменов белков *USH2A*, *ABCA4* и вирлин. На основе полученных данных с учетом кодон-оптимизации были созданы две мини-генные конструкции *USH2A* размером 4,2 и 3,3 kb. Так удалось сократить кодирующую последовательность *USH2A* почти в 5 раз (с 15 до 3,3 kb). С использованием AlphaFold получены предикты продуктов сконструированных мини-генов.

В дальнейшем планируется применить такой же анализ для создания мини-генов *ABCA4* и *DFNB31*. Будут получены первые данные о сборке и продуктивности новых AAV-векторов в культуре клеток HEK-293T.

Данное исследование выполняется в рамках программы «Приоритет-2030».

1. Escors D., Breckpot K. Lentiviral Vectors in Gene Therapy: Their Current Status and Future Potential // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 58 (2): 107–119 (2010).
2. Maguire A.M., Russell S., Wellman J.A. et al. Efficacy, Safety, and Durability of Voretigene Neparvovec-rzyl in RPE65 Mutation-Associated Inherited Retinal Dystrophy: Results of Phase 1 and 3 Trials // Ophthalmology. 126 (9): 1273–1285 (2019).
3. Mendell J.R., Al-Zaidy S.A. et al. Current Clinical Applications of *In Vivo* Gene Therapy with AAVs // Mol. Ther. 29 (2): 464–488 (2021).
4. Trapani I., Colella P., Sommella A., Iodice C. et al. Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors // EMBO Mol. Med. 6 (2): 194–211 (2014).

Структурная и термодинамическая характеристика биополимерных наноконтейнеров для пероральной доставки липосомальной формы комбинации гидрофобных нутрицевтиков

Комарова А. П.^{1,2}, Балакина Е. С.^{1,2}, Чеботарёв С. А.¹, Зеликина Д. В.¹,
Миронов И. К.^{1,2}, Бочаров Е. А.^{1,2}

¹ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

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

anastasiakomarovva@gmail.com

В настоящее время актуально создание водорастворимых и наноразмерных систем пероральной доставки комбинаций гидрофобных биологически активных веществ (БАВ) из-за их потенциально большей эффективности и синергетического воздействия на организм при совместном применении [1]. Широкий класс гидрофобных нутрицевтиков, т. е. веществ, обладающих как питательной, так и фармацевтической ценностью, относится к таким БАВ. Среди них особый интерес представляют растительные антиоксиданты (β -каротин, эвгенол), а также незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты (омега-3 и омега-6 ПНЖК) [2, 3]. Инкапсулирование липосом фосфатидилхолина (ФХ), нагруженных этими нутрицевтиками, при помощи пищевых биополимеров (изолята сывороточных белков молока и хитозана) позволило получить их супрамолекулярный комплекс как систему доставки, обладающий 100%-ной растворимостью в водной среде.

Методами ЭПР, ТЭМ, лазерного светорассеяния в статическом, динамическом и электрофоретическом режимах были охарактеризованы структурные и термодинамические параметры комплекса, определяющие его функциональность. Так, наноразмеры (≤ 500 нм), достаточно высокий ζ -потенциал ($+17,1 \pm 1,6$ мВ), а также термодинамическое сродство к растворителю (положительная величина ($A_2^* = 920 \pm 184$ м³/моль) второго вириального коэффициента в разложении химического потенциала комплекса по концентрации), определяют его растворимость в водной среде. Достаточно высокая плотность ($6,3 \pm 1,1$ мг/мл) комплекса, вероятно препятствующая диффузии молекул кислорода к молекулам ПНЖК и β -каротина, лежит в основе длительной стабильности этих нутрицевтиков в неблагоприятных условиях хранения (свет, комнатная температура).

Комарова А. П., Балакина Е. С., Чеботарёв С. А. и Зеликина Д. В. благодарят РНФ за финансовую поддержку (*грант № 21-16-00085*, <https://rscf.ru/project/21-16-00085/>). Авторы также выражают благодарность

фирме «Липоид» за бесплатную поставку образца ФХ, а также ЦКП ИБХФ РАН и МГУ им. М. В. Ломоносова «Электронная микроскопия в науках о жизни».

1. Leena M.M. et al. Synergistic potential of nutraceuticals: Mechanisms and prospects for futuristic medicine // *Food & Function*. 2020. V. 11. No. 11. P. 9317–9337.
2. Gul K. et al. Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene-A review // *Cogent Food & Agriculture*. 2015. V. 1. No. 1. P. 1018696.
3. Simopoulos A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2002. V. 56. No. 8. P. 365–379.

Toe-seq – новый метод определения сиквенс-специфичности антибиотиков. Сиквенс-специфичность антибиотика этамицина А

Комарова Е. С.^{1,2}, Кабилов М. Р.³, Зотова П. А.¹, Сергеев П. В.^{1,2}

¹ *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия*

³ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

zotova.polinaa@gmail.com

Около половины известных антибиотиков подавляет процесс биосинтеза белка. Часть из них обладает сиквенс-специфичностью, то есть более эффективно подавляет трансляцию полипептидной цепи определенного аминокислотного состава или конкретной нуклеотидной последовательности мРНК [1–3].

Одним из методов, используемых для определения сиквенс-специфичности антибиотиков является тоепринт [4, 5]: с помощью длины продукта обратной транскрипции можно с точностью до нуклеотида определить положение рибосомы на мРНК, в котором произошла остановка трансляции. Тоепринт является наглядным и точным методом, однако он ограничен конкретной последовательностью мРНК, используемой в эксперименте.

Новый метод toe-seq, разработанный в нашей лаборатории, позволяет анализировать большое количество мРНК (порядка 10^4) одновременно. Основой данного метода является тоепринт, который проводится с использованием библиотеки ДНК-матриц с рандомизированными кодирующими последовательностями. Полученные продукты обратной транскрипции анализируются с помощью NGS-секвенирования. Данный метод позволяет определить влияние антибиотика на трансляцию различных мРНК в одном эксперименте.

Новый метод был применен к нескольким антибиотикам, среди которых: эритромицин, хлорамфеникол, тетраценомицин Х, этамицин А. Данные для антибиотиков с известной сиквенс-специфичностью (хлорамфеникол, эритромицин) совпали с имеющимися литературными данными [2, 3]. По результатам toe-seq метода для антибиотика этамицина А была выбрана матрица с мотивом остановки трансляции (в направлении от N-конца к C-концу от положения –2 до А-сайта: fMet-Val-Val-Lys). Для этой матрицы были проведены аминокислотные замены, демонстрирующие влияние аминоацилированной тРНК и встраиваемых в пептидную цепь аминокислот на эффективность трансляции в присутствии этамицина А, эритромицина и тетраценомицина Х. Результаты и выводы будут представлены и обсуждены во время доклада.

Грант РФФ № 21-64-00006.

1. Wilson D. The A–Z of bacterial translation inhibitors // *Biochemistry and Molecular Biology*. 44 (2009). P. 393–433.
2. Choi J. et al. Dynamics of the context-specific translation arrest by chloramphenicol and linezolid // *Nat. Chem. Biol.* 16 (2020). P. 310–317.
3. Kannan K. et al. The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111 (2014). P. 15958–15963.
4. Hartz D. et al. Extension inhibition analysis of translation initiation complexes // *Methods in Enzymology*. 164 (1988). P. 419–425.
5. Carey M., Peterson C., Smale S. The primer extension assay // Cold Spring Harbor Laboratory Press (2013).

**Варианты генов *PLOD2* и *FKBP10*,
ассоциированные с развитием синдрома Брука**

Комиссаров А. Е., Ткачева И. В., Слепнева Е. Э., Саранцева С. В.

НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

tem3650@yandex.ru

Синдром Брука (СБ) – это аутосомно-рецессивное заболевание, сочетающее в себе черты несовершенного остеогенеза и врожденного множественного артрогрипоза. У пациентов с СБ, как правило, присутствуют контрактуры суставов, а также хрупкость костей, приводящая к множественным переломам. Контрактуры представляют собой преимущественно сгибательные деформации крупных суставов (колени, локти, лодыжки) и в меньшей степени мелких суставов (камптодактилия, приводящий большой палец). Данный синдром подразделяют на два типа, вызванных мутациями либо в гене *FKBP10* (СБ1), либо в гене *PLOD2* (СБ2). Гены *FKBP10* и *PLOD2* расположены на хромосомах 17q21.2 и 3q23-q24 соответственно и кодируют резидентные белки эндоплазматического ретикулума, которые играют важную роль в биосинтезе коллагена I типа.

Цель нашей работы – поиск мутаций в генах *PLOD2* и *FKBP10* у пациентов с СБ.

В ходе данной работы было проведено полноэкзомное секвенирование у пациента с СБ. С помощью секвенирования по Сэнгеру производили поиск однонуклеотидных мутаций в генах *PLOD2* и *FKBP10*, ассоциированных с СБ.

В результате исследования были выявлены у одного из пациентов в гене *PLOD2* однонуклеотидные замены rs778254905 и rs121434461. Выявленные мутации находятся в компаунд-гетерозиготном состоянии. У четырех пациентов из второй семьи была обнаружена мутация rs1378540661 в гене *PLOD2*. У больных детей мутация находится в гомозиготном состоянии, а у здоровых – в гетерозиготном. У пациента из третьей семьи была выявлена мутация с.1489 G > A p.Trp497* в гене *FKBP10*, которая приводит к возникновению стоп-кодона TGA. У ребенка из четвертой семьи были обнаружены однонуклеотидные замены rs387906960 и rs782815501 в гетерозиготном состоянии гена *FKBP10*. У здорового родителя пациента обнаружена мутация rs782815501 в гетерозиготном состоянии, однако мутации rs387906960 обнаружено не было. Этот факт подтверждает, что выявленные у пациента мутации находятся в компаунд-гетерозиготном состоянии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-24-00555.

Gistelinck C., Witten P.E. et al. Loss of type I collagen telopeptide lysyl hydroxylation causes musculoskeletal abnormalities in a zebrafish model of Bruck syndrome // *Journal of Bone and Mineral Research*. 31 (11), pp. 1930–1942 (2016).

Получение индуцированных нейронов из дермальных фибробластов путем трансдифференцировки для изучения патогенеза болезни Хантингтона

Красковская Н. А.^{1, 2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

ninakraskovskaya@gmail.com

В настоящем проекте разрабатывается новый подход к моделированию болезни Хантингтона (БХ) *in vitro*. При БХ в первую очередь поражается стриатум, а именно средние шипиковые нейроны (СШН). Основным гистопатологическим признаком БХ является накопление мутантного белка хантингтина в тканях головного мозга. Мы применили новый подход к моделированию БХ, основанный на прямом репрограммировании фибробластов пациентов в индуцированные нейроны при помощи микро-РНК и транскрипционных факторов. Ключевым элементом этого подхода является сохранение эпигенетической информации, заложенной в клетках, что позволяет сохранить возрастассоциированный фенотип заболевания без перехода через стадию индуцированной плюрипотентности.

Мы усовершенствовали протокол, разработанный группой Andrew Yoo [1], для того чтобы получить гомогенную популяцию СШН, одинаковых по своим свойствам и морфофункциональным характеристикам, что, в свою очередь, существенно снижает вариабельность в функциональных исследованиях и облегчает интерпретацию полученных результатов. Полученные путем прямого репрограммирования СШН характеризуются присущим нейрональным клеткам сложным морфологическим строением и имеют развитое дендритное древо. Помимо детектирования классических маркерных белков, таких как MAP2, GABA и DARPP-32, специфичность репрограммирования в нейрональные клетки была доказана серией экспериментов по кальциевой визуализации. Кокультивирование с нейронами коры подтвердило способность репрограммированных нейронов формировать синаптические связи, что было подтверждено окрашиванием на синаптический маркер синапсин-1.

Разрабатываемая клеточная модель БХ может быть полезна для изучения возрастных особенностей патогенеза данной нейропатологии, а также может выступать в качестве тест-системы для разработки лекарственных препаратов на доклинических этапах.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-75-106.

1. Richner M., Victor M.B., Liu Y., Abernathy D., Yoo A.S. MicroRNA-based conversion of human fibroblasts into striatal medium spiny neurons // Nat. Protoc. 2015. V. 10. No. 10. P. 1543–1555.

Получение и характеристика линии первичных дермальных фибробластов для изучения патогенеза болезни Хантингтона

*Красковская Н. А., Кольцова А. М., Малыгина А. В.,
Шатрова А. Н., Хотин М. Г., Михайлова Н. А.*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

ninakraskovskaya@gmail.com

Моделирование нейропатологий на индуцированных нейронах, полученных с помощью технологий репрограммирования клеток, может заполнить важную нишу между клиническими испытаниями и исследованиями на модельных организмах. Важную роль в таких исследованиях играют пациент-специфичные модели на основе клеток самого пациентов. В настоящей работе была получена неиммортилизованная линия дермальных фибробластов от пациента с болезнью Хантингтона (БХ). Пациент – женщина 36 лет с подтвержденным диагнозом БХ. В результате генетического исследования обнаружено 47 повторов кодона CAG в гене белка хантингина. Перед забором ткани пациентка прошла медицинский осмотр. Получено заключение этической комиссии и информированное добровольное согласие донора.

Клетки из фрагмента биоптата кожи выделяли механическим способом и культивировали в среде, содержащей 90 % DMEM/F12 (Биолот, Россия) + 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США). Клетки пересевали с использованием раствора трипсина (0,25 %) – версена (0,2 %) по достижении ими 80 % конфлюэнтности. Кратность посева – 1:3–1:5. Клетки активно пролиферируют, жизнеспособность после криоконсервации составляет 80 %. Эффективность клонирования на 6-м пассаже составляет $10 \pm 1,02$ %. Бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации в полученных клетках не выявлено. Методом проточной цитометрии было показано положительное окрашивание клеток на поверхностные маркеры CD44, CD73, CD90, CD105 и CD34 и отсутствие окраски на CD45 и HLA-DR, что соответствует фенотипу мезенхимных стволовых клеток.

Полученная клеточная линия может быть использована для изучения патологического фенотипа, проявляющегося в фибробластах пациентов с данной нейропатологией. Также при помощи отработанных протоколов фибробласты можно репрограммировать в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, которые далее можно дифференцировать в различные типы нейронов либо непосредственно репрограммировать с помощью трансдифференцировки.

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1063.

Получение и характеристика индуцированных нейронов из первичных дермальных фибробластов, клеток пульпы зуба и клеток слизистой оболочки губ

Красковская Н. А., Морева В. О., Михайлова Н. А., Хотин М. Г.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

ninakraskovskaya@gmail.com

В последние десятилетия стало доступным изучение патологических процессов непосредственно на нейронах человека, полученных методами репрограммирования *in vitro*. В последние годы активно развивается направление, основанное на трансдифференцировке, позволяющее репрограммировать соматические клетки в нейрональные без дедифференцировки до плюрипотентного состояния. Считается, что такой подход позволяет лучше сохранить возрастные аспекты патогенеза нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) [1].

С использованием протокола трансдифференцировки, основанного на микро-РНК и транскрипционных факторах MYT1L и NeuroD2, мы показали, что индуцированные нейроны (ИН) могут быть получены не только из первичных дермальных фибробластов от взрослых доноров, которые обычно выступают в качестве «стартовых» клеток для репрограммирования, но и из клеток пульпы зуба и клеток слизистой оболочки губ (LMSc), также полученных от взрослых доноров.

Линия дермальных фибробластов (DF2) была получена из коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН, клетки пульпы зуба – из Покровского банка стволовых клеток, а LMSc были ранее получены и охарактеризованы в Центре клеточных технологий ИНЦ РАН [2]. Эти клетки имеют схожую морфологию и пролиферативные свойства. Клетки трех линий репрограммировали в одинаковых условиях согласно протоколу в течение 35 дней [3]. По окончании трансдифференцировки часть клеток окрашивали антителами к нейрональному маркеру MAP2, а часть анализировалась при помощи кальциевой визуализации. Полученный анализ продемонстрировал развитие деполяризации мембраны в ответ на стимуляцию 56-мМ раствором хлорида калия, а также положительное окрашивание на MAP2 в ИН, полученных от всех трех линий клеток, что свидетельствует об успешном репрограммировании клеток трех линий в ИН.

Получаемые ИН могут быть новой клеточной моделью при доклинической оценке эффективности разрабатываемых фармакологических агентов и терапевтических подходов для персонализированной терапии НДЗ.

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1063.

1. Huh C.J., Zhang B., Victor M.B. et al. Maintenance of Age in Human Neurons Generated by MicroRNA-Based Neuronal Conversion of Fibroblasts // eLife. V. 5: e18648 (2016).
2. Zhurenkov K.I., Alexander-Sinkler E.I., Gavriilyk I.O., Yartseva N.M., Aleksandrova S.A., Mashel T.V., Khorolskaya J.I., Blinova M.I., Kulikov A.N., Churashov S.V., Chernysh V.F., Mikhailova N.A. Labial Mucosa Stem Cells: Isolation, Characterization, and Their Potential for Corneal Epithelial Reconstruction // Invest. Ophthalmol Vis. Sci. V. 63 (8): 16 (2022).
3. Church V.A., Cates K., Capano L. et al. Generation of Human Neurons by MicroRNA-Mediated Direct Conversion of Dermal Fibroblasts // Methods Mol. Biol. V. 2239: 77–100 (2021).

**Влияние комплексного аллеля р.[F508del;L467F]
на клиническое течение муковисцидоза и эффективность
таргетной терапии на модели кишечных органоидов**

Краснова М. Г., Ефремова А. С., Гольдштейн Д. В.

Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва, Россия

alekseeva_ea@pnpi.nrcki.ru

Муковисцидоз – аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости *CFTR*, продуктом которого является ионный канал, переносящий ионы хлора через мембраны эпителиальных клеток.

В российской когорте пациентов с муковисцидозом комплексный аллель р.[L467F;F508del] гена *CFTR* является малоизученным. Проведенное исследование позволило оценить частоты комплексного аллеля р.[F508del;L467F] в РФ среди пациентов с генотипом F508del/F508del, влияние его на клиническую картину муковисцидоза, на функцию ионных каналов кишечного эпителия и эффективность таргетной терапии. Частоту комплексного аллеля р.[L467F;F508del] среди гомозигот F508del определяли с помощью мультиплексной лигазозависимой амплификации проб с дальнейшим проведением полимеразной цепной реакции и фрагментарным анализом. Функцию ионных каналов, включая остаточную функцию *CFTR*, и эффективность *CFTR*-модуляторов исследовали, используя метод определения разницы кишечных потенциалов на ректальных биоптатах и форсколиновый тест на модели кишечных органоидов [1, 2]. Определение индивидуальных особенностей функционирования *CFTR*-канала способствует наиболее эффективному использованию *CFTR*-модуляторов, помогая подобрать оптимальную персонализированную терапию [3].

Результаты показали, что частота встречаемости генотипа F508del/[L467F;F508del] составляет 8,2 % среди пациентов РФ, несущих мутацию F508del в гомозиготном состоянии. Клиническое течение заболевания у пациентов с генотипом F508del/[F508del;L467F] соответствует тяжелому и не отличается от группы гомозигот по варианту F508del, хотя функция канала *CFTR* снижена в большей степени. Пациентам с генотипом F508del/[F508del;L467F] может быть рекомендована патогенетическая терапия комбинированным препаратом, сочетающим ивакафтор/тезакафтор/элексакафтор (Трикафта®).

Выражаем благодарность Кондратьевой Е. И., Мельяновской Ю. Л., Воронковой А. Ю., Шерман В. Д., Булатенко Н. В., Полякову А. В., Ковальской В. А., Бухаровой Т. Б. за участие и внесенный вклад в работу.

1. Vonk A.M. et al. // STAR Protocol, 1, 1 (2020).
2. Dekkers J.F. et al. // Science Translational Medicine, 8, 344 (2016).
3. Beekman J.M. // Pediatric Pulmonology, 51, 6 (2016).

Транслезионная активность ДНК-полимераз человека напротив 7,8-дигидро-8-оксоаденина

Кручинин А. А.¹, Аралов А. В.², Макарова А. В.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва, Россия

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

kruchinin77@gmail.com

7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-охоG) и 7,8-дигидро-8-оксоаденин (8-охоА) – наиболее распространенные повреждения ДНК, индуцированные окислительным стрессом. 8-охоА составляет до 30 % от повреждений 8-охоG [1, 2]. 8-охоG и 8-охоА обладают высоким мутагенным потенциалом, поскольку в процессе репликации ДНК-полимеразы с высокой долей вероятности включают напротив данных повреждений некомплементарные нуклеотиды. Процесс синтеза ДНК на участках, содержащих повреждения, называется транслезионным синтезом [3]. Транслезионная активность ДНК-полимераз человека напротив 8-охоG достаточно хорошо охарактеризована, в то время как исследований, посвященных 8-охоА, очень мало.

Был проведен анализ точности и эффективности синтеза напротив 8-охоА и контрольного неповрежденного А для транслезионных и репаративных ДНК-полимераз человека семейств X и Y. Для репаративных ДНК-полимераз Pol β и Pol λ семейства X наблюдалось умеренное снижение эффективности «прохождения» 8-охоА и умеренное включение некомплементарных dAMP и dGMP. Среди транслезионных ДНК-полимераз семейства Y высокую точность и эффективность копирования 8-охоА продемонстрировала Pol κ. Pol η вела эффективный, но мутагенный синтез напротив повреждения, с высокой эффективностью включая не только dTMP, но и dAMP и dGMP. Для Pol ι было показано резкое падение эффективности включения нуклеотидов напротив 8-охоА, нехарактерное для 8-охоG.

Важно отметить, что эффективность и точность транслезионной активности большинства исследованных ферментов напротив 8-охоА в значительной степени отличались от 8-охоG. Полученные данные расширяют представление о промутагенных свойствах 8-охоА.

1. Koag M.C., Jung H., Lee S. Mutagenic Replication of the Major Oxidative Adenine Lesion 7,8-Dihydro-8-Oxoadenine by Human DNA Polymerases // J. Am. Chem. Soc. 2019, 141, 4584–4596, doi:10.1021/jacs.8b08551
2. Yudkina A.V., Shilkin E.S., Endutkin A.V., Makarova A.V., Zharkov D.O. Reading and Misreading 8-Oxoguanine, a Paradigmatic Ambiguous Nucleobase // Crystals. 2019, 9, 1–31, doi:10.3390/cryst9050269

3. Shilkin E.S., Boldinova E.O., Stolyarenko A.D., Goncharova R.I., Chuprov-Netochin R.N., Khairullin R.F., Smal M.P., Makarova A.V. Translesion DNA Synthesis and Carcinogenesis // *Biochem.* 2020, 85, 425–435, doi:10.1134/S0006297920040033

Признаки депрессии у крыс при экспериментальной марганцевой энцефалопатии

Кудринская В. М.¹, Излева И. С.²

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербурга, Россия

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербурга, Россия

v.kudrinskaja2011@yandex.ru

Марганец (Mn) является эссенциальным элементом [1]. Накопление Mn в клетках ЦНС приводит к развитию нейropsychологических и двигательных нарушений, включая развитие депрессии [2]. Одним из механизмов токсического действия Mn является изменение в синтезе нейромедиаторов. Влияние избыточных уровней Mn приводит к значительному снижению уровня норадреналина, что, в свою очередь, способствует нарушению внимания, двигательной дисфункции [3]. В связи с этим целью данной работы было оценить влияние избыточного поступления Mn на развитие депрессивноподобного поведения у крыс.

Работа выполнена на взрослых самцах крыс Вистар, 220–250 г. Животные были разделены на две группы: первой группе интраназально вводили раствор $MnCl_2$ (1 мг/жив. в объеме 20 мкл/день), а второй группе – 20 мкл физиологического раствора в течение 34 дней. Для оценки депрессивноподобного поведения применялся тест «принудительное плавание», который был проведен на 8-й и 29-й дни эксперимента. Было показано, что у крыс, получавших хронические интраназальные инъекции $MnCl_2$, наблюдается снижение среднего времени активного плавания в 5 раз, по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать о нарушении в серотонинергической нейротрансмиссии. Оценку тревожности проводили с помощью теста «открытое поле» на 33-й день эксперимента. Хроническое интраназальное введение $MnCl_2$ приводит к уменьшению количества актов «груминг» в 1,8 раза, заглядываний в норки в 1,7 раза и количества стоек с упором в 1,7 раза по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о повышенной тревожности у лабораторных животных.

Таким образом, можно заключить, что интраназальное введение $MnCl_2$ на протяжении 34 дней приводит к развитию повышенной тревожности и депрессии у лабораторных крыс.

1. Martins A.C. et al. Manganese in the diet: bioaccessibility, adequate intake, and neurotoxicological effects // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2020. V. 68. No. 46. P. 12893–12903.

2. Racette B.A. et al. Depression and anxiety in a manganese-exposed community // *Neurotoxicology*. 2021. V. 85. P. 222–233.
3. Conley T.E. et al. Early postnatal manganese exposure causes arousal dysregulation and lasting hypofunctioning of the prefrontal cortex catecholaminergic systems // *Journal of Neurochemistry*. 2020. V. 153. No. 5. P. 631–649.

Оптимизация реконституции в нанодиски мембранных белков из экстремофильных архей

Куклина Д. Д.¹, Рижиков Ю. Л.^{1,2}, Осипов С. Д.¹, Рулёв М. И.²,
Куклин А. И.^{1,2}, Гущин И. Ю.¹, Горделий В. И.³

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

² *Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия*

³ *Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Grenoble, France*

kuklina.dd@phystech.edu

Объектом исследования является белковый комплекс сенсорного родопсина II (SRII) с его родственным трансдюсером (HtrII). В клетках галоархей *Natronomonas pharaonis* фоторецептор SRII/HtrII отвечает за отрицательный фототаксис и, как и рецепторы некоторых других двухкомпонентных систем (ДКС), образует тримеры димеров в мембране [1]. Известно, что *N. pharaonis* оптимально растет при высокой концентрации NaCl – 3,5 М; соответственно, концентрация соли существенно влияет на структуру и олигомерное состояние комплекса SRII/HtrII [2]. С помощью данных малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) было показано, что при высокой ионной силе раствора (4,0 М NaCl) образуются тримеры димеров, а при низкой – наблюдаются только димеры [3, 4]. Ранее с помощью гель-фильтрации (ГФ) нами было показано, что предынкубированный в буфере с высокой концентрацией соли белок остается тримером димеров при понижении содержания соли в растворе. Полученные данным способом тримеры димеров SRII/HtrII были реконструированы в нанодиски (НД) [5], однако эффективность такой процедуры значительно ниже, чем для димеров комплекса. Качество образцов при этом может быть выше в силу того, что сформированные тримеры димеров образуют правильные междимерные контакты, необходимые для функциональной активности фоторецептора.

В данной работе исследовалась возможность реконструкции белка в НД в условиях высокой ионной силы раствора. Для этого на первом этапе была проведена сборка пустых НД на основе MSP2N2 с DMPC в буфере с 1,0 М сульфата аммония. Данные ГФ показали, что увеличение концентрации соли не повлияло на эффективность сборки НД. Эти результаты позволяют предположить, что можно успешно объединить процессы олигомеризации комплекса и реконструкции его в НД. Это важно для дальнейших исследований сенсоров ДКС, которые могут стать базой для создания нового поколения химерных оптогенетических инструментов на основе сенсорных родопсинов.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 21-64-00018) и РФФИ (грант № 20-54-12027).

1. Orekhov P. *et al.* Sensory Rhodopsin I and sensory Rhodopsin II form trimers of dimers in complex with their cognate transducers // *Photochem. Photobiol.* 93, 796–804 (2017).
2. Budyak I.L. *et al.* Shape and oligomerization state of the cytoplasmic domain of the phototaxis transducer II from *Natronobacterium pharaonis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 15428–15433 (2006).
3. Ryzhykau Y.L., Orekhov P.S., Rulev M.I. *et al.* Molecular model of a sensor of two-component signaling system // *Sci. Rep.* 11, 10774 (2021).
4. Ryzhykau Y.L. *et al.* Ambiguities in and completeness of SAS data analysis of membrane proteins: the case of the sensory rhodopsin II–transducer complex // *Acta Cryst. D.* 77, 1386–1400 (2021).
5. Актуальные аспекты современной микробиологии: сб. тезисов XIII Молодежной школы-конференции с международным участием. М.: Ваш формат, 2022. С. 135–137.

Особенности развития крыс с генетически детерминированным нарушением обмена дофамина

Куликова Е. Д.¹, Трактиров Д. С.²

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

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

kulikovaekaterina77@gmail.com

Синдром дефицита внимания/гиперактивности (СДВГ) – это психоневрологическое поведенческое расстройство, которому подвержены от 5 до 10 % детей во всем мире. Несмотря на большое количество исследований, посвященных СДВГ, этиология этого расстройства изучена плохо, и до сих пор не выявлены однозначные причины возникновения СДВГ [1]. Таким образом, диагностика и лечение СДВГ по-прежнему являются сложной задачей.

Одной из наиболее широко используемых моделей для изучения СДВГ являются животные с нокаутом гена транспортера дофамина (dopamine transporter knock out, DAT-KO) [2]. Крысы DAT-KO демонстрируют повышенную двигательную активность, когнитивные нарушения, компульсивное поведение. Все эти симптомы также характерны и для людей с СДВГ [3].

Целью данной работы являлось изучение динамики созревания нервной системы у потомства крыс линии DAT-KO при их естественном развитии. Для этого скрещивались гетерозиготные самки по нокауту гена *DAT* (DAT-НЕТ) с DAT-НЕТ-самцами. Полученное потомство было генотипировано и поделено на три группы: DAT-WT (дикий тип), DAT-НЕТ (гетерозиготы), DAT-KO (полный нокаут гена *DAT*). Всего в каждую группу вошло 20 животных. Динамика созревания нервной системы оценивалась в тестах «переворот на плоскости», «избегание обрыва», «обонятельная реакция» и «отрицательный геотаксис».

Было обнаружено, что КО-животные демонстрировали задержку в формировании рефлексов «переворот на плоскости» ($H(2, 40) = 7,59, p = 0,023$), «избегание обрыва» ($F(2, 42) = 5,43, p = 0,008$), «обонятельная реакция» ($F(2, 37) = 21,39, p < 0,001$). Для НЕТ-животных наблюдалась задержка в формировании рефлекса «переворот на плоскости» ($H(2, 40) = 7,59, p < 0,001$). Рефлекс «отрицательный геотаксис» формировался во всех трех группах без значимых отличий между скоростью формирования ($F(2, 39) = 2,59, p = 0,087$).

Работа выполнена при поддержке РФФ, проект № 22-25-00124.

1. Sciberras E. et al. Prenatal Risk Factors and the Etiology of ADHD-Review of Existing Evidence // Curr. Psychiatry Rep. 19, 1 (2017).

2. Leo D. et al. Pronounced Hyperactivity, Cognitive Dysfunctions, and BDNF Dysregulation in Dopamine Transporter Knock-out Rats // *J. Neuroscience*. 38, 1959–1972 (2018).
3. Cinque S. et al. Behavioral Phenotyping of Dopamine Transporter Knockout Rats: Compulsive Traits, Motor Stereotypies, and Anhedonia // *Front. Psychiatry*. 9, 43 (2018).

Фактор CHD1 в регуляции экспрессии генов в процессе дозовой компенсации у самцов *Drosophila melanogaster*

Кучинская Я. А.¹, Рыбалкина А. А.^{1,2}, Конев А. Ю.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

kuchinskaya_yaa@npi.nrcki.ru

Для изучения консервативного фактора ремоделирования хроматина CHD1 (Chromo-ATPase/Helicase-DNA-binding protein 1) мы использовали модель дозовой компенсации (ДК) дрозофилы. ДК у данного вида направлена на увеличение экспрессии X-хромосомных генов самцов примерно в 2 раза, что достигается за счет работы комплекса дозовой компенсации (КДК или MSL – male-specific lethal) [1]. Фактор CHD1 способен сдвигать нуклеосомы и индуцировать регулярное расстояние между нуклеосомами [2], его гомологи у млекопитающих вовлечены в том числе в развитие ряда тяжелых заболеваний. Деформация X-хромосомы у самцов дрозофилы на фоне мутации гена *Chd1*, как и связывание белка CHD1 материнского происхождения у таких особей исключительно с X-хромосомой являются предпосылкой для этого исследования [3]. Нами показано, что фактор CHD1 специфически привлекается к X-хромосоме самцов и такое привлечение связано с процессом ДК. Именно X-хромосомные сайты являются наиболее предпочтительными для связывания фактора CHD1 в норме и при малом количестве белка (у нуль-мутантных по гену *Chd1* самцов), но при избыточном количестве белка CHD1 в результате сверхэкспрессии различия в локализации между самцами и самками исчезают, а также появляются эктопические сайты локализации КДК в аутосомах.

Нами были обнаружены ткане- и стадиеспецифические изменения в экспрессии входящих в КДК длинных некодирующих РНК гоX1 и гоX2 на фоне нуль-мутации гена *Chd1*. При этом в наибольшей степени влияние соответствующей мутации выявляется в головах 4- и 10-дневных имаго. Также показаны различия профилей экспрессии X-хромосомных и аутосомных генов у личинок обоих полов дикого типа и *chd1* нуль-мутантов, полученные методом РНК-секвенирования. Мутантные по гену *Chd1* самцы имеют достоверный сдвиг в распределении плотности \log_2 fold change в сторону увеличения экспрессии для X-хромосомных генов по сравнению с аутосомными. При этом для мутантных самок существенных отличий в экспрессии X-хромосомных генов от дикого типа обнаружено не было.

1. Conrad T., Akhtar A. Dosage compensation in *Drosophila melanogaster*: epigenetic fine-tuning of chromosome-wide transcription // Nat. Rev. Genet. 2012. V. 13. No. 2. P. 123–134.
2. Lusser A., Urwin D.L., Kadonaga J.T. Distinct activities of CHD1 and ACF in ATP-dependent chromatin assembly // Nat. Struct. Mol. Biol. 2005. V. 12. P. 160–166.
3. Tiutiunnik A., Baranovskaya I., Kuchinskaya Y., Gnennaya Y., Shalaev A., Konev A. The role of the chromatin-remodelling factor CHD1 in the global organization of *Drosophila* chromosomes // Biopolymers & Cell. 2019. V. 35. No. 3. P. 174–175.

Экспрессия сплайсинг-вариантов гена *SNCA* в лимфоцитах периферической крови при синуклеинопатиях

Лавринова А. О.¹, Журавлев А. С.¹, Фаюд Х. Д.¹, Белых Е. А.¹, Тюрин А. А.²,
Милюхина И. В.^{1, 2, 3}, Беркович О. А.², Пчелина С. Н.^{1, 2}, Емельянов А. К.^{1, 2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

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

³ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

lavrinova.anna@gmail.com

Синуклеинопатии: болезнь Паркинсона (БП), мультисистемная атрофия (МСА), деменция с тельцами Леви (ДТЛ), БП с деменцией (БПД) – характеризуются накоплением и агрегацией белка альфа-синуклеина в различных отделах головного мозга. Все больше появляется данных о вовлеченности в патогенез синуклеинопатий различных изоформ белка альфа-синуклеина (*SNCA*) [1]. К настоящему времени показано увеличение экспрессии сплайсинг-вариантов гена *SNCA* (*SNCA-126* и *SNCA-112*) в клетках мозга при различных синуклеинопатиях [1, 2]. Исследования по оценке их экспрессии в клетках периферической крови пациентов с различными синуклеинопатиями остаются единичными [3].

Таким образом, целью нашего исследования являлась оценка относительного уровня мРНК сплайсинг-вариантов гена *SNCA* (*SNCA-112*, *SNCA-126*) у пациентов с синуклеинопатиями в клетках периферической крови.

В исследование было включено 49 пациентов с синуклеинопатиями (возраст $63,6 \pm 9$ лет, возраст начала заболевания $60,7 \pm 9,6$ года) (13 МСА, 3 ДТЛ, 4 БПД и 29 пациентов с БП, не принимающих Л-ДОФА-терапию) и 26 индивидуумов контрольной группы (возраст $65,2 \pm 6,6$ года). С использованием ПЦР в режиме реального времени и интеркалирующего красителя SYBR Green 1 (SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad, США) был оценен уровень мРНК сплайсинг-вариантов гена *SNCA* в моноклеарной фракции периферической крови указанных групп. Относительный уровень мРНК исследуемых генов оценивался относительно двух референсных генов (*SDHA*, *RPLPO*) с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Не обнаружено статистически значимой разницы относительного уровня мРНК сплайсинг-вариантов гена *SNCA* у пациентов с синуклеинопатиями по сравнению с группой контроля ($p > 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что синуклеинопатии не сопровождаются изменением экспрессии сплайсинг-вариантов гена *SNCA* (*SNCA-112*, *SNCA-126*) в клетках периферической крови.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме: «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения» (регистрационный номер 121060200125-2).

1. Gámez-Valero A., Beyer K. Alternative Splicing of Alpha- and Beta-Synuclein Genes Plays Differential Roles in Synucleinopathies // *Genes (Basel)*. 2018; 9 (2): 63.
2. McLean J.R., Hallett P.J., Cooper O. et al. Transcript Expression Levels of Full-Length Alpha-Synuclein and Its Three Alternatively Spliced Variants in Parkinson's Disease Brain Regions and in a Transgenic Mouse Model of Alpha-Synuclein Overexpression // *Mol. Cell. Neurosci.* 2012; 49 (2): 230–9.
3. Marsal-García L., Urbizu A., Arnaldo L. et al. Expression Levels of an Alpha-Synuclein Transcript in Blood May Distinguish between Early Dementia with Lewy Bodies and Parkinson's Disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22 (2): 725.

Протонуправляемые ионные каналы ASIC1 и ASIC3 в клетках миелоидной лейкемии человека

Лысикова Д. В.¹, Васильева В. Ю.¹, Кириллова П. И.^{1, 2},
Чубинский-Надеждин В. И.¹, Сударикова А. В.¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

Darya25198@gmail.com

Появляется все больше доказательств того, что протонуправляемые ионные каналы ASIC (acid sensing ion channels) играют важную роль в поведении опухолевых клеток [1], в том числе при злокачественных новообразованиях системы крови [2]. Ранее в клетках миелоидной лейкемии человека K562 нами были обнаружены функционально активные амилоридчувствительные каналы ASIC1a. Их селективное блокирование токсином мамбалгином-2 тормозило пролиферацию клеток, вызывая арест клеточного цикла в G1-фазе [3].

Целью данной работы является оценка функциональной экспрессии и возможностей активации различных представителей семейства каналов ASIC в клетках K562 при варьировании внеклеточного pH. В конфигурации whole-cell метода пэтч-кламп в клетках миелоидной лейкемии мы обнаружили, что быстрое изменение pH наружного раствора с 7,4 до 5,0 (или 5,5) вызывало активацию ионных токов с различной кинетикой. Одни каналы характеризовались быстрым нарастанием амплитуды тока до максимальной и более медленным спадом в ходе десенситизации до стационарного уровня (свойственно для каналов ASIC1), другие же имели промежуточное состояние при их инактивации, которое более характерно для ASIC3. Все протонактивируемые токи блокировались бензамиллом (аналогом амилорида) в концентрации 1–10 мкМ. Известно, что в зависимости от субъединичного состава каналов ASIC меняется их чувствительность к закислению среды, а значение pH-50, необходимое для полумаксимальной активации каналов, варьируется в пределах от 4,8 до 6,7 [4].

Мы обнаружили, что при изменении pH раствора от 5,0 до 5,5 наблюдалось увеличение амплитуды регистрируемых протончувствительных токов, однако точное значение pH-50 еще предстоит выяснить. С помощью ОТ-ПЦР-анализа и иммунофлуоресцентной микроскопии в клетках K562 мы подтвердили экспрессию каналов ASIC1 и ASIC3, но не ASIC2. Таким образом, мы выявили вероятных кандидатов среди каналов ASIC, которые функционируют в мембране клеток K562.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-25-00126.

1. Liu C., Zhu L.L. et al. // *J. Cancer*. 7(13): 1888–1891 (2016).
2. Rafieemehr H., Samimi A. et al. // *Clin. Transl Oncol*. 22 (3): 283–293 (2020).
3. Bychkov M.L., Shulepko M.A. et al. // *Acta Naturae*. 12 (2): 101–116 (2020).
4. Hanukoglu I. // *FEBS J*. 284 (4): 525–545 (2017).

Влияние рекомбинантных белков TGF-β3 и SOX9 на экспрессию генов хондрогенеза в дермальных фибробластах человека

Марченко Д. М.¹, Божокин М. С.^{1,2}, Михайлова Е. Р.¹, Хотин М. Г.¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

berbimot@yandex.ru

Проблема восстановления суставов после повреждений является актуальной для миллионов людей [1]. Гиалиновый хрящ обладает ограниченной способностью к регенерации, поэтому даже небольшие его дефекты приводят к дальнейшей дегенерации ткани [2]. Одним из перспективных подходов по восстановлению хряща является применение клеточно-инженерных конструкций (КИК), которые состоят из культуры клеток и биodeградируемого носителя [3]. Многообещающим направлением регенеративной медицины хряща является использование аллогенных клеток, например фибробластов. Они относительно легкодоступны и неиммуногенны. Однако для более эффективного действия КИК необходимо модифицировать фибробласты в хондрогенном направлении, в т. ч. с помощью рекомбинантных белков. В качестве таких рекомбинантных белков могут выступать цитокин TGF-β3 и транскрипционный фактор SOX9 – важнейшие молекулы в процессе хондрогенеза.

Целью данной работы было исследование влияния рекомбинантных белков TGF-β3 и SOX9 на изменение экспрессии генов хондрогенеза в дермальных фибробластах человека.

В исследовании использовали клеточную культуру дермальных фибробластов человека линии DF2, полученную из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ИИЦ РАН. В питательную среду к клеткам добавляли параллельно рекомбинантные белки SOX9 в концентрациях от 1 до 20 нг/мл или TGF-β3 в концентрации 10 нг/мл. Клетки инкубировали с этими белками в течение 7, 14 и 21 дня в стандартных условиях. Эффективность белковой модификации анализировали по изменению экспрессии генов, ответственных за хондрогенез (*Tgf-β3*, *Sox9*, *Col2α1*, *Acan*, *Comp*), относительно экспрессии гена домашнего хозяйства *Gapdh* с помощью метода RT-PCR.

В ходе работы было обнаружено, что добавление в питательную среду рекомбинантных белков TGF-β3 и SOX9 не оказывает влияния на экспрессию генов хондрогенеза. Таким образом, было показано, что при помощи рекомбинантных белков TGF-β3 и SOX9 не происходит активация хондрогенной дифференцировки в дермальных фибробластах.

1. Widuchowski W., Widuchowski J., Trzaska T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies // *Knee*. 14, 3, 177–182 (2007).
2. Божокин М. С., Божкова С. А., Нетылько Г. И. и др. Морфофункциональная характеристика хондрорегенераторного процесса в экспериментальном локальном дефекте поверхности суставного хряща // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 8, 302–306 (2017).
3. Jeuken R., Roth A., Peters R. et al. Polymers in cartilage defect repair of the knee: current status and future prospects // *Polymers*. 8, 6, 219 (2016).

Исследование метаболома нокаутных животных методом спектроскопии ЯМР

Марьясина С. С., Аверина О. А., Сергеев П. В., Польшаков В. И.

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

Метаболом – совокупность метаболитов, т. е. низкомолекулярных веществ, принимающих участие в химических реакциях, протекающих в клетке. К метаболитам относятся все биомолекулы, за исключением биополимеров: белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот. В зависимости от задачи объектом исследования может быть метаболом клетки, органа или целого организма.

Метаболомный профиль позволяет получать информацию о реакции организма на различные факторы, среди которых как внешние воздействия (например, состав питания или введение в рацион лекарственных препаратов), так и внутренние (в т. ч. неправильное функционирование каких-либо генов или наличие заболеваний).

Метаболом млекопитающих включает около 200 000 индивидуальных соединений [1]. Для анализа низкопредставленных метаболитов в основном используют различные варианты хроматографических методов в сочетании с масс-спектрометрией. Эта комбинация обеспечивает высокую чувствительность, однако имеет ограниченную воспроизводимость, отличается сложностью и дороговизной пробоподготовки. В то же время наиболее представленные метаболиты могут быть качественно и количественно проанализированы с помощью спектроскопии ЯМР. Измерения метаболома этим методом отличаются высокой воспроизводимостью и простотой пробоподготовки.

В рамках настоящей работы методами ЯМР-метаболомики изучен фенотип мышей, нокаутных по нескольким генам: двух метилтрансфераз, участвующих в метилировании сплайсосомы, метилтрансферазы, отвечающей за модификацию миторибосомы [2], а также небольшого митохондриального пептида миторегулина [3]. Методами спектроскопии ЯМР количественно охарактеризовано около 70 метаболитов в образцах мочи и около 60 – в образцах плазмы крови животных. Сравнение метаболома нокаутных животных с линиями дикого типа позволило установить связь между функциями генов и их фенотипическим проявлением.

Работа выполнена при поддержке РФФ (19-14-00115) и НТП (121121300155-6).

1. Wishart D.S. et al. HMDB 5.0: the human metabolome database for 2022 // *Nucleic Acids Research*. 2022. V. 50. No. D1. P. D622–D631.
2. Averina O.A. et al. Mitochondrial rRNA Methylation by Mettl15 Contributes to the Exercise and Learning Capability in Mice // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23. P. 6056.

3. Averina O.A. et al. Mitochondrial peptide Mtl α contributes to oxidative metabolism in mice // *Biochimie*. 2023. V. 204. P. 136–139.

Протеолиз флуоресцентных белков может препятствовать детекции приона [*PS⁺*] у дрожжей

Матвеевко А. Г., Михайличенко А. С., Данилов Л. Г.,
Барбитов Ю. А., Журавлева Г. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

a.matveenko@spbu.ru

[*PS⁺*] представляет собой прионную форму фактора терминации трансляции eRF3 (Sup35) у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Агрегированный Sup35 вызывает нарушения терминации трансляции, что приводит к нонсенс-супрессии у штаммов, несущих преждевременные стоп-кодоны. N-концевой и средний (M) домены Sup35 необходимы и достаточны для поддержания [*PS⁺*] в клетках (см. [1]). Поэтому Sup35NM, слитый с флуоресцентными белками, часто используется для детекции [*PS⁺*] и исследования его свойств (см. [2]).

В нашей работе мы обнаружили, что в таких химерных конструкциях не все флуоресцентные белки позволяют надежно детектировать агрегаты Sup35. В частности, временная продукция Sup35NM-mCherry приводила к диффузной флуоресценции в клетках [*PS⁺*], притом что мы не наблюдали потери приона или изменения его свойств. Этот эффект воспроизводился в различных неродственных штаммах с различными вариантами [*PS⁺*]. Однако Sup35NM, слитый с другим красным флуоресцентным белком TagRFP-T, позволял детектировать агрегаты [*PS⁺*].

Анализ белковых лизатов показал, что Sup35NM-mCherry активно деградирует в клетке. Эта деградация не связана с вакуолярными протеазами, участвующими в процессинге Sup35, или с убиквитин-протеасомной системой. Хотя интенсивность этого протеолиза была выше, чем у Sup35NM-GFP, она была примерно такой же, как в случае Sup35NM-TagRFP-T [3]. По-видимому, в отличие от Sup35NM-TagRFP-T, продукты деградации Sup35NM-mCherry, которые теряют способность связываться с предсуществующими агрегатами Sup35, все еще сохраняют свои флуоресцентные свойства. Это приводит к диффузному свечению, несмотря на наличие прионных агрегатов в клетке.

Таким образом, мечение флуоресцентными белками следует использовать с осторожностью, так как их протеолиз может увеличить частоту ложноотрицательных результатов при обнаружении клеток, несущих прионы.

1. Serio T.R., Lindquist S.L. [*PS⁺*]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 15, 661–703 (1999).
2. Greene L.E., Park Y.N., Masison D.C., Eisenberg E. Application of GFP-labeling to study prions in yeast // *Protein and Peptide Letters*, 16 (6), 635–641 (2009).

3. Matveenکو A.G., Ryzhkova V.E., Zaytseva N.A., Danilov L.G., Mikhailichenko A.S., Barbitoff Y.A., Zhouravleva G.A. Proc. of Fluorescent Proteins May Prevent Detection of Prion Particles in [PS*] Cells // Biology, 11 (12), 1688 (2022).

Агрегация адаптерного белка синтазы оксида азота 1 и его взаимодействие с альфа-синуклеином

Матиив А. Б.¹, Москаленко С. Е.^{1,2}, Сергеева О. С.¹,
Журавлева Г. А.^{1,3}, Бондарев С. А.^{1,3}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики
им. Н. И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии
амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

antonmatiiv@yandex.ru

Ген *NOS1AP* кодирует цитозольный белок, который связывается с компонентом сигнального каскада – нейрональной синтазой оксида азота (nNOS). Этот ген связывают со многими психическими расстройствами, такими как шизофрения, посттравматическое стрессовое расстройство, биполярное аффективное расстройство и аутизм [1]. Белок NOS1AP (ранее известный как CAPON) опосредует передачу сигналов в комплексе, который включает NMDA-рецептор, а также белки PSD-95 и nNOS [2]. Этот адаптерный белок участвует в регуляции синтеза оксида азота (NO) посредством его ассоциации с nNOS. С помощью биоинформатического анализа мы выявили, что белок NOS1AP является потенциально амилоидогенным, а также смогли выделить в нем участки, склонные к агрегации. В результате такого анализа также было показано, что NOS1AP способен физически взаимодействовать с α -синуклеином, агрегаты которого являются маркером синуклеинопатий [3]. Дальнейшее исследование показало, что NOS1AP, а также его фрагменты образуют устойчивые к детергентам неамилоидные агрегаты при сверхпродукции. Сверхэкспрессия *NOS1AP* была обнаружена у крыс при повреждении нервной системы, а также у пациентов с шизофренией [4].

Таким образом, мы впервые смогли предположить, что молекулярные механизмы, лежащие в основе этих нарушений, включают неправильную укладку и агрегацию белка NOS1AP. Мы обнаружили, что фрагмент белка NOS1AP способен ускорять агрегацию α -синуклеина *in vitro*. Мы также впервые показали физическое взаимодействие NOS1AP с α -синуклеином в клетках дрожжей и млекопитающих. Результаты нашей работы позволяют предположить, что NOS1AP может быть вовлечен в развитие синуклеинопатий и что его агрегация может объяснять связь между болезнью Паркинсона и шизофренией.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-74-10042.

1. Freudenberg F., Althoa A., Reif A. Neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and its adaptor, NOS1AP, as a genetic risk factors for psychiatric disorders // *Genes, Brain Behav.* 14, 1 (2015).
2. Jaffrey S.R., Snowman A.M., Eliasson M.J. et al. CAPON: A protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95 // *Neuron.* 20, 1 (1998).
3. Gómez-Benito M., Granado N., García-Sanz P. et al. Modeling Parkinson's disease with the alpha-synuclein protein // *Front. Pharmacol.* 11 (2020).
4. Xu B., Wratten N., Charych E.I. et al. Increased expression in dorsolateral prefrontal cortex of CAPON in schizophrenia and bipolar disorder // *PLoS Med.* 2, 10 (2005).

**Изучение нонсенс-супрессорных свойств штаммов
дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с плазмидной копией гена *TEF2*
в качестве единственного источника eEF1A**

Михайличенко А. С., Матвеевко А. Г., Журавлева Г. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

anast1221@gmail.com

Гены *TEF1* и *TEF2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* имеют почти идентичные рамки считывания, и оба кодируют фактор элонгации трансляции eEF1A [1]. Ранее было показано, что некоторые доминантные мутации в данных генах влияют на нонсенс-супрессию [2]. Чтобы понять механизмы этого влияния, мы задались целью попробовать получить аналогичные рецессивные мутации. Однако для достижения данной цели необходимо было получить штаммы, в которых мутантная аллель гена *TEF1/2* кодировала бы единственную форму eEF1A. Один из предложенных нами способов решения данной задачи заключался в том, чтобы делетировать *TEF1* у штаммов, уже содержащих делецию *TEF2*, и одновременно привнести в клетки плазмиду с мутантной аллелью *TEF2*. Для увеличения эффективности мы использовали систему CRISPR/Cas9 [3].

Эффективность данного способа оказалась крайне низка, однако в процессе работы удалось получить штаммы с делециями *TEF1* и *TEF2*, у которых ген *TEF2* дикого типа находится на плазмиде. Поскольку делеция одного из генов *TEF1* или *TEF2* приводит к снижению уровня нонсенс-супрессии [4], мы предполагали, что полученные нами штаммы будут характеризоваться уровнем нонсенс-супрессии, сходным с таковым у штаммов с делецией одного из генов *TEF1/2*, ведь они тоже несут лишь одну копию данного гена, однако выяснилось, что для штаммов, полученных данным способом, характерен уровень супрессии даже выше, чем у дикого типа. При этом проверка при помощи ПЦР в реальном времени подтвердила наличие лишь одной копии плазмиды с *TEF2*.

Мы решили проверить супрессорные свойства штаммов, несущих на плазмиде различные аллели гена *TEF2*. Нам удалось обнаружить аллель *TEF2-Ter*, которая хоть и усиливала нонсенс-супрессию, но с меньшей интенсивностью, чем аллель дикого типа. А также мы показали, что доминантная супрессорная мутация *TEF2-4*, представленная на плазмиде, усиливала нонсенс-супрессорные свойства штаммов. Следовательно, с помощью полученных штаммов можно выявлять мутации в гене *TEF2*, влияющие на его собственный доминантный супрессорный эффект.

1. Schirmaier F., Philippsen P. // The EMBO Journal. 3311–3315, 13 (1984).
2. Sandbaken M.G., Culbertson M.R. // Genetics. 923–934, 4 (1988).

3. DiCarlo J.E., Norville J.E. *et al.* // Nucleic Acids Research. 4336–4343, 41 (2013).
4. Song J.M., Picologlou S. *et al.* // Molecular and Cellular Biology. 4571–4575, 10 (1989).

Исследование влияния плазменной обработки на морфологию биомедицинских полилактидных матрицков и адгезию нейрональных клеток методами растровой электронной, конфокальной лазерной сканирующей и флуоресцентной микроскопии

Михуткин А. А.¹, Ястремский Е. В.², Азиева А. М.¹, Пацаев Т. Д.¹, Кириллова Д. А.¹, Шариков Р. В.¹, Шарикова Н. А.¹, Антипова К. Г.¹, Луканина К. И.¹, Григорьев Т. Е.¹, Васильев А. Л.^{1, 2}

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия*

² *Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия*

Alex.Mikhutkin@gmail.com

Важную роль в тканевой инженерии играют адгезионные свойства внеклеточных матрицков: их морфология и структура поверхности являются определяющими для роста и развития клеток с последующим формированием ткани. В частности, при разработке искусственных внеклеточных матрицков из биополимерных материалов достижение оптимальных характеристик в процессах клеточной адгезии для регенеративной медицины имеет большое значение.

Исследовалось влияние плазменной обработки полилактидных матрицков различных типов – пленок, губок и нетканых (волокнистых) материалов – на их морфологию, гидрофильность поверхности и адгезию культивированных на них нейрональных клеток новорожденных мышей. Определение морфологических особенностей матрицков проводилось методами растровой электронной микроскопии (РЭМ), для численной оценки изменения рельефа [1] применялся метод трехмерной реконструкции поверхности по изображениям с РЭМ на базе стереофотограмметрического подхода [2]. Кроме этого, методом РЭМ в условиях естественной среды исследована смачиваемость поверхности после модификации поверхности плазмой. Общая трехмерная морфология матрицков исследовалась методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [3]. Степень адгезии клеток количественно характеризовалась по данным флуоресцентной микроскопии.

В результате выявлено, что обработка плазмой ведет к образованию рельефа на поверхностях всех рассматриваемых типов матрицков, заметно увеличивая шероховатость, а также улучшает их гидрофильность. Наблюдается увеличение адгезии клеток нейрональной культуры на большинстве матрицков.

Работа была проведена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» и частичной поддержке РФФИ (грант № 21-13-00321).

1. Ястремский Е. В. и др. // Кристаллография. 67 (3), 451 (2022).
2. Михуткин А. А. и др. // Кристаллография. 59 (6), 999 (2014).
3. Mikhutkin A.A. et al. // BioNanoScience. 8, 511 (2018).

**Относительные количества метилтрансферазы и эндонуклеазы
рестрикции системы рестрикции-модификации влияют
на эффективность защиты от бактериофага**

Морозова Н. Е., Кириллов А. А., Ходорковский М. А.

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

natusmorozovna@gmail.com

Множественная устойчивость бактерий к антимикробным препаратам является одной из важнейших проблем современности. Безответственное применение антибиотиков привело к возникновению большого количества мультирезистентных патогенных штаммов бактерий, и их количество постоянно растет [1]. Таким образом, чрезвычайно важным является поиск новых стратегий борьбы с различными бактериальными инфекциями.

Вирусы бактерий – бактериофаги – имеют хорошие перспективы для борьбы с мультирезистентными патогенами. Однако эффективность фаговых препаратов остается малоизученной; кроме того, ее уменьшает наличие у бактерий механизмов борьбы с вирусами. Детальное изучение механизмов работы защитных систем бактерий может значительно помочь в создании эффективных антибактериальных фаговых препаратов [2].

Системы рестрикции-модификации чрезвычайно широко распространены и являются одними из самых часто встречающихся защитных систем бактерий и архей от вирусов [3]. Системы рестрикции-модификации II типа являются самыми широко используемыми в биотехнологии и состоят из двух ферментов: метилтрансферазы (МТ) и эндонуклеазы рестрикции (ЭР), первый из которых модифицирует геном бактерии, защищая от деградации с помощью ЭР, а второй деградирует чужеродную вирусную ДНК, не имеющую внесенных МТ-модификаций.

Изучение механизмов регуляции систем рестрикции-модификации и причин преодоления защитного действия этих систем бактериофагами должно позволить глубже понять особенности взаимодействия бактерий и вирусов. В перспективе это может позволить использовать полученные знания для контроля над бактериями и их вирусами, в том числе создания эффективных антибактериальных фаговых препаратов.

В настоящей работе было продемонстрировано, как относительные количества МТ и ЭР в одиночных бактериальных клетках влияют на уровень их защиты от вируса.

1. Medina E., Pieper D.H. Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2016; 398: 3–33.
2. Adhya S., Merrill C.R., Biswas B. Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine // *Cold. Spring Harb. Perspect. Med.* 2014; 4 (1): a012518. doi:10.1101/cshperspect.a012518
3. Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria // *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (8): 4360–77.

Нарушение процесса аутофагии и накопление белка альфа-синуклеина при дисфункции глюкоцереброзидазы в первичной культуре макрофагов

Николаев М. А.^{1,2}, Копытова А. Э.^{1,2}, Изюмченко А. Д.^{1,2}, Байдакова Г. В.⁴, Милюхина И. В.³, Емельянов А. К.^{1,2}, Захарова Е. Ю.⁴, Пчелина С. Н.^{1,2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

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

³ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва, Россия

Введение. Мутации в гене *GBA* являются наиболее распространенным генетическим фактором риска болезни Паркинсона (БП) [1]. Обсуждается, что мутации в гене *GBA* могут влиять на накопление белка альфа-синуклеина в результате нарушения его деградации посредством нарушения процесса аутофагии [2, 3].

Цель. Оценить степень аутофагии, уровень белка альфа-синуклеина, активность GCase в первичной культуре макрофагов пациентов с *GBA*-ассоциированной БП (*GBA*-БП), бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA* (*GBA*-носители) и контроле.

Материалы и методы. От пациентов с *GBA*-БП ($N = 14$), *GBA*-носителей ($N = 14$) и лиц контрольной группы ($N = 33$) была получена мононуклеарная фракция и проведена последующая их дифференцировка в макрофаги по методике, описанной ранее [4]. Определение степени аутофагии было проведено с использованием набора Autophagy Detection kit (Abcam, UK). Ферментативную активность GCase оценивали методом ВЭЖХ–МС/МС, описанным ранее [4]

Результаты. Было показано, что активность GCase в макрофагах у контрольной группы (11,62 (4,7–97,95) мМ/л/ч) статистически значимо выше, чем у *GBA*-носителей (4,05 (0,48–46,96) мМ/л/ч, $p < 0,001$) и пациентов с *GBA*-БП (8,3 (1,63–27,67) мМ/л/ч, $p = 0,026$). Было показано, что повышенная интенсивность флуоресценции маркера аутофагосом в макрофагах ассоциирована с наличием мутации в гене *GBA* (*GBA*-носителей (14,4 (10,5–16,2) MFI, $p = 0,002$) и у пациентов с *GBA*-БП (15,6 (12,1–17,5) MFI, $p = 0,009$) у контрольной группы (11,2 (6,2–13,0) MFI). Было показано накопление белка альфа-синуклеина бессимптомных *GBA*-носителей 1,14 (0,27–5,99) нг/мкг и *GBA*-БП 1,53 (0,12–4,91) нг/мкг по сравнению с контролем 0,41 (0,09–1,6) нг/мкг. Было показано наличие отрицательной корреляции активности GCase и концентрации альфа-синуклеина в макрофагах у *GBA*-носителей и *GBA*-БП ($r = -0,474$, $p = 0,022$).

Выводы. Нарушение процесса аутофагии и накопление белка альфа-синуклеина ассоциировано с нарушением функции фермента GCase у носителей мутации в гене *GBA* вне зависимости от наличия БП.

1. Gegg M.E., Verona G., Schapira A.H.V. Glucocerebrosidase deficiency promotes release of α -synuclein fibrils from cultured neurons // *Human Molecular Genetics*. 2020.
2. Lu J., Wu M., Yue Z. Autophagy and Parkinson's disease // *Autophagy: Biology and Diseases*. 2020. P. 21–51.
3. Balestrino R., Schapira A.H.V. Glucocerebrosidase and Parkinson disease: molecular, clinical, and therapeutic implications // *The Neuroscientist*. 2018. V. 24. No. 5. P. 540–559.
4. Nikolaev M.A. et al. Human Peripheral Blood Macrophages as a Model for Studying Glucocerebrosidase Dysfunction // *Cell and Tissue Biology*. 2019. V. 13. No. 2. P. 100–106.

Выделение и свойства полиморфного варианта ДНК-полимеразы REV1 человека N373S

Новикова А. А.^{1,2}, Мифтахова Р. Р.³, Макарова А. В.¹, Столяренко А. Д.¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова МИРЭА – Российского технологического университета, Москва, Россия

³ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

novannnov00@gmail.com

Повреждения ДНК блокируют работу высокоточных репликативных ДНК-полимераз (ДНКП) и являются источником нестабильности генома. Синтез ДНК в поврежденных участках, которые не были репарированы до очередного раунда репликации, осуществляется специализированными ДНКП, формирующими в ходе транслезионного синтеза комплекс – транслесому. Нарушение работы транслезионных ДНКП приводит к повышенной чувствительности клеток к ДНК-повреждающим агентам и может вызывать их канцерогенное перерождение [1]. Кроме того, транслезионный синтез играет роль в формировании устойчивости к химиотерапии, а некоторые транслезионные ДНКП рассматриваются в качестве терапевтических мишеней при онкологических заболеваниях [2].

REV1 – ключевой белок транслезионного синтеза эукариот, действующий как ДНК-полимераза цитидинтрансфераза, а также служащий платформой для сборки транслесомы. Нарушения гена, кодирующего белок REV1, ассоциированы с мутагенезом и канцерогенезом [3]. По литературным данным, полиморфный вариант белка REV1 человека с аминокислотной заменой N373S (MAF = 17 %) ассоциирован с риском развития рака шейки матки [4] и рака яичников (по нашим данным).

С помощью сайтнаправленного мутагенеза был получен вариант полноразмерного белка REV1 человека с аминокислотной заменой N373S. Тестирование точности и эффективности включения dNMP на неповрежденной ДНК показало, что вариант с заменой N373S активен и обладает, в сравнении с диким типом, повышенной эффективностью включения dCMP напротив матричного G.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-24-20155.

1. Шилкин Е. С. и др. Транслезионный синтез ДНК и канцерогенез // Биохимия. 2020. Т. 85. № 4. С. 494–506.
2. Шилкин Е. С. и др. Транслезионный синтез и реинициация синтеза ДНК в формировании устойчивости и химиотерапии // Биохимия. 2020. Т. 85. № 8. С. 1021–1036.

- 3 Sasatani M., Zaharieva E.K., Kamiya K. The *in vivo* role of Rev1 in mutagenesis and carcinogenesis // Genes Environ. 2020. V. 42. No. 1. P. 9.
4. He X. et al. REV1 genetic variants associated with the risk of cervical carcinoma // Eur. J. Epidemiol. 2008. V. 23. No. 6. P. 403–409.

Производные дитиадиазолов – новые модуляторы кальциевой сигнализации

*Новикова Ю. В.¹, Грехнев Д. А.¹, Крисанова А. В.¹, Юсковец В. Н.²,
Чернов Н. М.², Яковлев И. П.², Вигонт В. А.¹, Казначеева Е. В.¹*

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,
Санкт-Петербург, Россия*

julynovik2000@gmail.com

Кальциевая сигнализация является одним из центральных инструментов, регулирующих важные клеточные процессы, включая экспрессию генов, пролиферацию и клеточную гибель. Одним из наиболее общих типов притока кальция в клетку является вход кальция через депоуправляемые (SOC) каналы. Нарушения кальциевой сигнализации и, в частности, работы кальциевых каналов были отмечены при многих заболеваниях, в том числе онкологических [1, 2] и нейродегенеративных [3, 4], а значит, поиск новых модуляторов кальциевой сигнализации, способных корректировать нарушения кальциевого гомеостаза, является крайне актуальной задачей.

В ходе предварительного скрининга ряда малых молекул синтетического происхождения была отмечена способность вещества VN193 (3-(4-нитрофенил)-5-фенил-3Н-1,2,3,4-дитиадиазол-2-оксид) и ряда его структурных аналогов в концентрациях 1–100 мкМ при 20-минутной инкубации перед экспериментом ингибировать таписаргининдуцированный приток кальция в цитозоль в клетках НЕК293 [5].

Используя флуоресцентный кальциевый зонд Fura-2AM, мы дискриминировали влияние VN193 на выброс кальция из эндоплазматического ретикулума (ЭР) и вход через SOC-каналы. Мы обнаружили, что депоуправляемый вход кальция (SOCE) и содержание кальция в ЭР в клетках, предобработанных VN193, значительно ниже, чем в контрольных клетках.

С помощью метода пэтч-кламп к конфигурации регистрации интегральных токов со всей поверхности клетки мы доказали, что VN193 ингибирует SOCE в остром эксперименте. Используя линии НЕК293 с нокаутом белков-активаторов SOC-каналов STIM1 или STIM2 мы показали избирательное ингибирование SOCE VN193 на клеточной линии с нокаутом по STIM2. Таким образом, по предварительным данным, белок STIM1 может выступать в качестве предполагаемой мишени для VN193.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021 415/21–23) и грантом РНФ № 22-14-00218.

1. Cui C., Merritt R., Fu L., Pan Z. Targeting calcium signaling in cancer therapy // *Acta Pharm. Sin. B.* 7 (1) (2017) 317.
2. Wei J., Deng Y., Ye J. et al. Store-operated Ca^{2+} entry as a key oncogenic Ca^{2+} signaling driving tumor invasion-metastasis cascade and its translational potential // *Cancer Lett.* 516 (2021) 6472.
3. Bezprozvanny I. Calcium signaling and neurodegenerative diseases // *Trends. Mol. Med.* 15 (3) (2009) 89e100.
4. Vigont V.A., Grekhnev D.A., Lebedeva O.S., Gusev K.O., Volovikov E.A., Skopin A.Y., Bogomazova A.N., Shuvalova L.D., Zubkova O.A., Khomyakova E.A., Glushankova L.N., Klyushnikov S.A., Illarioshkin S.N., Lagarkova M.A., Kaznacheyeva E.V. STIM2 mediates excessive store-operated calcium entry in patient-specific iPSC-derived neurons modeling a juvenile form of huntington's disease // *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021) 625231.
5. Grekhnev D.A., Novikova I.V., Krisanova A.V., Yuskovets V.N., Chernov N.M., Yakovlev I.P., Kaznacheyeva E.V., Vigont V.A. Dithiadiazole derivative 3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-3H-1,2,3,4-dithiadiazole-2-oxide – novel modulator of store-operated calcium entry // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 626 (2022) 38–43.

Оценка функциональности полиморфизма rs309950446 гена *bdnf* в модели формирования алкогольной мотивации у макак-резус

Павлова Л. Е., Тумина М. Ф., Азумава А. А., Панченко Ал. В., Панченко Ан. В.

Научно-исследовательский институт медицинской приматологии,
Сочи, Россия

pavlova_laura@mail.ru

Введение. Нейротрофический фактор мозга (BDNF) – один из основных белков семейства нейротрофинов. У человека в гене *bdnf* имеется полиморфизм rs6265 (196 G > A), ассоциированный со множеством фенотипических проявлений с клинической значимостью, в т. ч. с алкоголизмом [1]. У макак-резус описан полиморфизм (136 G > A), но о его функциональной роли неизвестно.

Цель. Изучить функциональную роль полиморфизма rs309950446 на модели формирования алкогольной мотивации у *Macaca mulatta*.

Материалы и методы. По результатам генотипирования популяции макак методом МАМА (Mismatch Amplification Mutation Assay) ПЦР изучены 35 половозрелых самцов макак-резус. Алкогольную мотивацию формировали согласно апробированной методике [2]. Первый этап (62 дня) состоял в инициации с доступом (1 ч/сут) к раствору этанола различной концентрации (0,5–4 %) с подсластителем и ароматизатором с ограничением подачи воды. На втором этапе формирования алкогольной мотивации (55 дней) предоставлен свободный круглосуточный выбор между 4%-ным раствором этанола и водой. Анализ уровня потребления этанола (г/кг/сут) проводили у животных с rs309950446 G/G ($n = 13$), G/A ($n = 17$) и A/A ($n = 5$). Статистическую обработку выполняли в программе Graph Pad Prism 6.0.

Результаты. Закон Харди – Вайнберга для rs309950446 соблюдается ($p > 0,05$). При формировании алкогольной мотивации медианы потребления этанола составили: 0,95 г/кг/сут (95 % ДИ 0,89–1,07 г/кг/сут) у животных генотипа G/G; 1,08 г/кг/сут (95 % ДИ 1,02–1,18 г/кг/сут, $p > 0,05$) у животных генотипа G/A и 1,04 (95 % ДИ 0,88–1,18 г/кг/сут, $p > 0,05$) у животных генотипа A/A. Ограничением исследования является сочетание носительства rs309950446 с полиморфизмом других генов, влияющих на уровень алкогольной мотивации у макак [3].

Выводы. Полученные данные не подтверждают функциональную роль мутантного аллеля полиморфизма rs309950446 гена *bdnf* в потреблении этанола макаками-резус при формировании алкогольной мотивации.

1. Pandey S.C. // Biol. Psychiatry. 79, 6 (2016).
2. Shmaliy A.V., Pavlova L.E. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 167, 4 (2019).
3. Pavlova L.E., Panchenko Al.V. et al. // Rus. J. Genet. 58, 4 (2022).

**Изучение роли белка ANXA2 в функционировании нервной системы
на модели *Danio rerio* с использованием морфолиновых
олигонуклеотидов**

Партевян С. А., Руденок М. М., Рыболовлев И. Н., Алиева А. Х.,
Сафина Д. Р., Шадрина М. И., Сломинский П. А.

НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва, Россия

spartev@img.msk.ru

Болезнь Паркинсона (БП) на сегодняшний день занимает второе место по распространенности среди нейродегенеративных заболеваний. Известно, что в развитие БП значимый вклад вносят наследуемые генетические факторы [1]. Ранее в нашей лаборатории были получены данные о возможном участии гена *Anxa2* на ранних этапах БП [2].

Целью настоящей работы является изучение влияния подавления экспрессии гена *anxa2a* на функционирование нервной системы на модели *Danio rerio* с использованием морфолинов.

На данном этапе работы нами проводился подбор оптимальной дозировки вводимых морфолинов путем анализа фенотипа мальков *Danio rerio*. Для ингибирования экспрессии гена на уровне трансляции были подобраны морфолины на области 5'НТО и 1 экзон мРНК гена *anxa2a*. Устранение неспецифических эффектов введения олигонуклеотидов достигалось путем подавления экспрессии гена *p53* [3]. Для формирования контрольной морфолиновой группы (Ко-Мо) была использована стандартная контрольная последовательность [4]. Количество вводимого вещества составляло 1,5; 3 и 6 нг. Анализ фенотипа проводился с 1 dpf (день после оплодотворения) по 9 dpf.

Анализ показал, что введение морфолинов в количестве 6 нг приводило к повышенной смертности у группы Ко-Мо. Наоборот, введение 3 нг не приводило к смертности в группе Ко-Мо, по сравнению с интактной, но летальность у экспериментальных групп оставалась достаточно высокой к 9 dpf. При введении 1,5 нг морфолинов высокой смертности не наблюдалось, поэтому мы остановились на введении именно этой дозировки. Добавление к каждой из последовательностей морфолина анти-p53 приводило к снижению нежелательных эффектов, кроме комбинации 5'НТО + анти-p53.

Далее планируется провести оценку подавления экспрессии гена *anxa2a* путем анализа уровня белка у мальков в отобранных группах. Данный анализ позволит окончательно выбрать комбинацию морфолинов для исследования влияния подавления *anxa2a* на функционирование нервной системы.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 22-75-00013.

1. Shadrina M.I., Slominsky P.A., Limborska S.A. Molecular Mechanisms of Pathogenesis of Parkinson's Disease // *International Review of Cell and Molecular Biology*, 280, p. 229–266 (2010).
2. Rudenok M.M. et al. Expression Analysis of Genes Involved in Transport Processes in Mice with MPTP-Induced Model of Parkinson's Disease // *Life*, 12 (5), p. 751 (2022).
3. Bedell V.M., Westcot S.E., Ekker S.C. Lessons from morpholino-based screening in zebrafish // *Briefings in Functional Genomics*, 10 (4), p. 181–188 (2011).
4. Eisen J.S., Smith J.C. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense // *Development*, 135 (10), p. 1735–1743 (2008).

Характеризация металлических наночастиц, образующихся при лазерной биопечати

Петрашко Л. Р.^{1,2}, Овчаров А. В.³, Жигарьков В. С.¹

¹ *Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН,
Москва, Россия*

² *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

³ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва,
Россия*

В настоящее время биопечать на основе прямого лазерноиндуцированного переноса (LIFT) [1] с поверхности поглощающей металлической пленки гелевых микрокапель широко применяется для задач медицины и биотехнологии. Например, с помощью лазерной биопечати клеток млекопитающих создают многослойные клеточные конструкции [2], используемые в тканевой инженерии. Кроме того, высокая степень локализации лазерного излучения и перенос крайне малых объемов геля позволяют проводить разделение микробных клеток, взятых из сложных природных гетерогенных сред [3].

Однако такой метод печати предполагает, что частицы металла могут переноситься вместе с клетками [4, 5] и оказывать негативное влияние на их жизнедеятельность в процессе клеточного роста. Как известно, в зависимости от формы, размера и концентрации металлических частиц, с которыми контактирует клетка, степень токсического воздействия может быть различной [6].

Целью работы является исследование характеристик полученных наночастиц на основе золота, титана и хрома. Для получения достаточного для исследования количества металлических частиц была проведена абляция тонких металлических пленок последовательными наносекундными импульсами на поверхности кюветы с водой. Рабочий диапазон энергий при этом составил 16–45 мкДж (диаметр перетяжки 30 мкм). Размеры, форма, состав наночастиц определены посредством сканирующей электронной микроскопии с энергодисперсионным анализатором. По полученным СЭМ-изображениям построены распределения наночастиц по размерам в зависимости от энергии лазерного импульса. Результаты позволяют оценить концентрацию металлических частиц в напечатанных микрокаплях, что позволит ответить в дальнейшем на вопрос о влиянии наночастиц на жизнеспособность и функциональные особенности перенесенных клеток.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках исполнения работ по государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части получения тонких пленок, гранта РФФИ № 20-14-00286 в части абляции. Часть работы, связанная с

микроскопией образцов, была выполнена на оборудовании Ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии (Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт»).

1. Serra P. et. al. // Cell and Organ Printing. 2010. P. 53–80.
2. Barron J.A. et. al. // Biomedical Microdevices. 2004. V. 6. P. 139–147.
3. Yusupov V.I. et al. // Laser Phys. Lett. 2018. V. 15. No. 6. P. 065604.
4. Zhigarkov V.S. et. al. // Quantum Electronics. 2020. V. 50. No. 12. P. 1134.
5. Zhigarkov V. et al. // Nanomaterials. 2021. V. 11. No. 10. P. 2584.
6. Фокина А. И. и др. // Теоретическая и прикладная экология. 2015. №. 2. С. 5.

Морские динофлагелляты *Prorocentrum cordatum* как источник уникальных биологически активных веществ с противоопухолевой антиинвазивной активностью

Печковская С. А., Князев Н. А., Филатова Н. А.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

sapchkovskaya@gmail.com

Динофлагелляты *Prorocentrum cordatum* (Ostenfeld) Dodge, 1975 (синоним *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller, 1933) – потенциально токсичные эукариотические микроводоросли, формирующие вредоносные цветения [1]. Они синтезируют большое количество разнообразных биологически активных вторичных метаболитов [2] и уникальных пигментов, таких как перидинин [3]. В данной работе были получены водные и этанольные экстракты из культивируемых клеток динофлагелляттов *P. cordatum*. Полученные экстракты были количественно охарактеризованы с помощью спектрофотометрического анализа. В качестве опухолевых клеток-мишеней использовали культуры клеток миелолейкоза человека K562 и мышинной гепатомы МН-22а.

Методом MTS-теста было показано, что как спиртовые, так и водные экстракты приводили к снижению количества живых клеток в культуре K562 на 38,7 и 44,4 % соответственно. С помощью проточной цитометрии было установлено, что обработка культуры клеток K562 водными экстрактами не приводила к значительным изменениям в распределении клеток по фазам клеточного цикла, в то время как в культуре МН-22а наблюдалось увеличение количества клеток в S-фазе на 44 % и его уменьшение в G0/G1-фазе на 45 %. При этом ни в одном из экспериментов количество апоптотических клеток после обработки полученными экстрактами достоверно не изменялось по сравнению с контролем.

Методом скретч-теста было обнаружено, что способность культуры клеток МН-22а к миграции снижалась в 2,5 раза по отношению к контролю спустя 72 ч после обработки спиртовыми экстрактами. В то же время адгезионная способность снижалась в 4,8 раза по сравнению с контролем. Водные экстракты же не оказывали значимого влияния на подвижность и адгезию клеток.

Таким образом, этанольные экстракты, выделенные из клеток динофлагелляттов *P. cordatum*, приводили к снижению потенциала подвижности клеток-мишеней. Полученные данные открывают широкие перспективы для дальнейшего изучения действия полученных экстрактов *in vivo*.

Работа поддержана грантом РНФ № 22-14-00056.

1. Hajdu S., Pertola S., Kuosa H. // *Harmful Algae*, 4, 471–480 (2005).
2. Assunção J., Guedes A.C., Malcata F.X. // *Marine Drugs*, 15, 393 (2017).
3. Onodera K.I., Konishi Y. et al. // *Marine Drugs*, 12, 1773–1787 (2014).

Анализ генетической регуляции в эффекте ионизирующего излучения на стрессовые сигналы растений

Пирогова П. А., Здобнова Т. А., Ладейнова М. М.,
Гринберг М. А., Воденеев В. А.

Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

poly.h@mail.ru

Ионизирующее излучение (ИИ) значительно влияет на важнейшие физиологические процессы растений [1]. В естественных условиях особое значение может иметь эффект ИИ на стрессовые сигналы, формирующие адаптацию к природным факторам. Один из типов стрессовых сигналов – электрические сигналы (ЭС), возникающие в ответ на различные раздражители (нагрев, охлаждение, механическое воздействие и др.). В преобразовании ЭС в функциональный ответ принимают участие другие сигнальные системы, включая гормональную. Стрессовые фитогормоны участвуют в опосредованном ЭС-изменении активности фотосинтеза, транспирации, экспрессии генов [2].

К настоящему времени показано, что ИИ способно оказывать эффект на параметры вызванных локальным стрессором ЭС [3]. Эффекты ИИ могут быть обусловлены изменением уровня экспрессии генов, запускаемым главным образом изменением содержания активных форм кислорода при облучении.

Исследования выполнены на 15-дневных проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Облучение проводили в течение 15 дней источником ^{90}Sr – ^{90}Y (активность – 0,1 МБк; мощность дозы – 31,3 мкГр/ч; поглощенная доза – около 11,3 мГр). Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР в реальном времени. Анализировали гены белков, потенциально обуславливающие эффекты ИИ на ЭС, и гены белков биосинтеза стрессовых фитогормонов. Референсные гены – β -актин (ACTB) и гомолог белка слияния вакуолей (MON1). Полученные результаты анализировали по методике $\Delta\Delta\text{Ct}$.

У облученных растений изменяются параметры ЭС: увеличиваются амплитуда и скорость распространения. Обнаружено снижение экспрессии гена калиевого канала SKOR под влиянием ИИ. Проведенный анализ экспрессии генов интереса позволяет определить вклад генетической регуляции в эффекты ИИ на стрессовый сигналинг.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта № 075-15-2021-1068.

1. Volkova P.Y. et al. // Curr. Opin. Toxicol. 30, 100334 (2022).
2. Ladeynova M.M. et al. // Plants. 9, 10 (2020).
3. Grinberg M.A. et al. // Environ. Exp. Bot. 184 (2021).

**Идентификация однонуклеотидных полиморфизмов
в геномах растений *Arabidopsis thaliana*, произраставших
на территории зоны отчуждения Чернобыльской АЭС**

Подлущий М. С., Воронежская В. С., Блинова Я. А., Бабина Д. Д.,
Шестерикова Е. М., Казакова Е. А.

НИЦ «Курчатовский институт» – ВНИИРАЭ, Обнинск, Россия

mikhail.podlutskii@gmail.com

В эксперименте использовали второе поколение семян *Arabidopsis thaliana*, полученное из материала, отобранного на территориях бывших населенных пунктов (Бабчин и Масаны), подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС.

Полученные семена проращивали на твердой питательной среде Мурасиге – Скуга в климатической камере Sanyo MLR-351 в течение 13 дней в режиме длинного светового дня. Из полученных проростков выделяли геномную ДНК с использованием набора реагентов «СОРБ-ГМО-Б» по стандартному протоколу выделения. Полученные образцы передавали в компанию ЗАО «Евроген» для выполнения полногеномного секвенирования на приборе Illumina NovaSeq 6000. В результате секвенирования было получено 3.714.666.806 прочтений.

Качество полученных данных секвенирования оценивали при помощи FastQC v. 0.11.9 и MultiQC v.1.10. Прочтения низкого качества фильтровали с использованием Trimmomatic v.0.39 [1]. Samtools v.1.16.1 [2] и bwa-mem2 v.2.2.1 [3] применяли для картирования очищенных прочтений на эталонный геном TAIR10. Идентификацию однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) выполняли с помощью GATK4 v.4.3.0 [4]. SnpEff v.1.1. [5] применяли для аннотации возможных вариантов SNP, полученных из каталога генетической изменчивости растений “1001 Genomes” [6].

Для проростков *A. thaliana*, полученных из материала, отобранного в Бабчине, был идентифицирован набор, состоящий из 310.240 однонуклеотидных полиморфизмов, 16.112 SNP являлись уникальными. Для проростков, полученных из материала, отобранного в Масанах, было идентифицировано 439.783 однонуклеотидных полиморфизмов, из которых 33.217 SNP не были аннотированы в каталоге “1001 Genomes”.

Среди уникальных однонуклеотидных полиморфизмов для каждого участка был идентифицирован общий набор, состоящий из 12.368 SNP, а также 3.744 SNP (Бабчин) и 20.849 SNP (Масаны), которые представляют интерес в изучении возможных процессов адаптации растений к радиационному воздействию.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-74-10004).

1. Bolger A. M., Lohse M. et al. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 30, 2114–2120 (2014).
2. Danecek P., Bonfield J. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools // *GigaScience*. 10 (2), 1–4 (2021).
3. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform // *Bioinformatics*. 25 (14), 1754–1760 (2009).
4. McKenna A., Hanna M. et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data // *Genome Research*. 20 (9), 1297–1303 (2010).
5. Cingolani P., Platts A. et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff // *Bioinformatics*. 6 (2), 80–92 (2012).
6. 1001 genomes consortium. 1,135 genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana* // *Cell*. 166 (2), 481–491 (2016).

Оценка подвижности клеток FetMSC, выделенных из костного мозга эмбриона человека, в процессе репликативного старения

Полянская А. В.¹, Горб А. И.², Мусорина А. С.¹, Полянская Г. Г.¹, Бобков Д. Е.¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Polyanskaya.nastya18@gmail.com

Исследовали подвижность клеток FetMSC в процессе репликативного старения (РС). Нарушения клеточных миграционных процессов приводят к ухудшению регенерации тканей [1]. Для использования MSC в биомедицине необходимо изучение РС-ассоциированных изменений клеточной подвижности, основными сигнальными регуляторами которой являются малые ГТФазы семейства Rho. Ключевым нижестоящим эффектором малой ГТФазы RhoA и регулятором актомиозинового цитоскелета является ROCK1-киназа, которая способствует формированию стресс-фибрилл [2]. Лизофосфатидная кислота (LPA) является активатором сигнального пути Rho, а Y-27632 – его ингибитором [3].

В работе использовали клеточную линию FetMSC, выделенную из костного мозга эмбриона человека, полученную из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ИНЦ РАН. Клетки в редком посеве помещали в 6-луночный планшет: 3 лунки с 1%-ным FBS (контроль, 1 нг/мл LPA, 10 мМ Y-27632) и 3 – с 10%-ным FBS. Для измерения средней скорости клеток на пассажах 12, 16, 20 и 26 анализировали треки клеточных движений, записанные в течение 24 ч с помощью системы прижизненной конфокальной микроскопии.

Было показано, что на протяжении культивирования в 1%-ном FBS с 12-го по 26-й пассажи средняя скорость клеток не изменялась.

Средняя скорость клеток в 10%-ном FBS на 12-м и 26-м пассажах была выше, чем в 1%-ном FBS.

В 10%-ном FBS скорость снижалась с 12-го по 20-й пассаж, а на 26-м пассаже возросла до уровня 12-го пассажа. Пошаговый анализ показал, что в 10%-ном FBS скорость клеток на 12-м пассаже не менялась в течение 24 ч, на остальных пассажах происходило снижение скорости клеток в процессе наблюдения. В 1%-ном FBS на всех пассажах скорость клеток значительно снижалась в течение 24 ч.

Показано, что на пассажах 12, 20 (1%-ный FBS) скорость снижалась под действием LPA, а на пассаже 20 (10%-ный FBS) – увеличивалась. Под действием Y-27632 скорость клеток снижалась на пассажах 12, 26 (1%-ный FBS) и 16, 20 (10%-ный FBS).

Морфологический анализ показал, что РС сопровождается увеличением размеров клеток и коэффициента локальной связанной фрактальной размерности актинового цитоскелета.

1. Turinetto V., Vitale E., Giachino C. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy // *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. V. 17. No. 7. P. 1164.
2. Ridley A.J., Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors // *Cell*. 1992. V. 70. No. 3. P. 389–399.
3. Narumiya S., Ishizaki T., Ufhata M. Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632 // *Methods in Enzymology*. Academic Press. 2000. V. 325. P. 273–284.

Детектирование специфических последовательностей ДНК на основе коллатеральной активности системы CRISPR Cas12a

*Потысьева А. С., Арсениев А. Н., Мельников А. С.,
Сердобинцев П. Ю., Ходорковский М. А.*

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

alina.potyseva@yandex.ru

В наши дни все более актуальной становится проблема распространения различных заболеваний [1]. Вирусы мутируют, а бактерии приобретают резистентность ко все большему числу антибиотиков. Поэтому разработка новых диагностирующих систем, позволяющих распознавать патогенные частицы в образцах, является очень актуальной задачей. Одним из кандидатов на решение данной проблемы являются системы CRISPR/Cas, являющиеся защитной системой бактерий и состоящие из Cas-белков (нуклеаз) и гидовой РНК [2], которые осуществляют специфическое разрезание чужеродного генетического материала (ДНК или РНК).

Целью данной работы является оптимизация методов детектирования специфических последовательностей ДНК на основе CRISPR-систем. Для реализации данной цели применялась система CRISPR/Cas12a, которая, помимо специфической активности, обладает также коллатеральной, заключающейся в неспецифическом расщеплении нецелевых однокитевых фрагментов ДНК и активирующейся только в случае узнавания комплексом Cas12a специфической ДНК-мишени. Для визуализации этой активности были использованы специфические молекулы – ДНК-зонды. Для тестирования были отобраны два типа зондов: FAM-BHQ1 и Cy3-Cy5. Первые содержали на противоположных концах однокитевой молекулы ДНК флуорофор и гаситель [3], подавляющий свечение флуоресцентных частиц при малых расстояниях. После неспецифического расщепления такого зонда Cas-нуклеазой расстояние между метками увеличивается, что приводит к появлению сигнала флуоресценции. Во втором случае на концах зонда находились два флуорофора, энергия от одного из них переходит к другому по принципу FRET, что и вызывает свечение на разных длинах волн в зависимости от того, в каком состоянии находится зонд (до или после расщепления).

В результате проведенных исследований были охарактеризованы возможности детектирования специфических последовательностей ДНК с помощью зондов, содержащих пары «флуорофор – флуорофор» и «флуорофор – гаситель», и были подобраны оптимальные условия для их работы.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках программы «Приоритет-2030» (соглашение № 075-15-2021-1333 от 30.09.2021).

1. Cheung G.Y.C., Bae J.S., Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus* // *Virulence*. 2021. V. 12. No. 1. P. 547–569.
2. Paul B., Montoya G. CRISPR-Cas12a: functional overview and applications // *Biomedical Journal*. 2020. V. 43. No. 1. P. 8–17.
3. Li Y. et al. Rapid one-tube RPA-CRISPR/Cas12 detection platform for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Diagnostics*. 2022. V. 12. No. 4. P. 829.

Исследование особенностей транскриптома озимого ячменя после воздействия гамма- и протонного излучения

Празян А. А., Подлущий М. С., Шестерикова Е. М., Казакова Е. А.

НИЦ «Курчатовский институт» – ВНИИРАЭ, Обнинск, Россия

prazyana@yahoo.com

Облучение индуцирует стрессовый ответ в растениях, который существенно влияет на физиологические процессы на различных уровнях; в свою очередь, такие реакции сопровождаются изменениями профиля экспрессии генов. Целью исследования служит изучение воздействия нелетальных доз ионизирующего излучения. В силу специфичности такого воздействия одной из задач становится поиск экспрессирующихся генов, которые активизируются в ответ на стресс [1].

Объектом исследования являлись проростки *Hordeum vulgare* L. сорта Фокс 1. Данный сорт ячменя обладает высокой пластичностью; кроме того, γ -излучение оказывает стимулирующее действие на морфологические показатели проростков после облучения семян [2].

Источником γ -излучения являлась установка «Агат» (Россия) с изотопом ^{60}Co . Облучение протонами проводили на комплексе протонной терапии «Прометеус» (Россия). Поглощенная доза для проростков ячменя при обоих типах излучения составила 15 Гр.

Спустя 24 ч после облучения выделяли РНК с использованием специализированного набора GeneJet Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя [3]. Секвенирование парных прочтений (Paired-end Sequencing) на приборе производилось на приборе Illumina NovaSeq 6000 (США) в трех повторностях.

После обработки полученных данных дифференциальную экспрессию генов представляли в виде логарифма кратного изменения ($\log_2\text{FC}$). Повышенным считался уровень экспрессии $\log_2\text{FC} \geq 1$. Статистическая значимость для полученных результатов анализа с учетом FDR составила 0,05.

При сравнении дифференциально экспрессируемых генов в проростках ячменя после действия двух типов излучения нами было выявлено 442 гена с повышенной экспрессией, среди которых 42 имели высокую экспрессию у обоих типов излучения.

Результаты получены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1068 от 28.09.2021).

1. Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности / под общ. ред. Г. В. Козьмина, С. А. Гераськина, Н. И. Санжаровой. Обнинск: ВНИИРАЭ, 2015. С. 87–92.
2. Казакова Е. А., Макаренко Е. С., Подлуцкий М. С. и др. Радиочувствительность сортов озимого и ярового ячменя по выраженности морфологического эффекта низкодозового гамма-облучения оригинальных семян // *Зерновое хозяйство России*. 2020. № 2. С. 23–28. <https://doi.org/10.31367/2079-8725-2020-68-2-23-28>
3. Product Information/Thermo Scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit #K0801, #K0802 [Электронный ресурс] // ThermoFisher Scientific URL: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012668_GeneJET_Plant_RNA_Purification_UG.pdf (дата обращения: 15.08.2022).

Перенаправление метаболических путей лизинпродуцирующего штамма *Corynebacterium glutamicum* на продукцию валина за счет модификации генов биосинтеза обеих аминокислот

Розанцева В. В., Шереметьева М. Е., Ануфриев К. Э., Леонова Т. Е.,
Калинина Т. И., Яненко А. С.

Курчатовский комплекс генетических исследований
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

v.rozantseva@bk.ru

Рацион сельскохозяйственных животных должен содержать незаменимые аминокислоты, в частности валин. Его применение как кормовой добавки положительно сказывается на качестве и количестве мяса [1]. Рост спроса на продукцию животноводства ведет к росту мирового рынка валина, но в РФ валин пока не производится. Создание такого производства необходимо для продовольственной безопасности нашей страны.

Самый выгодный способ получения аминокислот – биотехнологический. Один из лучших базовых микроорганизмов для создания штаммов-продуцентов – *Corynebacterium glutamicum*. В нашей лаборатории методами метаболической инженерии на основе *C. glutamicum* создан продуцент лизина. В нем усилены и биосинтез лизина, и образование нужных для этого процесса пирувата и НАДФН. Те же соединения требуются для биосинтеза валина [1], и ранее мы сумели из промежуточного лизинпродуцирующего штамма (VG) получить валинпродуцирующий [2].

В данном исследовании штамм VG *ΔilvA* взяли как базовый, чтобы сравнить влияние на продукцию валина различных модификаций первого фермента его биосинтеза ацетолактатсинтазы (AHAS, продукт генов *ilvBM*) [1]: ряда мутаций структурной части гена *ilvN*, снимающих ретроингибирование AHAS [3, 4], и замены промотора генов *ilvBN* сильным конститутивным промотором для усиления их экспрессии. Наибольший эффект показали последняя модификация и одна из мутаций гена *ilvN*: в обоих случаях продукция валина выросла вдвое. Однако новые штаммы по-прежнему продуцировали лизин. Штамм VG несет точечную мутацию в гене *lysC*, снимающую ретроингибирование кодируемого им фермента биосинтеза лизина аспартаткиназы. Возвращение гена *lysC* к дикому типу у новых штаммов привело к прекращению продукции лизина и росту продукции валина в 1,5 раза.

Работа с наиболее продуктивными штаммами продолжится: будет повышена активность следующих ферментов пути биосинтеза валина. Итогом

станет выявление наиболее эффективной комбинации мутаций, которую можно использовать при создании промышленного продуцента валина.

Работа поддержана государственным заданием НИЦ «Курчатовский институт» (№ АААА-А20-120093090015-2 от 30.09.2020).

1. Шереметьева М. Е. и др. Рациональная метаболическая инженерия *Corynebacterium glutamicum* для продукции L-валина // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. Т. 26. № 8. С. 743–757.
2. Шереметьева М. Е. и др. Использование коринебактериальных штаммов-продуцентов лизина как платформы для создания продуцентов разветвленных аминокислот // Биотехнология. 2018. Спецвыпуск. С. 58.
3. Elišáková V. et al. Feedback-resistant acetohydroxy acid synthase increases valine production in *Corynebacterium glutamicum* // Applied and Environmental Microbiology. 2005. V. 71. No. 1. P. 207–213.
4. Hasegawa S. et al. Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions // Applied and Environmental Microbiology. 2012. V. 78. No. 3. P. 865–875.

RecN – ключевой белок SOS-ответа

Рошкетева В. Д., Ходорковский М. А., Морозова Н. Е.

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

victoria.rd@yandex.ru

SOS-ответ – процесс, который возникает в клетке из-за повреждения ДНК. Результатом активации SOS-ответа может являться точное восстановление поврежденных участков ДНК, а также адаптация бактерии к повреждающему воздействию [1]. За счет этого SOS-ответ представляет собой важный механизм адаптации бактерий к действию антибиотиков. На сегодняшний день адаптация бактерий к антибиотикам является одной из самых острых проблем фармакологии и медицины.

Исследуемый нами белок RecN экспрессируется и действует на ранней стадии SOS-ответа и является одним из ключевых факторов успешного протекания данного процесса [2]. Современные знания об активности белка RecN ограничены в основном данными *in vivo* [3, 4], из которых следует, что этот белок является необходимым для правильной реализации SOS-ответа и успешной репарации ДНК бактерий, однако функции и механизмы действия этого белка до сих пор не ясны.

В рамках данной работы производились клонирование флуоресцентно-меченого RecN *Escherichia coli* в экспрессионный вектор, экспрессия данного белка в клетках *E. coli* и выяснение его локализации внутри бактерий методом флуоресцентной микроскопии.

Таким образом, в результате работы были подобраны параметры для экспрессии белка RecN и выяснена его локализация в клетках *E. coli*, в том числе в состоянии SOS-ответа.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 22-74-00072).

1. Podlesek Z., Žgur Bertok D. The DNA Damage Inducible SOS Response Is a Key Player in the Generation of Bacterial Persister Cells and Population Wide Tolerance // *Front. Microbiol.* 2020; 11: 1785.
2. Odsbu I., Skarstad K. DNA compaction in the early part of the SOS response is dependent on RecN and RecA // *Microbiology.* 2014; 160 (Pt 5): 872–82.
3. Alonso J.C. et al. Early steps of double-strand break repair in *Bacillus subtilis* // *DNA Repair.* 2013; 12: 162–176.
4. Ayora S. et al. Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 35: 1055–1081.

Экспрессионный анализ мРНК в тканях мозга мышей с МФТП-индуцированными моделями ранних стадий болезни Паркинсона

Руденок М. М., Семенова Е. И., Рыболовлев И. Н., Партевян С. А., Станишевская В. А., Сломинский П. А., Шадрина М. И., Алиева А. Х.

НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва, Россия

rudenok@img.msk.ru

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из распространенных заболеваний нервной системы, которое поражает около 2–3 % людей старше 65 лет. Развитие БП обусловлено гибелью различных типов нейронов [1]. Главным образом происходит дегенерация дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции, что приводит к появлению двигательных симптомов. Именно по наличию ряда двигательных симптомов, таких как брадикинезия, ригидность и тремор покоя, ставят клинический диагноз данного заболевания. Однако дегенерация дофаминергических нейронов в черной субстанции развивается в течение многих лет, задолго до появления клинических симптомов. Заболевание манифестирует только после дегенерации около 70 % дофаминергических нейронов [2, 3].

При этом для патогенеза БП также характерны немоторные симптомы, некоторые из которых присутствуют еще до возникновения моторных признаков и могут проявляться с различной степенью выраженности. Эти симптомы связаны с изменением функционирования в гистаминергической, холинергической, серотонинергической и других нейромедиаторных систем [4, 5]. Таким образом, БП является многофакторным заболеванием, в патогенез которого вовлечены различные механизмы. Однако до сих пор не выявлены все клеточные процессы, нарушение которых связано с развитием данной патологии, особенно участвующие в инициации нейродегенерации при БП.

До сих пор не существует методов изучения эндогенных процессов, происходящих в головном мозге пациентов с БП. Допустимым подходом является изучение моделей БП, в первую очередь основанных на введении модельным животным различных нейротоксинов. К группе таких нейротоксинов относят 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП), который многие годы считают «золотым стандартом» для моделирования БП [6, 7].

В данной работе было проведено изучение изменения экспрессии генов в тканях мозга и периферической крови мышей с МФТП-индуцированными моделями БП. Полученные данные указывают на последовательное вовлечение транскриптома в патогенез БП, а также на то, что изменения на транскриптомном уровне процессов транспорта и митохондриального биогенеза могут играть важную роль в нейродегенерации при БП уже на самых ранних этапах.

1. Горбунова В. Н., Савельева-Васильева Е. А., Красильников В. В. Молекулярная неврология. СПб.: Интермедика, 2000.
2. Weintraub D., Comella C.L., Horn S. Parkinson's disease. Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment // *Am. J. Manag. Care*, 2008. 14 (2 Suppl.): p. S40–S48.
3. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease // *J. Neurochem.*, 2016. 139 (Suppl. 1): p. 318–324.
4. Kalia L.V., Lang A.E. Parkinson's disease // *Lancet*, 2015. 386 (9996): p. 896–912.
5. Duncan G.W. et al. Health-related quality of life in early Parkinson's disease: the impact of nonmotor symptoms // *Mov. Disord.*, 2014. 29 (2): p. 195–202.
6. German D.C. et al. The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse // *Neurodegeneration*, 1996. 5 (4): p. 299–312.
7. Meredith G.E. et al. Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol // *Parkinsonism Relat. Disord.*, 2008. 14 (Suppl. 2): p. S112–S115.

Регуляция белка FtsZ во время SOS-ответа в бактериях *Escherichia coli*

Румянцева Н. А., Голофеева Д. М., Ведяйкин А. Д.

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

rumyanatasha@yandex.ru

Для бактерий процесс деления является центральным событием в их жизненном цикле. Ключевую роль в данном процессе у *Escherichia coli* и других хорошо изученных бактерий играет белок FtsZ [1]. В нормальных условиях он формирует Z-кольцо, которое является каркасом для других белков деления. За позиционирование Z-кольца в основном ответственны Min-система и система нуклеоидной окклюзии, которые препятствуют формированию мини-клеток и согласуют положение Z-кольца и ДНК после репликации [2]. В стрессовых условиях при повреждении ДНК у *E. coli* активируется SOS-ответ [3]. Во время него деление блокируется под действием белка SulA, прямого ингибитора FtsZ. Однако, каким именно образом он останавливает формирование Z-кольца, неизвестно. Также остается непонятным, за счет какого механизма бактерия восстанавливает деление после SOS-ответа и правильно распределяет ДНК по будущим дочерним клеткам.

Данная работа посвящена изучению роли белка SulA в процессе ингибирования деления во время SOS-ответа, в частности оценке его минимальной концентрации, достаточной для остановки деления. Также в работе был исследован процесс восстановления деления *E. coli* после окончания SOS-ответа, было определено, какие системы помогают правильно позиционировать первое Z-кольцо. Полученные результаты позволят приблизиться к пониманию молекулярных механизмов, ответственных как за блокировку деления во время SOS-ответа, так и за его восстановление после этого состояния.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 22-24-00085.

1. Du S., Lutkenhaus J. At the Heart of Bacterial Cytokinesis: The Z Ring // Trends Microbiol. 2019. V. 27. No. 9. P. 781–791.
2. Vedyaykin A.D., Ponomareva E.V., Khodorkovskii M.A., Borchsenius S.N., Vishnyakov I.E. Mechanisms of Bacterial Cell Division // Microbiology. 2019. V. 88. No. 3. P. 245–260.
3. Maslowska K.H., Makiela-Dzbenska K., Fijalkowska I.J. The SOS System: A Complex and Tightly Regulated Response to DNA Damage // Environ. Mol. Mutagen. 2019. V. 60. No. 4. P. 368–384.

Структура малой субъединицы рибосомы *Staphylococcus aureus* с разрешением 4,1 Å по данным криоэлектронной микроскопии

Рябов С. А.^{1,2}, Глазырин М. С.^{1,2}, Гараева Н. С.^{1,2},
Валидов Ш. З.², Усачев К. С.², Юсупов М. М.^{2,3}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

³ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

ryabovs888@gmail.com

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) – грамположительная бактерия шаровидной формы, являющаяся причиной широкого спектра заболеваний и способная приобретать резистентность к применяемым антибиотикам и антисептикам. Одной из стратегий борьбы с данным патогеном является создание селективных препаратов, направленных на подавление синтеза белка и, в частности, работы рибосомы *S. aureus*. Рибосома выступает в качестве связующего звена между генами и белками [1, 2]. В структуре бактериальных рибосом принято выделять две отдельные асимметричные субъединицы – 50S и 30S, каждая из которых имеет собственный набор функций в процессе трансляции. 30S- (малая) субъединица состоит из 21 белка и 16S рРНК [3]. Наличие специфических структурных особенностей в строении рибосомы, такие как посттранскрипционные модификации, сегменты экспансии рРНК и отличия в строении рибосомных белков, могут выступать в качестве мишеней для разработки новых антистафилококковых препаратов.

В данной работе нами была получена структура 30S-субъединицы *S. aureus* с разрешением 4.1 Å. Для неподвижного «тела» разрешение составило 3,5 Å, а для подвижной «головы» – 12,5 Å. Регистрация первичных изображений проводилась на микроскопе Glacios (FEI, Нидерланды). Она осуществлялась в автоматическом режиме с использованием камеры прямого детектирования электронов CMOS (Falcon III) при следующих параметрах: размер пикселя – 1,2 Å, суммарная доза облучения – $50 \frac{e^-}{\text{Å}^2}$. Постобработка микрофотографий проводилась с помощью программного обеспечения Relion.

Исследования выполнены за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

1. Campion J.J. et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48, 12 (2004), 4733.
2. Hiramatsu K. et al. // Trends in Microbiology. 9, 10 (2001), 486.
3. Kaczanowska M. et al. // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 71, 3 (2007), 477.

**Использование штамма *Caenorhabditis elegans*
с генетическим дефектом метаболизма меди для оценки способности
N-концевого домена белка CTR1 хелатировать серебро**

Самусева П. Д., Мехова А. А.

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

samusevap@yandex.ru

Медь (Cu) является каталитическим кофактором купроэнзимов и фактором, контролирующим активность регуляторных белков [1]. Мутации в гене *ATP7B*, кодирующей Cu-транспортную АТФазу, вызывают развитие болезни Вильсона (БВ), характеризующуюся накоплением токсичной Cu. В настоящее время терапия БВ включает хелатирование Cu препаратами с тяжелыми побочными эффектами. Актуальным является создание моделей для испытания альтернативных лекарственных средств.

В работе в качестве модели БВ использовали штамм *Caenorhabditis elegans*, у которого CUA-1 (гомолог медьтранспортной АТФазы БВ) несет аминокислотную замену H828Q в нуклеотидсвязывающем домене. Замена H828Q гомологична наиболее часто встречающейся в европейской популяции замене H1069Q в *ATP7B* [2]. В качестве потенциального хелатора Cu рассматривали внеклеточный N-концевой домен высокоаффинного импортера Cu человека (NdCTR1). Оценивали способность рекомбинантного NdCTR1 хелатировать серебро (Ag), так как в организме Ag(I), изоэлектронный Cu(I), использует транспортные пути последнего. Нематоды получали NdCTR1, питаясь бактериями *Escherichia coli* штамма BL21, продуцирующими рекомбинантный белок, включающий B1-домен иммуноглобулинсвязывающего белка G стрептококка (GB1) и NdCTR1. В качестве контроля использовали бактерии *E. coli* штамма OP50 [3].

Нематод синхронизировали на эмбриональной стадии на чашках Петри с разными концентрациями AgNO₃ в среде NGM (0, 0,5 мкг/мл для штамма H828Q и 0, 100 мкг/мл для дикого штамма N2) и различными штаммами бактерий. Полученные чашки инкубировали 4 сут при 20 °С. Затем проводили оценку выживаемости нематод.

Результаты показали, что NdCTR1 увеличивает выживаемость нематод штамма H828Q в присутствии Ag в среде. Однако на выживаемость штамма N2 NdCTR1 не оказал статистически значимого влияния. Таким образом, можно заключить, что NdCTR1 связывает Ag(I), благодаря этому спасает нематод с генетическим дефектом экскреции Cu(I)/Ag(I). Обсуждается потенциальная возможность использовать NdCTR1 в качестве безопасного хелатора.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-24-00762.

1. Puchkova L.V., Brogginini M., Polishchuk E.V., Ilyechova E.Y., Polishchuk R.S. Silver Ions as a Tool for Understanding Different Aspects of Copper Metabolism // *Nutrients*. 2019. V. 11. P. 1364.
2. Chun H., Sharma A.K., Lee J., Chan J., Jia S., Kim B.E. Intestinal Copper Exporter CUA-1 Is Required for Systemic Copper Homeostasis in *Caenorhabditis elegans* // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. No. 1. P. 1–14.
3. Орлов Ю. А. Транспортеры CTR1 и DMT1: альтернативные пути импорта меди в клетку и их биологические роли: дис. канд. биолог. наук. ИЭМ, 2021. 140 с.

Изменения бактериального протеома при экспрессии гена протеазы S из *Photorhabdus laumondii*

Светлова А. О.¹, Смирнов И. П.², Карасева М. А.¹, Демидюк И. В.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва, Россия

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. акад. Ю. М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

svetlovaanastasia@yandex.ru

Протеализинподобные протеазы (ППП) – малоизученная группа цинковых металлопротеаз семейства M4. ППП обнаружены у бактерий, архей и грибов. Считается, что ферменты данной группы могут играть важную роль в патогенезе, поскольку есть данные о вовлеченности ППП во взаимодействиях бактерий с эукариотами [1–6]. Предполагается также, что ППП участвуют в межбактериальной конкуренции в роли бактериотоксинов, однако эта гипотеза базируется исключительно на косвенных данных [7].

В ходе нашего исследования ППП было обнаружено, что экспрессия гена протеализинподобной протеазы S (*prtS*) из энтомопатогенной бактерии *Photorhabdus laumondii* оказывает токсическое действие на *Escherichia coli*. Мы установили, что данный эффект связан с активностью фермента, и исследовали изменения в протеоме *E. coli*, возникающие при экспрессии *prtS*. Протеомный анализ проводили с помощью двумерного дифференциального гель-электрофореза с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков. В качестве контроля были использованы бактерии, экспрессирующие ген, кодирующий неактивный вариант PrtS. Были выявлены потенциальные мишени PrtS, среди которых витальные белки FtsZ, EF-Ts, PtsI, LolB и GlyA. Кроме того, было обнаружено, что экспрессия *prtS* вызывает сильный клеточный ответ, затрагивающий различные метаболические пути, мембранный транспорт, а также процесс клеточного деления.

Таким образом, нами было впервые показано, что ППП могут обладать бактериотоксичностью, что свидетельствует в пользу гипотезы об участии данных ферментов в межбактериальной конкуренции. Вероятно, токсичность PrtS связана с расщеплением белков, принимающих участие в клеточном делении, трансляции и транспорте. В то же время механизм цитотоксического действия фермента остается невыясненным и требует дальнейшего исследования.

1. Feng T. et al. Characterization of an extensin-modifying metalloprotease: N-terminal processing and substrate cleavage pattern of *Pectobacterium carotovorum* Prt1 // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2014. 98 (24): p. 10077–89.

2. Eshwar A.K. et al. Interaction of matrix metalloproteinase-9 and Zpx in *Cronobacter turicensis* LMG 23827(T) mediated infections in the zebrafish model // *Cell Microbiol.*, 2018. 20 (11): p. e12888.
3. Cabral C.M. et al. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az29 // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. 70 (7): p. 3831-8.
4. Held K.G. et al. A metalloprotease secreted by the insect pathogen *Photorhabdus luminescens* induces melanization // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007. 73 (23): p. 7622-8.
5. Bozhokina E., Kevers L., Khaitlina S. The *Serratia grimesii* outer membrane vesicles-associated grimelysin triggers bacterial invasion of eukaryotic cells // *Cell Biol. Int.*, 2020. 44 (11): p. 2275–83.
6. Khaitlina S. et al. Bacterial Actin-Specific Endoproteases Grimelysin and Protealysin as Virulence Factors Contributing to the Invasive Activities of *Serratia* // *Int. J. Mol. Sci.*, 2020. 21 (11).
7. Chukhontseva K.N. et al. The protealysin operon encodes emfourin, a prototype of a novel family of protein metalloprotease inhibitors // *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021. 169: p. 583–596.

Повышение термостабильности гликозил-гидролаз методами белковой инженерии

Селимзянова А. И.^{1,2}, Рыков С. В.¹, Березина О. В.¹

¹ Курчатовский комплекс генетических исследований
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

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

selimz.alina99@mail.ru

Грибные эндоглюканазы из семейства 12 гликозил-гидролаз широко применяются в сельском хозяйстве в качестве кормовых добавок. Подготовка кормов часто проходит при повышенной температуре, поэтому возникает необходимость использования термостабильных ферментов. Повышение термостабильности гликозил-гидролаз методами белковой инженерии имеет большую практическую значимость в связи с активным развитием животноводства в России. Кроме того, структурно-функциональные исследования необходимы для понимания природы термостабильности ферментов [1, 2].

В работе [3] было показано, что введение валина в положение 35 аминокислотной последовательности целлюлазы Cel12A из *Hypocrea jecorina* приводит к увеличению термостабильности этого фермента.

С помощью сайтнаправленного мутагенеза нами была проведена замена гомологичного остатка валина в положении 59 у термостабильной эндоглюканазы ThTeGH12 из термофильного гриба *Thermothielavioides terrestris* с целью подтверждения важности этого остатка для термостабильности фермента. Также был получен мутант AsCeGH12 из *Aspergillus cervinus* с заменой Y54V, направленной на повышение термостабильности фермента.

Проведен биосинтез белков AsCeGH12 и ThTeGH12, а также их мутантных форм в *Escherichia coli*. Показано, что мутация Y54V повышает температурный максимум активности AsCeGH12 с 55 до 60 °С. Мутация V59S у ThTeGH12 снижает температурный максимум активности с 70 до 60 °С и уменьшает стабильность при повышенной температуре.

В результате получен более термостабильный вариант белка AsCeGH12, являющийся перспективным кандидатом для использования в составе кормовых ферментных комплексов. Подтверждена важность остатка V59 для термостабильности эндоглюканазы ThTeGH12.

Работа поддержана государственным заданием НИЦ «Курчатовский институт» (№ АААА-А20-120093090015-2 от 30.09.2020).

1. Damasio A.R.L., Ribeiro L.F.C. et al. Functional characterization and oligomerization of a recombinant xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (GH12) from *Aspergillus niveus* // Biochim. Biophys. Acta. 1824, 461–467 (2012).
2. Calzado F., Prates E.T. et al. Molecular basis of substrate recognition and specificity revealed in family 12 glycoside hydrolases // Biotechnol. Bioeng. 113, 2577–2586 (2016).
3. Sandgren M., Ståhlberg J., Mitchinson C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes // Prog. Biophys. Mol. Bio. 89, 246–291 (2005).

Функционирование промоторов генов *FAP* и *CTGF* человека в составе векторных конструкций. Модель *Danio rerio*

Селина П. И., Плешкан В. В., Костров С. В.

НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва, Россия

greenapple_35@mail.ru

В области противоопухолевой генной терапии одно из актуальных направлений связано с разработкой лекарственных средств, нацеленных на раковое микроокружение. Для селективного действия препаратов могут быть использованы промоторы генов, сверхэкспрессированных в опухольассоциированных клетках. В этом плане гены человека фактора роста соединительной ткани (*CTGF*) и белка активации фибробластов (*FAP*) представляются потенциальными источниками векторных компонентов [1–4].

Ранее промоторы *CTGF* и *FAP* были охарактеризованы на культурах перевиваемых клеток и продемонстрировали пониженную экспрессионную эффективность по сравнению с промотором предранних генов цитомегаловируса человека (*CMV*) [5]. Нами проводится исследование их функционирования на организменном уровне при использовании модели *Danio rerio*.

Мы обнаружили, что при введении генетических конструкций в оплодотворенные яйцеклетки зебрафиш анализируемые промоторы способны обеспечивать накопление маркерного белка и экспрессирующих его клеток, близкое к уровню, обусловленному функционированием промотора *CMV*. Полученные данные указывают на перспективность использования промоторов *CTGF* и *FAP* для конструирования высокоэффективных векторов.

Стоит отметить, что высокую экспрессионную эффективность промотора *FAP* наблюдали только у особей, имеющих различные патологии в развитии. При этом по результатам эмбриотоксического анализа функционирование экзогенного промотора *FAP* не индуцировало рост числа аномальных животных.

Таким образом, изменение функционирования промотора *FAP* ассоциировано с нарушением процесса формирования тканей организма. Благодаря обнаруженной особенности данный элемент может быть использован для нацеливания векторных систем на атипично сформированную строму, в связи с чем может оказаться перспективным в противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки России (грант № 075-15-2021-1062).

1. Patsouras D. et al. Fibroblast activation protein and its prognostic significance in correlation with vascular endothelial growth factor in pancreatic adenocarcinoma // *Mol. Med. Rep.*, 2015. 11 (6): p. 4585–4590.
2. Zou B. et al. The Expression of FAP in Hepatocellular Carcinoma Cells is Induced by Hypoxia and Correlates with Poor Clinical Outcomes // *J. Cancer*, 2018. 9 (18): p. 3278–3286.
3. Li X.T. et al. Overexpression of connective tissue growth factor is associated with tumor progression and unfavorable prognosis in endometrial cancer // *Cancer Biomark.*, 2019. 25 (4): p. 295–302.
4. Kim G.J. et al. Increased expression of CCN2, epithelial membrane antigen, and fibroblast activation protein in hepatocellular carcinoma with fibrous stroma showing aggressive behavior // *PLoS One*, 2014. 9 (8): p. e105094.
5. Antonova D.V. et al. Possibility for transcriptional targeting of cancer-associated fibroblasts-limitations and opportunities // *Int. J. Mol. Sci.*, 2021. 22 (7): 3298.

Контроль УФ-индуцированного мутагенеза у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* генами *RAD30* и *ASF1*

Скобелева И. И.¹, Королев В. Г.^{1,2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия

skobeleva_ii@npi.nrcki.ru

В процессе репликации ДНК репликативная вилка может столкнуться с повреждением на матричной ДНК. Для продолжения репликации клетки используют механизм обхода повреждений ДНК [2]. Изучение воздействия малых доз УФ на живые организмы актуально, т. к. биологические эффекты малых доз в научной литературе описаны с невысокой достоверностью.

В ответ на повреждения ДНК клетки используют сеть сигнальных переносчиков, управляющих прохождением клеточного цикла (чекпойнт) и процессом репарации. Ген *RAD30* кодирует репарационную полимеразу Pol η , которая играет большую роль в контроле репарационного мутагенеза.

Продукт экспрессии гена *ASF1* – многофункциональный белок, играющий роль в сборке хроматина, регуляции активности киназы Rad53 и стабилизации репликативного комплекса. В нормальных условиях белок Asf1 находится в комплексе с Rad53, что дезактивирует оба белка. Мутант *asf1* (одиночный) не проверялся при малых дозах, на данный момент в литературе отсутствуют данные о его мутагенезе.

Ранее было показано, что мутант *rad30* при высоких дозах УФ показывает уровень УФ-индуцированного мутагенеза ниже, чем дикий тип [1]. Далее при изучении УФ-индуцированного мутагенеза при малых дозах было подтверждено, что мутант демонстрирует действительно мутагенез выше, чем у дикого типа.

При малых дозах УФ одиночный мутант *asf1* не отличается от дикого типа, как и при высоких дозах, что было показано ранее в нашей лаборатории. Как видно из результатов, полученных нами, при переходной дозе (20 Дж/м²) мы не наблюдаем достоверного отличия мутагенеза у двойного мутанта *asf1rad30* от одиночного *asf1*. Результат можно объяснить тем, что мутация *asf1* при использованной дозе приводит к значительно большей активации киназы Rad53, чем в клетках дикого типа, и мы наблюдаем эффект мутации *rad30*, аналогичный эффекту при больших дозах УФ.

Таким образом, можно сделать вывод, что при малых дозах мутагена белок Asf1 ответственен за УФ-индуцированный мутагенез, опосредованный отсутствием активного гена *RAD30*.

1. Alekseeva E.A., Evstyukhina T.A., Peshekhonov V.T., Korolev V.G. Participation of the HIM1 gene of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the error-free branch of post-replicative repair and role Pol η in him1-dependent mutagenesis // *Current Genetics*. 2021. V. 67. P. 141–151.
2. Friedberg suffering in silence: the tolerance of DNA damage // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. V. 6. P. 943–953.

Идентификация новых антимикробных пептидов с BRICHOS-доменом в геномных данных и их структурно-функциональные исследования

Сметанин Р. В.¹, Микушина А. Д.¹, Сухарева М. С.², Жаркова М. С.²,
Комлев А. С.², Шамова О. В.², Елисейев И. Е.¹

¹ Санкт-Петербургский национальный исследовательский
Академический университет им. Ж. И. Алфёрова РАН, Санкт-Петербург, Россия
² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

ruslan-smetanin97@mail.ru

Появление лекарственно-устойчивых (ЛУ) штаммов бактерий влечет необходимость разработки новых антимикробных (АМ) препаратов. Методы «золотой эры» поиска антибиотиков теряют эффективность и ведут к идентификации известных молекул [1].

Новыми направлениями являются поиск АМ пептидов (АМП) *de novo* в транскриптомах и их модификация. АМП, продуцируемые врожденной иммунной системой многоклеточных, обладают мембранолитической активностью (МА) и могут применяться для замены/дополнения к антибиотикам [2].

Целью работы являлось изучение новых представителей семейства белков с BRICHOS-доменом (BD), содержащих на С-конце АМП. Такие АМП преимущественно β -шпилькой и высокой активностью обнаружены у аннелид. Это семейство объединяет функционально не связанные белки с уникальным BD, вероятно работающим как молекулярный шаперон [3]. Из более 7 000 таких белков мы выделили белки с одиночным BD и С-концевым пептидом, богатым Cys, и отобрали 47 аннотированных белков. Проведен MSA аминокислот, построено филогенетическое дерево.

В итоге обнаружены два белка, предположительно имеющие МА- и АМ-свойства. Для определения экспрессии генов АМП мы проанализировали транскриптомы SRA тканей изучаемых организмов в NCBI и сравнили с экспрессией генов домашнего хозяйства. Из симметричного расположения 4 Cys в пептидах мы предположили, что они формируют β -шпильки с двумя S–S-связями, как и Argentin-1–3. Моделирование белков в AlphaFold показало, что они имеют β -структуру, удерживаемую двумя S–S-связями, а пропептид имеет гидрофобную часть на С-конце, в котором АМП, предположительно, переносится к месту назначения [4].

Для экспериментального исследования мы синтезировали, очистили и исследовали два пептида с помощью КД-спектроскопии. Так подтвердилось, что пептиды принимают β -шпильчатую конформацию в комплексе с мицеллами SDS и DPC. Изучаемые АМП имеют высокую АМ-активность и низкую токсичность для

клеток человека. Это доказывает важность поиска пептидных молекул животных с высоким потенциалом применения.

1. Terekhov S.S., Osterman I.A., Smirnov I.V. High throughput screening of natural biodiversity to find new antibiotics (2018).
2. Kruglikov R.N., Panteleev P.V., Bolosov I.A. et al. Study of a new family of proline-rich antimicrobial peptides in artiodactyls // Collection of abstracts XXXIII Winter International Youth Scientific School “Perspective DirectionS of Physico-Chemical Biology and Biotechnology” (2021).
3. Chen G., Abelein A., Nilsson H.E. et al. Bri2 BRICHOS client specificity and chaperone activity are governed by assembly state // Nat. Commun. 8, 2081 (2017).
4. Tsaban T., Varga J.K., Avraham O. et al. Harnessing protein folding neural networks for peptide–protein docking // Nat. Commun. 13, 176 (2022).

Экспрессия *SOR1* является лимитирующей стадией метаболизма сорбитола у дрожжей *Komagataella kurtzmanii*

Соколова Д. Д.¹, Акентьев Ф. И.^{1, 2}, Губайдуллин И. И.^{1, 2}, Козлов Д. Г.²

¹ Курчатовский геномный центр Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

kalabanova_dasha@mail.ru

В настоящее время штамм дрожжей *Komagataella kurtzmanii* Y-727 используется в качестве основы системы экспрессии генов, превосходящей по своей эффективности известный прототип *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) [1]. Установлено, что геномы обеих дрожжей содержат гены *SOR1*, кодирующие сорбитолдегидрогеназы SDH727 и SDH115, обладающие 98%-ной гомологией. При этом дрожжи *K. phaffii* имеют фенотип Sor+, обеспечивающий им эффективный рост на минимальной среде с сорбитолом, а *K. kurtzmanii* – Sor-. При этом ген *SOR1*_{GS115} дрожжей *K. phaffii* способен эффективно комплементировать ростовой дефект штамма *K. kurtzmanii*. Вместе взятые приведенные данные характеризовали метаболическую загадку штамма *K. kurtzmanii*, изучению которой была посвящена настоящая работа.

Для ее решения были получены высокоочищенные рекомбинантные ферменты SDH727 и SDH115 и определены их свойства. Анализ показал, что ферменты обладали сравнимой удельной активностью и характеризовались близкими значениями кинетических констант $K_m = 157,83$ мМ, $V_{max} = 256,4$ МЕ/мг и $K_m = 133,3$ мМ, $V_{max} = 163,93$ МЕ/мг соответственно. С использованием гена *lacZ* был проведен сравнительный анализ активности промоторных и терминаторных элементов обоих генов в клетках дрожжей *K. kurtzmanii*. В результате было обнаружено, что оба промотора являлись конститутивными, активность промотора *pSOR1*_{Y-727} была в 2 раза ниже активности *pSOR1*_{GS115}, активность терминаторных элементов этих генов оказалась одинаковой. Измерение относительной «силы» показало, что промоторы *pSOR1* были в 15–30 раз слабее промотора глицеральдегидфосфатдегидрогеназы *pGAP*.

В совокупности полученные данные свидетельствовали о том, что именно слабая активность промотора *pSOR1*_{Y-727} определяла фенотип Sor- дрожжей *K. kurtzmanii*. При этом, вероятно, экспрессия *SOR1* оказывалась настолько низкой, что даже небольшое ее увеличение за счет введения дополнительных копий гена позволяло преодолеть ростовой дефект.

1. Gorbunov A.A., Akentyev F.I., Gubaidullin I.I., Zhiganov N.I., Tereshchenkova V.F., Elpidina E.N., Kozlov D.G. Biosynthesis and Secretion of Serine Peptidase SerP38 from *Tenebrio molitor* in the Yeast *Komagataella kurtzmanii* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2021. V. 57. No. 9. P. 917–924.

Доставка экзогенного белка в клетки человека при помощи экстраклеточных везикул микроводорослей

Спицына А. С.¹, Гараева Л. А.-А.^{1, 3, 4}, Путевич Е. Д.^{1, 4}, Толстыко Е. А.¹,
Гармай Ю. П.¹, Емельянова С. С.¹, Ястремский Е. В.³, Комарова Е. Ю.²,
Сизова И. А.¹, Штам Т. А.^{1, 2, 3}

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁴ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Экстраклеточные везикулы – наноразмерные частицы, окруженные липидным бислоем, переносящие белки и нуклеиновые кислоты. Везикулы представляют собой перспективные системы доставки лекарственных веществ, поскольку могут целенаправленно доставлять биоактивные молекулы без деградации [1]. В качестве таких систем доставки рассматриваются наночастицы растительного происхождения. В частности, как было показано в [2], нативные экстраклеточные везикулы из грейпфрута хорошо зарекомендовали себя в качестве доставщика экзогенного белка в клетки человека. В свою очередь, контролирование процесса культивации микроводорослей и секреции везикул позволяет в перспективе унифицировать процесс выделения нанообъектов [3].

Целью работы было оценить возможность везикул, выделенных из микроводорослей хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii*) и хлореллы (*Chlorella vulgaris*), доставлять экзогенный белок (HSP70) в клетки человека *in vitro*.

Везикулы из культуральной среды были выделены методом последовательного центрифугирования; были подобраны оптимальные условия, при которых микроводоросли продуцируют наибольшее количество частиц. С помощью ультразвука везикулы нагружали флуоресцентно-меченым белком HSP70-Alexa647. Размеры частиц были оценены следующими методами: атомно-силовой микроскопией, анализом траектории наночастиц и динамическим рассеянием света; метод криоэлектронной микроскопии позволил оценить морфологию везикул; при помощи электрофоретического рассеяния света был получен дзета-потенциал выделенных наночастиц; флуориметрия позволила оценить влияние перечисленных параметров на эффективность загрузки экзогенного белка в везикулы. Далее везикулы были соинкубированы с клетками человека и при помощи проточной цитометрии была проанализирована эффективность захвата клетками везикул, нагруженных белком.

Размеры везикул из микроводорослей варьируются в диапазоне от 30 до 200 нм. Дзета-потенциал для частиц из обоих продуцентов лежит в области от

–3 до –5 мВ. Форма везикул преимущественно сферическая, однако также встречались частицы неправильной формы или имеющие несколько билипидных слоев.

Результаты проточной цитометрии, коррелирующие с результатами флуориметрии, позволили заключить, что экстраклеточные везикулы, выделенные из микроводорослей хлореллы и хламидомонады, эффективно доставляют экзогенный белок к клеткам человека *in vitro*.

Работа выполнена в рамках государственного задания (№ 121060200125-2).

1. Zhao L., Zhu R., Liu Y. et al. Extracellular vesicles: a novel messenger of unicellular microalgae communication? // Research Square. 2020.
2. Garaeva L., Kamyshinsky R., Kil Y. et al. Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells *in vitro* // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 6489.
3. Picciotto S. et al. Isolation of extracellular vesicles from microalgae: towards the production of sustainable and natural nanocarriers of bioactive compounds // Biomater. Sci. 2021. V. 9. No. 8. P. 2917–2930.

Анализ данных UCE-секвенирования дублицированных геномов

Тельная Е. А.¹, Винников К. А.^{1, 2}

¹ Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Краснодарский край, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

serlina1624@gmail.com

Секвенирование ультраконсервативных элементов (UCE) является одним из наиболее эффективных подходов генотипирования относительно больших выборок особей у немодельных организмов [1]. Данный метод показал превосходные результаты при разрешении глубокой филогении и сложных эволюционных паттернов у давно дивергировавших крупных таксонов [2, 3]. Однако во всех исследованных геномах UCE-локусы встречались исключительно только один раз.

В данной работе мы разработали протокол, который позволяет идентифицировать однонуклеотидные полиморфизмы на локусах UCE в дублицированных геномах. В таких случаях UCE встречаются более чем один раз на разных хромосомах у каждой исследуемой особи. Основной задачей предлагаемого протокола является обнаружение индивидуальных UCE-локусов у каждой особи, а затем их сопоставление между собой у особей с различными наборами хромосом. В качестве модельного объекта нами были использованы данные секвенирования хариусовых рыб (*Salmoniformes: Thymallidae*), у которых дубликация генома происходила в ходе эволюции 4 или более раз. UCE-секвенирование производилось на платформе Ion S5 (Thermo Fisher Scientific). UCE-данные по всем видам были смешаны в общий пул и собирались *de novo* в ассемблере Trinity [4]. Для каждого UCE произведена аннотация с помощью BLASTn [5] и выявлены соответствующие изоформы на разных хромосомах. Изоформы затем были объединены в кластеры с помощью CD-HIT-EST [6] и пересобраны с помощью CAP3 [7]. В результате для каждого UCE-локуса было получено несколько отличных друг от друга паралогов. Число обнаруженных паралогов для каждого UCE-локуса обычно соответствовало числу дублицированных хромосом. Далее осуществлялось картирование коротких чтений для каждого отдельного вида в BWA [8] и последующая очистка собранной консенсусной последовательности для получения финального UCE-участка. Выравнивание полученных UCE-участков у выборки из разных хариусовых рыб позволило получить устойчивый сигнал для реконструкции их филогенетических отношений.

1. Faircloth B.C., McCormack J.E., Crawford N.G. et al. Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales // *Systematic biology*. 2012. V. 61. Iss. 5. P. 717–726. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys004>
2. Faircloth B.C., Sorenson L., Santini F., Alfaro M.E. A phylogenomic perspective on the radiation of ray-finned fishes based upon targeted sequencing of ultraconserved elements (UCEs) // *PloS ONE*. 2013. V. 8. Iss. 6. P. e65923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065923>
3. Jarvis E.D., Mirarab S., Aberer A.J. et al. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds // *Science*. 2014. V. 346. Iss. 6215. P. 1320–1331. <https://doi.org/10.1126/science.1253451>
4. Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M. et al. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis // *Nature Protocols*. 2013. V. 8. Iss. 8. P. 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
5. Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search tool // *Journal of Molecular Biology*. 1990. V. 215. Iss. 3. P. 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
6. Li W., Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences // *Bioinformatics*. 2006. V. 22. Iss. 13. P. 1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
7. Huang X., Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program // *Genome Research*. 1999. V. 9. Iss. 9. P. 868–877. <https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868>
8. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. Iss. 14. P. 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>

Молекулярно-генетические маркеры синдрома Шелдона – Холла

Ткачева И. В.^{1,2}, Комиссаров А. Е.¹, Слепнева Е. Э.¹, Саранцева С. В.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

iritka4eva@gmail.com

Синдром Шелдона – Холла является наиболее распространенным типом (2В) дистального артрогрипоза (ДА) – группы заболеваний, характеризующихся врожденными множественными контрактурами суставов. У пациентов с данным синдромом также наблюдается невысокий рост, треугольное лицо, небольшой рот, выраженные носогубные складки и нормальные когнитивные способности, часто встречается камптодактилия и локтевое отклонение [1].

В настоящее время пренатальная ультразвуковая диагностика возможна только на поздних сроках беременности, так как в большинстве случаев пороки развития плода не могут быть выявлены до 18-й недели беременности [2].

Основная цель данной работы заключается в поиске патогенных генетических вариантов, приводящих к развитию синдрома Шелдона – Холла. Данный синдром может быть вызван патогенными вариантами генов *MYH3*, *TNNI2*, *TRPM2* и *TNNT3*.

Для поиска патогенных генетических вариантов было проведено полноэкзомное секвенирование геномной ДНК двух детей с диагнозом ДА2В. С помощью дальнейшей биоинформатической обработки данных у этих пациентов были обнаружены однонуклеотидные замены в гене *TNNT3* (rs121434638 и rs199474721). Далее у пациентов было проведено секвенирование по Сэнгеру фрагментов гена *TNNT3*. В каждой семье проводили секвенирование фрагментов ДНК только пробанда. Если был выявлен предполагаемый патогенный генетический вариант, то была протестирована ДНК всех доступных членов семьи. С помощью такого подхода у еще двух пациентов были обнаружены патогенные варианты гена *TNNT3* в гетерозиготном состоянии (rs121434638 и rs199474721).

Данные однонуклеотидные замены приводят к изменению аминокислоты аргинин в положении 63, что подчеркивает ее критическую роль. Эта аминокислота является консервативной и сохраняется во всех известных изоформах белка тропонина Т (ТnТ), что также подтверждает ее значимость. Замена аминокислоты аргинин в положении 63 в быстрой скелетной изоформе ТnТ нарушает взаимодействие ТnТ с тропомиозином, что может привести к развитию контрактур и деформациям конечностей.

Работа поддержана грантом РНФ № 23-24-00555.

1. Scala M., Accogli A., De Grandis E. et al. A novel pathogenic MYH3 mutation in a child with Sheldon–Hall syndrome and vertebral fusions // *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2018. 176 (3), pp. 663–667.
2. Jiang M., Bian C., Li X. et al. Molecular prenatal diagnosis for hereditary distal arthrogyrosis type 2B // *Prenatal Diagnosis*. 2007. 27 (5), pp. 468–470.

Изучение роли фактора сборки и ремоделирования хроматина Chd1 в регуляции транскрипции генов в ходе развития дрозофилы

Торошина А. В.¹, Вершинина Е. А.^{1,2}, Конев А. Ю.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

toroshchina_av@pmpi.nrcki.ru

CHD1 (Chromodomain-Helicase DNA-binding 1) – консервативный АТФ-зависимый хроматинремоделирующий фактор из семейства SWI/SNF. Эти факторы необходимы для преобразований хроматина в процессах реализации генетической информации. Белок CHD1 дрозофилы участвует не только в ремоделировании хроматина, но и в сборке хроматина *in vivo* [1].

В геноме человека есть два гомолога CHD (CHD1 и CHD2) [3], являющихся онкогенами. Как делеции гена *Chd1*, так и сверхпродукция белка CHD1 вызывают образование онкологических опухолей простаты [2], что делает этот фактор возможной терапевтической мишенью.

Сверхпродукция в клетках дрозофилы хроматинремоделирующих белков дикого типа и форм белков с нарушенной АТФазной активностью позволяет исследовать их функции и механизмы действия.

Ранее нами показано, что сверхэкспрессия в клетках слюнных желез личинок дрозофилы как нативной, так и каталитически неактивной форм белка CHD1 приводит к деконденсации строго определенных участков политенных хромосом, с которыми связывается белок CHD1 и РНК-полимераза II. С помощью метода RT-qPCR мы изучили влияние сверхпродукции исследуемых форм белка CHD1, а также нуль-мутаций гена *Chd1* на экспрессию тканеспецифичных генов, изменяющих уровень транскрипции в слюнных железах в ходе развития. Эти гены локализуются в деконденсированных при сверхпродукции исследуемых форм CHD1 районах хромосом. Особи со сверхпродукцией белка CHD1 дикого типа либо мутантной формой белка проявляют достоверные отличия от особей дикого типа как в уровне транскрипции исследованных генов, так и динамике ее изменений в ходе развития. Мы наблюдали сходный характер изменений транскрипции при сверхпродукции обеих форм белка, не совпадающий с эффектами нуль-мутаций. Следовательно, влияние сверхэкспрессии трансгенов *Chd1* и на структуру хромосом, и на экспрессию генов связано с высокой концентрацией белка в клетках, а не его каталитической активностью.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00864.

1. Konev A.Y., Tribus M., Sung Y., Podhraski V. et al. CHD1 motor protein is required for deposition of histone variant H3.3 into chromatin *in vivo* // Science. 2007. V. 317 (5841). P. 1087–1090.
2. Rodrigues L.U., Rider L., Nieto C., Romero L. et al. Coordinate loss of MAP3K7 and CHD1 promotes aggressive prostate cancer // Cancer Res. 2015. V. 15. 75 (6). P. 1021-34.
3. McDaniel I.E., Lee J.M., Berger M.S., Hanagami C.K., Armstrong J.A. Investigation of CHD1 function in transcription and development of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2008. V. 178 (1). P. 583–587.

Поиск бактериальных белков, способных коагрегировать с альфа-синуклеином

Трубицина Н. П.¹, Журавлева Г. А.^{1, 2}, Бондарев С. А.^{1, 2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики
и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии
амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

n.trubitsina@spbu.ru

Амилоиды все больше привлекают к себе внимание ввиду их загадочной природы и участия в развитии нейродегенеративных заболеваний у человека, таких как болезни Паркинсона (БП), Альцгеймера и др. [1]. Не так давно стал известен феномен коагрегации, при котором амилоиды одного белка индуцируют конформационный переход другого, например: амилоид бета (A β) и tau [2], A β - и альфа-синуклеин (aSyn) [3]. Было показано, что белок *Escherichia coli* CsgA, который участвует в формировании структур керли на поверхности клетки, ускоряет агрегацию aSyn *in vitro* [4, 5]. Кроме того, в последнее время стали накапливаться данные о влиянии изменения в составе бактериальной микрофлоры на развитие некоторых нейродегенеративных заболеваний, в частности спорадического варианта БП [6]. Таким образом, можно предположить, что не только агрегаты CsgA, но и другие амилоиды бактерий могут индуцировать агрегацию aSyn. Поиск таких белков стал целью нашей работы.

С помощью программы AmyloComp мы искали белки, сходные по структуре с aSyn. Сначала мы сравнили известные структуры фибрилл aSyn с белком CsgA для подбора оптимальных параметров программы. Далее выбрали виды бактерий, количество которых изменяется у людей с БП. Для этого использовали базу данных Disbiome [7]. Последовательности бактериальных протеомов были взяты из базы данных Uniprot. Мы обнаружили, что среди белков бактерий, увеличение численности которых ассоциировано с развитием БП, больше кандидатов, способных к коагрегации с aSyn по сравнению с другими проанализированными бактериями. Анализ обогащения терминами Gene Ontology показал, что среди кандидатов увеличено число белков, располагающихся снаружи клетки. Действительно, именно такие белки в первую очередь могут контактировать с белками человека.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-74-10042.

1. Mativ A.B., Trubitsina N.P. et al. // Biochem. 85, 1011–1034 (2020).
2. Spires-Jones T.L., Attems J. et al. // Acta Neuropathol. 134 (2), 187–205 (2017).
3. Ono K., Takahashi R. et al. // J. Neurochem. 122 (5), 883–90 (2012).

4. Chen S.G., Stribinskis V. et al. // *Sci. Rep.* 6, 34477 (2016).
5. Sampson T.R., Challis C. et al. // *eLife*. 9, e53111 (2020).
6. Hill A.E., Wade-Martins R. et al. // *Front. Neurosci.* 15, 708587 (2021).
7. Janssens Y., Nielandt J. et al. // *BMC Microbiol.* 18 (1), 50 (2018).

Плейотропия CNV в патогенетике нарушений эмбрионального и психомоторного развития

Федотов Д. А., Кашеварова А. А., Лопаткина М. Е., Васильева О. Ю.,
Беляева Е. О., Назаренко Л. П., Дроздов Г. В., Лебедев И. Н.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН,
Томск, Россия

dmitry.fedotov@medgenetics.ru

К настоящему времени опубликовано три крупномасштабных исследования, в которых показана связь между невынашиванием беременности (НБ) у женщины и рождением у нее детей с нарушениями психомоторного развития (НПР) [1–3]. В основе данного феномена могут лежать общие генетические факторы, в том числе вариации числа копий участков ДНК (CNV). Целью данной работы был поиск CNV, патогенетически проявляющихся как в пренатальном, так и в постнатальном периодах развития.

С помощью хромосомного микроматричного анализа (60K, Agilent Technologies) обследовано 1175 пациентов с НПР. Идентифицировано 530 патогенных и потенциально патогенных CNV у 422 (36 %) пациентов. Пробанды с CNV и без них были разделены на подгруппы относительно наличия (41 и 24 соответственно) или отсутствия (165 и 209 соответственно) НБ в анамнезе их матерей. Впервые показано, что CNV встречаются статистически значимо чаще в группе с НБ ($p = 0,005$). Выполнено сравнение спектра CNV между двумя группами. В группе с НБ идентифицированы 22 уникальные CNV. С помощью ресурса Enrichr и онтологии «Фенотип млекопитающих» проведен анализ обогащения и определены пять значимых категорий, ассоциированных с нарушениями эмбриогенеза: MP:0004201, MP:0003891, MP:0009783, MP:0011199, MP:0012098. Интересно, что данные категории связаны с генами, вовлеченными в dup16p11.2 (*MAZ*, *PAGR1*), dup16q23.3 (*HSD17B2*), dup18q11.2 (*CELF4*), dup20q13.32 (*END3*).

Согласно литературным данным, del/dup16p11.2 и dup16q23.3 ранее были выявлены в выборке спонтанных абортусов [4]. Dup16p11.2 является синдромальной и включает 29 генов, ассоциированных и с нервной системой (*PRRT2*, *MAPK3*, *DOC2A*, *KCTD13*), и с нарушениями эмбриогенеза (*MAZ*, *PAGR1*, *TBX6*). Известно, что трисомия 16 является одной из наиболее частых причин спонтанного прерывания беременности. Возможно, увеличение копий региона 16p11.2 обладает плейотропным эффектом, объясняющим вышеописанную ассоциацию.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 21-65-00017 (<https://rscf.ru/project/21-65-00017/>).

1. Ji H., Yu Y., Miao M. et al. Risk of intellectual disability and maternal history of spontaneous abortion: a nationwide cohort study // *Dev. Med. Child Neurol.* 2021. V. 63. No. 7. P. 831–838.
2. Wang H., Li F., Miao M. et al. Maternal spontaneous abortion and the risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in offspring: a population-based cohort study // *Hum. Reprod.* 2020. V. 35. No. 5. P. 1211–1221.
3. Paz Levy D., Wainstock T., Sheiner E. et al. Maternal recurrent pregnancy loss is associated with an increased risk for long-term neurological morbidity in offspring // *Dev. Med. Child Neurol.* 2019. V. 61. No. 1. P. 91–97.
4. Li S., Chen L.N., Wang X.H. et al. Correction: chromosomal variants accumulate in genomes of the spontaneous aborted fetuses revealed by chromosomal microarray analysis // *PLoS One.* 2022. V. 17. No. 1. e0263099.

Исследование проводящих свойств эндогенных механочувствительных каналов Piezo1 в клетках миелоидной лейкемии человека

*Хайруллина З. М.¹, Лысикова Д. В.¹, Кириллова П. И.^{1,2}, Васильева В. Ю.¹,
Сударикова А. В.¹, Чубинский-Надеждин В. И.¹*

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

khairyllinaa@mail.ru

Механочувствительные (МЧ) ионные каналы являются одними из основных участников процессов механотрансдукции, так как способны быстро преобразовывать механические стимулы в различные биологические реакции [1]. Важным шагом в механобиологии стала идентификация новых МЧ-катионных каналов Piezo. Каналы Piezo1 участвуют во множестве процессов как в норме, так и при патологиях, включая онкотрансформацию [2], и могут быть перспективными мишенями для разработки направленных подходов в противоопухолевой терапии.

Ранее нами были оценены характеристики одиночных каналов Piezo1 в растворе, имитирующем внеклеточный и содержащем несколько катионов, для которых проницаемы Piezo1 (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) [3]. В данной работе с помощью метода patch-clamp исследовали унитарные свойства эндогенных каналов Piezo1 при их стимуляции селективным химическим активатором Yoda1 в клетках миелоидной лейкемии человека в различных ионных условиях. В конфигурации whole-cell было показано, что проводимость каналов Piezo1, активированных Yoda1 в присутствии только ионов Na^+ , составила 30–35 пСм, что значительно превышало значения, характерные для Piezo1, регистрируемых в стандартном растворе (19 пСм). Проводимость каналов при добавлении одного из двухвалентных катионов (Ca^{2+} или Mg^{2+}) снижалась до 20–25 пСм. В присутствии обоих двухвалентных катионов проводимость каналов снижалась до 18–19 пСм, что совпадало со значениями, полученными ранее. Опыты в конфигурации cell-attached (отведение от участка клеточной мембраны) показали, что проводимость механоактивируемых Piezo1-каналов совпадает с Yoda1-активируемыми Piezo1 и составляет 30–35 пСм в отсутствие двухвалентных катионов. В конфигурации whole-cell также была продемонстрирована прямая проницаемость каналов Piezo1 для Mg^{2+} . Наши данные показывают принципиальную возможность Piezo1-опосредованного транспорта ионов Mg^{2+} , являющихся важными кофакторами в различных ферментативных реакциях в живых клетках [4].

Работа поддержана грантом РФФ № 22-74-10037.

1. Xiao R., Xu X.Z. // J. Curr. Biol. 20 (21) (2010).
2. De Felice D., Alaimo A. // J. Cancers (Basel). 12 (7) (2020).
3. Vasileva V., Morachevskaya E. et al. // J. Mol. Sci. 22 (15) 2021.
4. Payandeh J., Pfoh R. et al. // J. Biochim. Biophys. Acta. 1828 (11) 2013.

**Определение взаимодействий между белками деления
Acholeplasma laidlawii и *Mycoplasma gallisepticum*
при помощи двухгибридной системы**

Хасанова А. А., Голофеева Д. М., Румянцева Н. А., Ведяйкин А. Д.

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

hasanova_aizilya@mail.ru

Цитогенез – один из фундаментальных процессов, обеспечивающих размножение как прокариотических, так и эукариотических клеток. Процессом деления бактерий управляет многокомпонентная молекулярная машина – дивисома, главным компонентом которой является белок FtsZ, образующий Z-кольцо. В этой работе объектом исследования являлись бактерии класса *Mollicutes* (микоплазмы): *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum*, являющиеся патогенами эукариот [1].

Исследуемыми белками являлись FtsA, FtsK, EFTU, SepF и IbpA. Известно, что в хорошо изученных бактериях белок FtsA непосредственно взаимодействует с белком FtsZ в Z-кольце и связывает его с мембраной. Белок FtsK является ДНК-транслоказой. SepF выполняет функции, похожие на функции FtsA, и связывает Z-кольцо с мембраной [2]. IbpA – малый белок теплового шока. Конкретные функции этих белков, в том числе их роль в процессе деления, в микоплазмах не до конца определены.

Функциональное воздействие двух белков в клетке можно оценить при помощи двухгибридной системы. Двухгибридная система представляет собой искусственно сконструированную генетическую систему, предназначенную для облегчения обнаружения и оценки белок-белковых взаимодействий [3]. В данной работе она была использована для изучения взаимодействий между FtsZ и FtsA, FtsK, EFTU, SepF и IbpA.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (грант президента МК-1345.2022.1.4).

1. Vedyaykin A.D. et al. Mechanisms of Bacterial Cell Division // Microbiology (Russian Federation). 2019, 88 (3), P. 245–260.
2. Nika Pende et al. SepF Is the FtsZ Anchor in Archaea, with Features of an Ancestral Cell Division System // Nature Communications. 2021, 12 (1), P. 3214.
3. Serebriiskii I., Peri S., Golemis E.A. Two-Hybrid Protein–Protein Interactions // Encyclopedia of Biological Chemistry, 2013. P. 460–462.

Оптимизация экспрессии нуклеазы Cas9 для создания системы редактирования CRISPR/Cas9 бактерий *Bacillus subtilis*

Хегай А. А.^{1,2}, Гнучих Е. Ю.¹

¹ Курчатовский комплекс генетических исследований
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

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

khegay.anna00@mail.ru

Система CRISPR/Cas – это инструмент, позволяющий вносить мутации в заданные последовательности без использования селективных маркеров [1]. Комплекс Cas9/sgPНК производит двуцепочечный разрыв ДНК в запрограммированных местах, выступая в качестве ДНК-специфической системы негативной селекции при отборе модифицированных клонов от клонов дикого типа [2].

Для конструирования функциональной системы CRISPR/Cas9 была создана библиотека сигналов инициации трансляции, т. е. набор плазмид с различными рибосомсвязывающими участками (RBS) гена нуклеазы cas9, расположенного под индуцируемым промотором P_{xyIA-cre} [3].

Рандомные сигналы инициации трансляции были встроены в последовательность прямого праймера, комплементарного началу гена cas9. Обратный праймер был расположен в области сайта BsmBI. Полученный в результате реакции ПЦР-фрагмент, содержащий случайные последовательности в области RBS, был встроен сборкой Гибсона по сайту NotI в плазмиду с усеченным вариантом cas9 (без 197 п. н.). Эта плазида содержала все необходимые элементы системы CRISPR/Cas9, в том числе кодировала sgPНК, но не имела плечей для гомологичной рекомбинации. В итоге была получена библиотека из 40 плазмид с различными последовательностями RBS. Данные плазмиды были трансформированы в тестовый штамм *Bacillus subtilis* с последовательностью протоспейсера в геноме.

По росту клеток был проведен скрининг вариантов RBS в условиях, обеспечивающих фоновую экспрессию нуклеазы cas9 в состоянии без индукции промотора P_{xyIA-cre} (в присутствии D-глюкозы, включающей катаболитную репрессию) и при индукции в присутствии D-ксилозы. В результате был выбран наиболее оптимальный вариант RBS, обеспечивающий минимальный синтез нуклеазы Cas9 в состоянии без индукции и достаточный по силе для внесения двуцепочечного разрыва ДНК при индукции в присутствии D-ксилозы.

Работа поддержана государственным заданием НИЦ «Курчатовский институт» (номер АААА-А20-120093090015-2 от 30.09.2020).

1. Dong H., Cui Y. et. al. // *Microbial. Cell Factories*. 19 (2020).
2. Doudna J.A., Charpentier E. // *Science*. 346, 6213 (2014).
3. Gnuchikh E.Y., Manukhov I.V. et. al. // *Biotechnology in Russia*. 36, 6 (2020).

Позитивная аллостерическая модуляция группы III метаботропных рецепторов глутамата усиливает нейропротекторное действие мемантина при экспериментальной нейродегенерации

Черноморец И. Ю., Федоров Д. А., Першина Е. В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

yrqen@mail.ru

Чрезмерная глутаматергическая активность вовлечена в патогенез ряда нейродегенеративных заболеваний. В настоящее время фармакологическая модуляция ионотропных рецепторов глутамата применяется в качестве терапевтической стратегии для лечения, однако данный подход малоэффективен [1] и сопровождается побочными эффектами из-за вовлечения ионотропных рецепторов глутамата, в частности NMDA, во многие физиологические функции [2]. Возможной альтернативой и новыми потенциальными мишенями для лечения неврологических расстройств, включая депрессию [3], шизофрению [4], болезнь Паркинсона [5] и болезнь Альцгеймера [6], могут выступать метаботропные рецепторы глутамата (mGluRs).

Ранее в нашей лаборатории были выявлены mGluRs, которые вовлекаются на разных этапах гибели нейронов в гиппокампе, на одной из экспериментальных моделей нейродегенерации, вызванной нейротоксикантом хлоридом триметилолова (TMT) [7].

Целью данной работы было изучение морфофункциональных изменений в гиппокампе мозга крыс при экспериментальной нейродегенерации, вызванной TMT и различными фармакологическими подходами модуляции глутаматергической системы. В исследовании сравнивали контрольную подгруппу животных с четырьмя подопытными группами: с индуцированной нейродегенерацией (TMT) и с последующей блокадой ионотропных (TMT + мемантин) или активацией метаботропных рецепторов глутамата группы III (TMT + VU0422288), а также совместного воздействия на оба типа рецепторов (TMT + мемантин + VU0422288).

Анализ изменения уровня мРНК генов эксайтотоксичности и нейровоспаления, а также морфологических изменений нервных клеток в гиппокампе и поведения животных выявил, что наиболее выраженным нейропротекторным эффектом обладает VU0422288 в сочетании с мемантином, тогда как отдельное применение только мемантина или только VU0422288 оказывает наименее защитное воздействие при нейротоксическом повреждении мозга.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-75-00106.

1. Matsunaga S. et al. // PLoS One. 10, 10 (2015).
2. Chen H.S. // J. Neurochem. 97 (6), 1611 (2006).
3. Dogra S. // Neuropharmacology. 15, 196 (2021).
4. Dogra S. // Mol. Pharmacol. 101 (5), 275 (2022).
5. Amalric M. // Curr. Opin. Pharmacol. 20, 29 (2015).
6. Caraci F. et al. // Curr. Opin. Pharmacol. 38, 1 (2018).
7. Pershina E.V. et al. // J. Mol. Neurosci. 67 (2), 258 (2019).

Оценка специфичности РНК-управляемой нуклеазы Cas12a в условиях *in vitro*

Чиринская А. В.¹, Мисюрин М. А.¹, Маркова Е. В.¹, Зелинский А. А.¹,
Сопова Ю. В.^{1,2}, Леонова Е. И.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики

им. Н. И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург, Россия

ChirinskaiteA@yandex.ru

CRISPR–Cas12a принадлежит ко 2-му классу подтипу 5 CRISPR–Cas-систем и представляет собой рибонуклеиновый комплекс, состоящий из единственной CRISPR RNA (crRNA) и белка Cas12a [2]. CRISPR–Cas12a, наряду с CRISPR–Cas9, может быть использована для геномного редактирования. Нуклеаза Cas12a из бактерии *Lachnospiraceae* (LbCas12a) широко используется для биомедицинских исследований. Субстратная специфичность и механизм расщепления ДНК Cas12a выяснены неполностью [3]. Известно, что для распознавания мишени нуклеазе LbCas12a требуется специфическая нуклеотидная последовательность, называемая мотивом, прилегающим к протоспейсеру (PAM) [2]. Помимо канонического для Cas12a PAM TTTV (где V = A, C или G), в некоторых условиях LbCas12a может распознавать другие, субоптимальные последовательности PAM [4].

Мы исследовали активность нуклеазы LbCas12a в условиях *in vitro* в присутствии нового PAM TТАА [5] и обнаружили изменение специфичности расщепления ДНК-мишени. В случае канонического PAM мы наблюдали расщепление ДНК-мишени LbCas12a во многих положениях. В случае же нового PAM TТАА однонуклеотидные замены во всех положениях направляющей РНК, кроме 20-го, блокируют расщепление ДНК-мишени, что указывает на повышение специфичности нуклеазы в данных условиях. Также мы показали, что тип нуклеотидных замен (U-A, U-C или U-G) не влияет на эффективность расщепления. Оценку эффективности и специфичности фермента проводили с помощью гель-электрофореза, а также с использованием меченных FAM одноцепочечных зондов.

На основании полученных данных мы сделали вывод, что использование нового TТАА PAM значительно повышает специфичность нуклеазы, что, в свою очередь, открывает широкие перспективы для разработки диагностических систем, основанных на LbCas12a, в частности для быстрого генотипирования мышей-носителей точечных мутаций и микроделеций.

Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ ID 94030690 и ресурсного центра РМиКТ научного парка СПбГУ.

1. Gootenberg J.S. et al. // *Science* 360, 6387 (2018).
2. Swarts D.C., Jinek M. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 9, 2 (2018).
3. Chen J.S. et al. // *Science* 360, 6387 (2018).
4. Zhou J. et al. // *Mol. Ther.* 30, 1 (2022).
5. Misiurina M.A. et al. // *Life* 12, 11 (2022).

Эмфорин – новый белковый ингибитор, регулирующий активацию протеализина, металлопротеазы *Serratia proteamaculans*

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

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

ksyssha57@bk.ru

Протеализинподобные протеазы (ППП) – группа металлопротеаз, относящихся к семейству пептидаз M4. ППП широко распространены у бактерий, однако биологические функции этих ферментов остаются невыясненными. В то же время имеющиеся данные указывают на вовлеченность ферментов группы во взаимодействие бактерий с другими организмами и, вероятно, в патогенез [1–3].

Мы обнаружили, что гены ППП у бактерий, как правило, колокализованы с генами ингибиторов, относящихся к неизвестному ранее семейству белковых ингибиторов протеаз. Часто гены ППП и ингибитора, как, например, гены протеализина (PIn) и его ингибитора эмфорина (M4in) бактерии *Serratia proteamaculans*, формируют бицистронный оперон [4].

Во всех описанных ранее случаях, когда гены протеазы и ее ингибитора находятся в одном опероне, фермент синтезируется в виде предшественника и активируется во время секреции. При этом считается, что ингибитор защищает клетки от губительного действия активированной, но еще не вышедшей из клетки протеазы [5].

Для пары PIn–M4in мы показали, что оба белка не секретируются конститутивно [3, 5]. Причем PIn в клетках периодической культуры *S. proteamaculans* накапливается в виде неактивного предшественника и активируется только в стационарной фазе при длительном (более 40 ч) культивировании; активация PIn сопряжена со снижением оптической плотности (ОП) культуры. В то же время ОП культуры штамма с делецией гена *PIn* после выхода на стационар не меняется, а делеция гена *M4in*, наоборот, приводит к более раннему снижению ОП культуры и, соответственно, активации протеазы. По-видимому, M4in не защищает клетки от действия протеазы, но способен на время «отложить» ее активацию.

Таким образом, можно предположить, что активация PIn необходима для контроля плотности бактериальной культуры в неблагоприятных условиях, в частности при голодании, а M4in регулирует эту активацию.

1. Bozhokina E.S. et al. Bacterial invasion of eukaryotic cells can be mediated by actin-hydrolysing metalloproteases grimelysin and protealysin // Cell Biol. Int. 2011. V. 35. No. 2. P. 111–118.

2. Held K.G., LaRock C.N., D'Argenio D.A. et al. A metalloprotease secreted by the insect pathogen *Photobacterium luminescens* induces melanization // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. No. 23. P. 7622–7628.
3. Kothary M.H., McCardell B.A., Frazar C.D. et al. Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. No. 13. P. 4142–4151.
4. Chukhontseva K.N. et al. The protealysin operon encodes emfourin, a prototype of a novel family of protein metalloprotease inhibitors // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 169. P. 583–596.
5. Shaw L.N., Golonka E., Szmyd G. et al. Cytoplasmic control of premature activation of a secreted protease zymogen: Deletion of staphostatin B (*SspC*) in *Staphylococcus aureus* 8325-4 yields a profound pleiotropic phenotype // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. No. 5. P. 1751–1762.
6. Chukhontseva K.N., Salnikov V.V., Morenkov O.S., Kostrov S.V., Demidyuk I.V. Protealysin is not secreted constitutively // *Protein Pept. Lett.* 2019. V. 26. No. 3. P. 221–226.

Происхождение рака молочной железы у пациентки с первичной эндометриодной аденокарциномой

Шахматова А. Д., Вербенко В. Н.

НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

rykhlova_ad@pni.nrcki.ru

Наследственный неполипозный колоректальный рак 5-го типа (ННКРР5), известный также как синдром Линча 5-го типа (OMIM #614350), представляет собой наследуемый аутосомно-доминантным образом с неполной пенетрантностью тип рака, характеризующийся возникновением колоректального рака и/или внекишечного рака, в частности рака эндометрия, в середине взрослой жизни [1]. Данная разновидность синдрома Линча вызывается гетерозиготной мутацией в одном из генов системы коррекции неспаренных оснований, в частности в гене *MSH6* [2].

Целью данной работы явился молекулярно-генетический анализ генетических изменений, накапливающихся в клетках опухоли молочной железы у пациентки с первичной аденокарциномой эндометрия и отягощенным семейным анамнезом – синдромом Линча с носительством герминальной мутации в гене *MSH6* [3].

Парафинизированные срезы аденокарциномы молочной железы были предоставлены патологоанатомической лабораторией НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова. Геномную ДНК выделяли из парафинизированных срезов с помощью набора FFPEExtract DNA согласно протоколу производителя («Евроген», Москва). Мутационные профили анализировали с применением полноэкзомного секвенирования (WES) («Генетико», Москва). Определяли наличие повреждений в микросателлитах BAT26 и BAT40. Рецепторный статус был исследован с помощью ИГХ стандартным методом (E-cadherin, PR, ER, ki67 и Her2neu).

Анализ данных WES выявил герминальные мутации в генах *MSH6* и *PRKDC*, приводящие, очевидно, к геномной нестабильности. Обнаружены также патогенные соматические варианты в генах *BRCA2*, *BLM* и *CDH1*. Опухоль была микросателлитно-стабильной. Экспрессия E-кадгерина ожидаемо была негативной вследствие мутации в *CDH1*. Маркер пролиферативной активности Ki-67 составил 80 %, статус опухоли HER-2 при определении методом CISH равнялся 1+, ER+ и PR+.

Полученные генетические данные хорошо согласуются с фенотипической характеристикой, гистологическим типом и рецепторным статусом опухоли. В то время как мутации в *BRCA2* характерны для обоих гистологических типов:

долькового и протокового рака молочной железы, мутации в *CDH1* встречаются исключительно в дольковом типе, что соответствует описанию образца.

1. Castellsague E., Liu J., Volenik A. et al. Characterization of a novel founder MSH6 mutation causing Lynch syndrome in the French Canadian population // Clin. Genet. 87: 536–542 (2015).
2. Miyaki M., Konishi M., Tanaka K. et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer // (Letter) Nature Genet. 17: 271–272 (1997).
3. Vostriukhina O.A., Mirlina E.D., Khmelkova D.N., Shakhmatova A.D., Kil Yu.V., Polyatskin I.L., Artemyeva A.S., Verbenko V.N. An MSH6 germline pathogenic variant p. Gly162Ter associated with Lynch syndrome // Human Genome Variation. <https://doi.org/10.1038/s41439-022-002216-7> (2022).

Влияние метилирования и гидроксиметилирования матричного С на точность синтеза ДНК транслезионными и репаративными ДНК-полимеразами человека

Шилкин Е. С.¹, Петрова Д. В.², Макарова А. В.¹, Жарков Д. О.²

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

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

ShilkinEvgeniy.chem@gmail.com

5-метилцитозин (mC) и продукт его направленного окисления – 5-гидроксиметилцитозин (hmC) – являются важнейшими эпигенетическими метками в клетках высших эукариот [1, 2]. У человека метилированные С в составе CpG-динуклеотидов являются «горячими точками» мутагенеза [3, 4]. Основной причиной С > Т-транзиций в CpG-сайтах является дезаминирование mC с образованием Т. Однако в последние годы появляются данные о существовании независимого от дезаминирования механизма мутагенеза в CpG-сайтах, ассоциированного с работой ДНК-полимераз (ДНКП). Высказана гипотеза о влиянии mC на точность синтеза ДНК и увеличении частоты промутагенного ошибочного включения dAMP [5, 6]. Известно, что частота окисления G до 8-охо-G в метилированных CpG-сайтах повышена [7]. Цель работы – анализ точности включения нуклеотидов напротив mC и hmC репаративными и транслезионными ДНКП, а также и оценка влияния mC на эффективность и точность транслезионного синтеза напротив соседнего 8-охо-G.

Была протестирована ДНК-полимеразная активность шести репаративных и транслезионных ДНКП человека (Pol β, Pol λ, Pol ι, Pol κ, Pol η, REV1), а также праймазы-полимеразы PrimPol на ДНК-матрицах, содержащих С/mC/hmC в TХG-контексте. Определены ДНКП, чувствительные к наличию матричного mC (Pol β, Pol ι и Pol η). По данным стационарной кинетики показано, что mC не влияет на точность Pol β и Pol ι, но снижает эффективность синтеза.

Проведен анализ транслезионной активности ДНКП напротив 8-охо-G и их способности удлинять пары 8-охо-G/A и 8-охо-G/C в зависимости от статуса метилирования следующего за 8-охо-G С в матричной цепи. Показано, что метилирование не влияет на точность включения dNMP напротив 8-охо-G. В то же время обнаружено, что Pol ι и Pol β менее эффективно удлиняют пару 8-охо-G/A при наличии mC в матричной цепи, в случае Pol ι этот эффект сопровождается снижением точности.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-24-20156.

1. Weber M., Schübeler D. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark // *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 273–280 (2007).
2. Szulwach K.E., Jin P. Integrating DNA methylation dynamics into a framework for understanding epigenetic codes // *BioEssays* **36**, 107–117 (2014).
3. Waters T.R., Swann P.F. Thymine-DNA glycosylase and G to A transition mutations at CpG sites // *Mutat. Res. Mutat. Res.* **462**, 137–147 (2000).
4. Pfeifer G.P. Mutagenesis at methylated CpG sequences // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **301**, 259–281 (2006).
5. Tomkova M., Tomek J., Kriaucionis S., Schuster-Böckler B. Mutational signature distribution varies with DNA replication timing and strand asymmetry // *Genome Biol.* **19**, 1–12 (2018).
6. Tomkova M., Schuster-Böckler B. DNA modifications: naturally more error prone? // *Trends Genet.* **34**, 627–638 (2018).
7. Lindahl T., Barnes D.E. Repair of endogenous DNA damage // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **65**, 127–133 (2000).

Разработка системы трансфекции на основе массива полупроводниковых нитевидных нанокристаллов

*Шмаков С. В.^{1,2}, Махнева Е. А.¹, Кондратьев В. М.^{1,3},
Бойцов В. М.¹, Большаков А. Д.^{1,3}*

¹ Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж. И. Алфёрова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

mahnewa.katia@yandex.ru

Трансфекция – процесс введения нуклеиновой кислоты в клетки эукариот невирусным методом. Это одна из важнейших задач в области биологии и биотехнологии. Например, по запросу *Cell transfection* поисковая система по научным публикациям Google Scholar индексирует более 21 тыс. статей только за 2022 год. Все методы доставки нуклеиновых кислот в клетки мишени можно разделить на три категории: физические, химические и методы, основанные на использовании вирусов. Каждая из этих категорий имеет свои сильные и слабые стороны, которые определяют области их применения. Так, физические методы обладают достаточно высокой эффективностью и универсальностью, не требуют постоянных закупок реактивов, однако обладают высокой токсичностью и плохо поддаются масштабированию. Исследования, направленные на интеграцию твердотельных, в том числе люминесцентных, наноструктур в биологии и медицине – активно развивающееся на протяжении последних десятилетий направление. Таргетная доставка лекарств [1], исследования электрофизических свойств [2] и флуоресцентная микроскопия [3] – области, в которых наноструктуры оказали наибольшее влияние.

В работе описано исследование возможности применения нового физического метода трансфекции – трансфекции клеток с помощью массива нитевидных нанокристаллов (ННК) – вертикальных игл, сформированных методом молекулярно-пучковой эпитаксии на основе GaP/GaPAs.

В ходе исследования были получены новые данные о выживаемости, жизнеспособности, механизмах клеточной гибели для клеточной линии СТ26 EGFP на сильно развитых поверхностях, моделируемых массивом ННК. Идеей было сравнить жизнеспособность клеток на двух различных подложках: SiO₂ и ННК. С помощью методов сканирующей электронной микроскопии и конфокальной микроскопии было показано, что клетки, культивируемые на поверхности ННК, способны разрушать и эндоцитировать вертикально растущие кристаллы, однако неспособны к эндоцитозу лежащих на поверхности подложки

ННК. Также была показана возможность трансфекции клеток СТ26 плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок GFP.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 23-24-00288).

1. Xie X., Xu A.M., Leal-Ortiz S. et al. Nanostraw-Electroporation System for Highly Efficient Intracellular Delivery and Transfection // ACS Nano 7 (5), 4351–4358 (2013).
2. Tian B., Cohen-Karni T., Qing Q. et al. Three-Dimensional, Flexible Nanoscale Field-Effect Transistors as Localized Bioprobes // Science 329, 830–834 (2010).
3. Gartia M.R., Hsiao A., Sivaguru M. et al. Enhanced 3D Fluorescence Live Cell Imaging on Nanoplasmonic Substrate // Nanotechnology 22 (36), 365203 (2011).